

JAVIER CORREA ALVAREZ

**“Efeito do desequilíbrio hormonal na supressão das respostas de
defesa do cacaueiro durante as etapas iniciais da infecção pelo fungo
Moniliophthora perniciosa”**

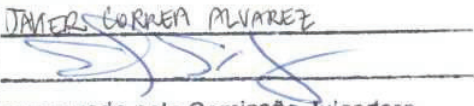
**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JAVIER CORREA ALVAREZ

**“EFEITO DO DESEQUILÍBRIO HORMONAL NA SUPRESSÃO DAS
RESPOSTAS DE DEFESA DO CACAUEIRO DURANTE AS ETAPAS
INICIAIS DA INFECÇÃO PELO FUNGO MONILIOPHTHORA
PERNICIOSA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JAVIER CORREA ALVAREZ

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do Título de Doutor
em Genética e Biologia Molecular, na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (Orientador)
Coorientadora: Dra. Odalys Garcia Cabrera

CAMPINAS,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

AL86e Alvarez, Javier, 1982-
Efeito do desequilíbrio hormonal na supressão das respostas de defesa do
cacaueiro durante as etapas iniciais da infecção pelo fungo *Moniliophthora*
perniciosa / Javier Correa Alvarez. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.
Coorientador: Odalys García Cabrera.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). 2. Auxina. 3. Cacao. 4. Expressão
gênica. 5. RNA-seq. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Cabrera,
Odalys Garcia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Hormonal imbalance during early infection of *Moniliophthora perniciosa* in cacao meristems causes suppression of the plant defenses

Palavras-chave em inglês:

Witches' broom disease

Auxin

Gene expression

Cacao

RNA-seq

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Paulo José Samenho Moran

Jörg Kobarg

Marcos Silveira Buckeridge

Lázaro Eustáquio Pereira Peres

Data de defesa: 07-06-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 07 de junho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador) (orientador)



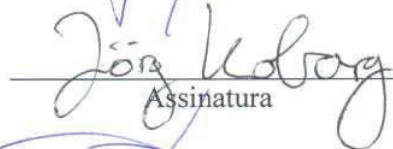
Assinatura

Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran



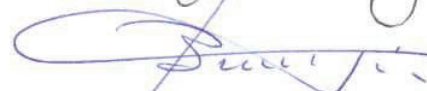
Assinatura

Dr. Jörg Kobarg



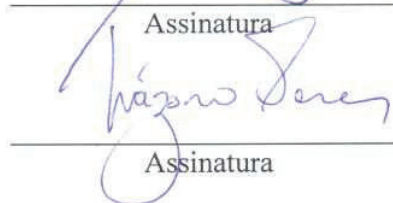
Assinatura

Dr. Marcos Silveira Buckeridge



Assinatura

Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Assinatura

Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

Dr. Carlos Augusto Colombo

Assinatura

Resumo

A doença vassoura de bruxa do cacau, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* tem sido um dos maiores problemas fitopatológicos do hemisfério sul. O fungo tem uma fase biotrófica longa, pouco comum entre fungos com o estilo de vida hemibiotrófico. Este fato sugere que *M. perniciosa* deve dispor de importantes mecanismos de evasão do sistema de defesa da planta e que estes teriam um papel fundamental para o sucesso da infecção. Assim sendo, o objetivo deste trabalho é entender os mecanismos de supressão envolvidos na resposta de defesa basal da planta. Especificamente, aqueles mecanismos mediados por hormônios que poderiam influenciar na suscetibilidade da planta ao patógeno durante a invasão do *M. perniciosa*. Com este fim, foram construídas bibliotecas de RNAseq da interação cacau-*M. perniciosa* durante o início da fase assintomática da doença. As bibliotecas representantes desta interação mostraram expressão diferencial de genes relacionados com a sinalização de auxina, mas não foi observado indução de genes da biossíntese planta. Estes dados sugerem a presença de auxina “exógena” produzida provavelmente pelo patógeno. Adicionalmente, foram encontrados genes relacionados com o ácido jasmônico e etileno. Com o intuito de identificar se *M. perniciosa* era capaz de secretar um composto com função de auxina, sementes de *Arabidopsis thaliana* foram crescidas em amostras de sobrenadante do fungo. Estes experimentos mostraram alteração da morfologia das raízes semelhantes à adição de auxina exógena. Amostras de sobrenadantes do fungo foram submetidas às técnicas de RMN, LC MS/MS e GC-MS e mostraram a presença de um composto com estrutura semelhante ao indol-3-acetoácido sendo produzido pelo fungo. Estudos do *time course* de produção deste composto mostraram que a auxina produzida é rapidamente metabolizada formando diferentes derivados indólicos com provável função na patogênese do fungo. Finalmente, encontramos um novo composto com estrutura parecida à auxina e capacidade de indução de genes de resposta a este hormônio. Este trabalho é o primeiro relato a mostrar o *time course* da síntese de auxina por *M. perniciosa* e a indução de respostas de sinalização de auxina nos tecidos de cacau infectados pelo fungo. A intervenção nas vias de síntese de auxina pelo fungo seria um caminho plausível na tentativa por conter a doença vassoura de bruxa.

Abstract

The witches' broom disease in Cacao is caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa* has been one of the most important problems phytopathological in the southern hemisphere. The fungus has an unusual long biotrophic phase with the lifestyle hemibiotrophic suggesting that *M. perniciosa* must have important evasion mechanisms for breaking of the plant defense system and it would have a key role to success in the infection. Therefore, the aim of this work is to understand some of the mechanisms involved in the suppression of basal defense response of the plant. Specifically, hormones-mediated mechanisms that could influence plant susceptibility to pathogens during the infection of *M. perniciosa*. For this purpose, RNAseq libraries were constructed of the interaction cacao - *M. perniciosa* during the asymptomatic phase of the disease. Genes related with the auxin and jasmonic acid signaling and ethylene production were differential expressed during the initial stage of the disease. Furthermore, auxin-responsive genes were induced, but not observed induction of plant biosynthesis genes for this hormone. These data suggest presence of auxin "exogenous" probably produced by the pathogen.

In order to identify whether *M. perniciosa* was able to secrete a compound like an auxin, *Arabidopsis thaliana* seedlings were grown in mediums with supernatant of the fungus. These experiments showed alterations on the roots morphology, similar to the addition of exogenous auxin. Samples of supernatants were subjected to the techniques of NMR, LC-MS/MS and GC-MS and showed the presence of a compound with a similar structure of Indole-3- Acetic Acid (IAA) being produced by the fungus. A time course of the production of this compound was examined by LC-MS/MS and showed that the auxin is produced by *M. perniciosa*, but is rapidly metabolized forming different indole derivatives, some of them with a probable role in the pathogenesis. Finally, we found a new compound with a structure similar to auxin and with the ability to induce gene response to this hormone.

SUMARIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO	1
1. VARIEDADES DE CACAUEIRO.....	2
2. AGENTE CAUSAL DA VASSOURA DE BRUXA	4
3. OS HORMÔNIOS VEGETAIS NA INTERAÇÃO PLANTA - PATÓGENO	6
4. ALTERAÇÃO DA SINALIZAÇÃO HORMONAL EM HOSPEDEIROS INFECTADOS POR PATÓGENOS.....	8
a. <i>Produção de hormônios pelos patógenos</i>	10
b. <i>Auxina na vassoura de bruxa</i>	11
c. <i>Auxina durante as interações planta – micróbio</i>	12
OBJETIVO GERAL	14
DIAGRAMA METODOLÓGICO.....	15
CAPITULO I.....	16
OBJETIVO I: ANALISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A RESPOSTA À AUXINA NO CACAUEIRO DURANTE UMA INTERAÇÃO COMPATÍVEL INICIAL COM <i>M. PERNICIOSA</i>	16
1. <u>ANÁLISE <i>IN-SILICO</i> DA EXPRESSÃO DE GENES DE RESPOSTA À AUXINA DURANTE AS INTERAÇÕES COMPATÍVEIS E INCOMPATÍVEIS CACAU - <i>M. PERNICIOSA</i> EM MERISTEMAS DA PLANTA.</u>	17
<i>Metodologia</i>	17
<i>Resultados e discussão</i>	18
2. <u>CRESCIMENTO E INFEÇÃO DE PLANTAS DE CACAUEIRO EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE A FASE ASSINTOMÁTICA DA VASSOURA DE BRUXA.</u>	20
<i>Metodologia</i>	20
<i>Resultados e discussão</i>	22
3. <u>PADRONIZAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL PARA GENES DE CACAU RELACIONADOS COM A RESPOSTA A HORMÔNIOS.</u>	23
<i>Metodologia</i>	24
<i>Resultados e discussão</i>	26
4. <u>PCR SEMI – QUANTITATIVA DE GENES RELACIONADOS COM HORMÔNIOS EM TECIDOS INFECTADOS COM <i>M. PERNICIOSA</i>.</u>	26
<i>Resultados e discussão</i>	27
5. <u>VALIDAÇÃO DE AMOSTRAS INFECTADAS USANDO qPCR</u>	28
<i>Metodologia</i>	28
<i>Resultados e discussão</i>	31
6. <u>QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE GENES RELACIONADOS COM HORMÔNIOS</u>	32
<i>Metodologia</i>	33
<i>Resultados e discussão</i>	33
7. <u>SEQUENCIAMENTO DA FASE ASSINTOMÁTICA DA VASSOURA DE BRUXA USANDO RNASEQ DA ILLUMINA.</u>	35
<i>Metodologia</i>	35
<i>Resultados e discussão</i>	36
CONCLUSÃO DO CAPÍTULO I.....	46
CAPITULO II.....	47

OBJETIVO II: DETERMINAÇÃO DO EFEITO <i>IN-PLANTA</i> DE COMPOSTOS SECRETADOS PELO FUNGO <i>M. PERNICIOSA</i>	47
1. <u>EFEITO DA APLICAÇÃO EXÓGENA DE HORMÔNIOS VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO DE SINTOMAS DA VASSOURA DE BRUXA NO CAULE SOBRE CONDIÇÕES CONTROLADAS</u>	48
Metodologia	48
Resultados e discussão	49
2. <u><i>M. PERNICIOSA</i> CAUSA ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO DAS RAÍZES DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>?</u>	52
Metodologia	53
Resultados e discussão	55
3. <u>EXTRATOS DE SOBRENADANTE DO FUNGO CAUSAM ALTERAÇÕES NA PRODUÇÃO E TRANSPORTE DA AUXINA EM PLANTAS DE <i>A. THALIANA</i> DR5::<i>GUS</i></u>	58
Metodologia	60
Resultados e discussão	60
CONCLUSÕES DO CAPÍTULO II	63
CAPÍTULO III	64
OBJETIVO III: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE METABOLITOS RELACIONADOS COM AUXINA PRODUZIDOS POR <i>M. PERNICIOSA</i>	64
Metodologia	65
1. <u>DETECÇÃO DO IAA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR)</u>	66
Resultados e discussão	66
2. <u>QUANTIFICAÇÃO DO IAA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (LC-MS/MS)</u>	67
Metodologia	67
Resultados e discussão	68
3. <u>IDENTIFICAÇÃO DE AUXINAS EM AMOSTRAS DE <i>M. PERNICIOSA</i> USANDO GC-MS</u>	70
Metodologia	71
Resultados e discussão	71
4. <u>IDENTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS DAS VIAS METABÓLICAS PROPOSTAS PARA <i>M. PERNICIOSA</i> BASEADO EM ANÁLISES DO GENOMA</u>	75
Resultados e discussão	76
5. <u>EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESES DA AUXINA DO FUNGO</u>	77
Metodologia	77
Resultados	78
6. <u>ANÁLISE FILOGENÉTICA NA FAMÍLIA DAS NITRILASES</u>	80
Metodologia	81
DISCUSSÃO DO CAPÍTULO	83
CONCLUSÕES DO CAPÍTULO III	86
CAPÍTULO IV	87
OBJETIVO IV: ANÁLISE DOS EFEITOS <i>IN PLANTA</i> DE UM COMPOSTO PRODUZIDO POR <i>M. PERNICIOSA</i>, SEMELHANTE À AUXINA (<i>AUXIN-LIKE</i>)	87
1. <u>IDENTIFICAÇÃO DE METABOLITOS COM POTENCIAL ANÁLOGO À AUXINA (<i>AUXIN-LIKE</i>)</u>	89
Metodologia	89
Resultados e discussão	90
2. <u>ESTUDO DOS EFEITOS DO I1AA EM SEMENTES DE <i>A. THALIANA</i> MEDIANTE UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DR5::<i>GUS</i></u>	93
Metodologia	93

<i>Resultados e discussão</i>	<i>93</i>
CONCLUSÕES DO CAPÍTULO IV	97
CONSIDERAÇÕES GERAIS DO TRABALHO	98
ANEXOS	116
ANEXO 1	117
ANEXO 2	122
ANEXO 3	123
ANEXO 4.....	125
ANEXO 5.....	127
ANEXO 6	128
DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA	183

Agradecimentos

A minha mãe, Gladys Alvarez Atehortua, pelo apoio incondicional durante toda a minha vida. Igualmente a minha família; Angélica Alvarez, Lucia Atehortua e demais por tudo o apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gonçalo, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelas discussões sinceras, pelos conselhos sábios, pela liberdade para à toma de decisões sobre o trabalho durante o andamento do doutorado e por tudo o que eu pude apreender enquanto estive no LGE.

Um agradecimento muito especial a minha co-orientadora, Dra. Odalys García Cabrera, por toda a sua ajuda durante o meu trabalho, do início ao fim, por toda a sua paciência, conselhos, apoio nas ideias... mais do que a minha orientadora, foi como a minha irmã.

Aos amigos que dividiram bancadas e muitos momentos importantes: Gleidson, Paulinho, Alinne, Marcos, Dani, Zapa, Leandro, Osvaldo, Marcelo. Obrigado pelos momentos divertidos, pelas discussões sérias e, principalmente, por todo o apoio.

Aos demais amigos, do LGE; André, Pedro, Luige; aos amigos da Unicamp, Cheo, Isabel, Natalia, Melissa, William e a toda a colônia Colombiana. A todos eles e aos que faltam, agradeço pelos momentos de descontração e pelo apoio nos momentos difíceis. Foram a minha família por 4 anos, aprendi as melhores coisas da minha vida com vocês.

À Eliane, Silvia e Mari pela paciência e disposição para me ajudar com os mais diversos problemas.

À FAPESP pelo importante apoio financeiro com os projetos (FAPESP, 2009/50119-9 e 2009/52808-6), sem esse apoio não houvesse sido possível a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro durante o início do programa de pós-graduação.

À UNICAMP por permitir me formar como pesquisador numa excelente instituição.

Ao Brasil por abrir as portas aos estrangeiros que querem sair na frente e não contam com apoio nos seus países de origem.

Muito obrigado!

Índice de Figuras

Figura 1. Ações moleculares dos hormônios e vias de sinalizações hormonais durante interações planta – patógenos biotróficos. (López <i>et al.</i> , 2008).	9
Figura 2. Comparação de famílias de genes induzidos pela auxina entre as bibliotecas de meristemas infectados com esporos de <i>M. perniciosa</i>	18
Figura 3. Plântulas de cacau variedade comum com quatro semanas de idade, crescidas em casa de vegetação e sincronizadas antes de serem infectadas.	21
Figura 4. Procedimento de infecção e coleta de meristemas em condições controladas em casa de vegetação.	22
Figura 5. Progressão dos sintomas da vassoura de bruxa obtida mediante a inoculação de plântula de cacau com esporos de <i>M. perniciosa</i> em casa de vegetação.	23
Figura 6. Amplificação dos genes envolvidos com hormônios, usando cDNA contaminado com DNA genômico	26
Figura 7. PCR semi-quantitativa de genes envolvidos nas vias hormonais durante interação compatível com <i>M. perniciosa</i>	28
Figura 8. RNA total de alguns das amostras da fase assintomática.	29
Figura 9. RNA ribossomal indicando ótima qualidade do RNA total com valores de RQI superiores a 8.0.	29
Figura 10. Quantificação de genes de fungo em amostras de meristemas de cacau infectadas e os respectivos controles. Curvas Padrões para mpACT e mpTUB.	32
Figura 11. Curvas de amplificação para o gene mpACT de amostras de cacau infectadas >48 horas com <i>M. perniciosa</i>	32
Figura 12. Expressão relativa de genes relacionados com hormônios usando a tubulina A como gene referência para amplificação por qPCR.	34
Figura 13. Análise de variação de todas as bibliotecas RNAseq da fase inicial da infecção com <i>M. perniciosa</i>	37
Figura 14. Perfil de expressão de 57 genes ortólogos com alta adstringência para auxina em <i>Arabidopsis</i> e cacau durante tratamentos bióticos e abióticos.	40
Figura 15. Comparação da expressão de genes de cacau relacionados com hormônios nas primeiras 48 horas depois da infecção com <i>M. perniciosa</i> usando três abordagens.	41
Figura 16. Time-course da expressão de genes relacionados com hormônios e agrupamento por perfis de expressão gênica.	42
Figura 17. Análise PCA das bibliotecas RNAseq escolhidas da fase inicial da infecção com <i>M. perniciosa</i>	43
Figura 18. Tratamentos com hormônios e inibidores em meristemas de plântulas de cacau prévio à infecção com <i>M. perniciosa</i>	51
Figura 19. Crescimento de raízes de <i>Arabidopsis thaliana</i> com meio MS suplementado com hormônios e extratos de fungo <i>M. perniciosa</i> 9 dias depois do tratamento.	55
Figura 20. Tamanho de raízes de <i>Arabidopsis thaliana</i> após nove dias de crescimento em meio MS suplementado com hormônios e extratos de fungo <i>M. perniciosa</i>	57
Figura 21. Origem dos promotores de resposta à auxina. Em A, plasmídeo com a construção DR5::GUS original. Em B, plantas de <i>Arabidopsis</i> transgênicas DR5(7x)-GUS com X-Glc sem e com a auxina sintética NAA (Ulmasov <i>et al.</i> , 1997).	59
Figura 22. Ensaio histoquímico GUS com promotor de resposta à auxina DR5::GUS em <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
Figura 23. Detecção por NMR de IAA em meio induzido com o precursor (IAN).	67
Figura 24. Análise LC-MS/MS do IAA e IAN derivado de extratos de sobrenadante de <i>M. perniciosa</i> cultivados em meio suplementado com IAN líquido de 15 dias após a inoculação.	69
Figura 25. Detecção de GC-MS e quantificação de IAA e derivados do indol produzidos por <i>M. perniciosa</i> em culturas líquidas suplementadas com Trp.	72
Figura 26. Produção de ácido indol-3-acético (IAA) e acumulação de ácido indol-3-carboxílico e outros derivados, em culturas de <i>M. perniciosa</i> suplementadas com IAN.	73
Figura 27. Vias biossintéticas sugeridas para <i>M. perniciosa</i> para a produção de IAA dependentes do Trp.	75
Figura 28. Perfil transcricional das enzimas putativas para a biossíntese do IAA em todo o ciclo de vida de <i>M. perniciosa</i> com base em dados de RNA-seq	80
Figura 29. Relação filogenética dos genes das nitrilases nos genomas de <i>M. perniciosa</i> e <i>M. royeri</i>	82
Figura 30. Detecção por GC-MS de compostos indólicos derivados da cultura de <i>M. perniciosa</i> necrotrófico suplementado com IAN depois de 20 dias de inoculação.	91
Figura 31. Cromatogramas com o tempo de retenção do composto novo procurado por íon molecular 189 [m/z] ⁺	92

Figura 32. Resposta de sementes de <i>Arabidopsis thaliana</i> DR5::GUS ao tratamento com extratos de fungos e IAA.	94
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação por qPCR de genes relacionados com hormônios.	24
Tabela 2. Bibliotecas e número de <i>reads</i> sequenciados por Solexa <i>SingleEndx50</i> usando Hiseq2000 V.3 da interação cacau – <i>M. perniciosa</i>	35
Tabela 3. Descrição de experimentos de expressão em <i>A. thaliana</i> e <i>T. cacao</i> usados para análise de agrupamento. .	38
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos relacionados com auxina durante a fase inicial da infecção com <i>M. perniciosa</i>	43
Tabela 5. Quantificação por LC-MS/MS do IAA e precursores de culturas líquidas de <i>M. perniciosa</i>	70
Tabela 6. Enzimas putativas envolvidas na via de biossíntese do IAA em <i>M. perniciosa</i>	76

Índice de abreviaturas

- 1H-indol 1-acético
 IAA, 90
1-naftaleno-acético
 NAA-1, 88
2,4-diclorofenoxiacético
 2,4-D, 88
5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide
 X-glc, 59
ácido abscísico
 ABA, 6
ácido aspártico
 Asp, 44
ácido carboxílico aminociclopropano oxidase
 ACC, 34
ácido glutâmico
 Glu, 44
ácido jasmônico
 AJ, 6
ácido p-Chlorophenoxyisobutyric
 PCIB, 48
ácido salicílico
 AS, 1, 6
brasinosteróides
 BL, 6
citocininas
 CK, 6
cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de
 massas
 GC-MS, 64
cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de
 massas
 LC-MS/MS, 64
Cycle threshold
 Ct, 26
espécies reativas de oxigênio
 ROS, 5, 95
etileno
 ET, 1, 6
Expressed Sequence Tags
 ESTs, 24
fator de resposta ao etileno
 EFR2, 34
fatores de resposta á auxina
 ARFs, 7
giberelinas
 GA, 6
imunidade associada a padrões moleculares
 PTI, 7
indol acetonitrila
 IAN, 53
indol-3-acetaldeído
 IAALD, 74
indol-3-acetaldeído oxidase
 AAO1, 34
indol-3-acetamida
 IAM, 83
indol-3-acéticoácido
 IAA, 12
indol-3-carboxaldeído
 IALD, 73
indol-3-carboxílico
 ICA, 73
indol-3-piruvato
 IPA, 76
 IPyA, 74
jasmonato
 AJ, 1
Laboratório de Genômica e Expressão
 LGE, 1
L-triptofano
 Trp, 53
malondialdeído
 MDA, 5
melting temperature
 Tm, 30
necrose 1
 SI, 22
necrose 2
 SII, 23
necrose 3
 SIII, 23
necrosis and ethylene inducing proteins
 NEP, 5
nitrilases
 NIT, 81
PCR em Tempo Real
 qPCR, 24
Principal Component Analysis
 PCA, 42
resposta de hipersensibilidade
 HR, 7
resposta sistêmica adquirida
 SAR, 48
Ressonância Magnética Nuclear
 NMR, 64
sequenciamento de RNA
 RNAseq, 29
stress-induced morphogenic response
 SIMR, 10
thioredoxina redutase
 ntra, 10
triptamina
 TAM, 76

INTRODUÇÃO

O Brasil foi um dos maiores produtores e exportadores de cacau do mundo até a introdução do fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura de bruxa (Stahel, 1915; Singer, 1942; Aime e Phillips-Mora, 2005) na Bahia em 1989. Em apenas uma década, de 1991 a 2000, o país viu a produção anual de amêndoas de cacau cair de 400.000 toneladas para 100.000 (Batista, 2009) tornando a doença vassoura de bruxa um dos maiores problemas fitopatológicos do Brasil. No ano 2000, teve início o projeto genoma do fungo *M. perniciosa* no Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) do Instituto de Biologia da UNICAMP com o intuito de identificar fatores e mecanismos importantes para a patogenicidade do fungo que pudessem ser explorados na busca de soluções para o controle eficiente da doença.

A doença vassoura de bruxa é caracterizada pela formação de estruturas chamadas de vassoura verde. Esses sintomas estão relacionados com desbalanço hormonal ocasionados pela presença do patógeno *M. perniciosa*. Frequentemente, doenças de plantas têm sido associadas com inibição ou estimulação do crescimento e a formação de tumores devido a variações nos níveis hormonais desses tecidos (Robert-Seilanianz *et al.*, 2007). O desenvolvimento de técnicas bioquímicas tem permitido a extração de hormônios de crescimento tais como auxinas e citocininas a partir de bactérias (Robinette e Matthysse, 1990; M., T., Brandl e S. E. Lindow, 1998; Vandeputte *et al.*, 2005) e fungos (Maor *et al.*, 2004). Apesar das evidências da estreita relação que existe entre hormônios e doenças, existem poucos trabalhos demonstrando o papel dos hormônios de crescimento na interação planta-patógeno. Entretanto, as moléculas de sinalização associadas à defesa como ácido salicílico (AS), jasmonato (AJ) e etileno (ET), têm recebido grande atenção e a importância desses compostos na resistência das plantas está bem documentada (Feys e Parker, 2000; Kunkel e Brooks, 2002).

A complexa rede de interação e regulação existente entre as vias de sinalização de hormônios na planta permite ao patógeno modificar a fisiologia do seu hospedeiro para a sua própria vantagem usando um limitado número de moléculas (Maor e Shirasu, 2005). Ou seja, o patógeno

pode alterar diretamente o metabolismo dos hormônios produzidos pela planta ou pode ser capaz de ele mesmo secretá-los (Sequeira e Kelman, 1969).

As vias de síntese de hormônios assim como a quantidade de hormônio produzida variam para cada sistema patógeno-hospedeiro. Entretanto, em cada interação a produção de hormônios é um requisito indispensável para o estabelecimento da doença (Jameson, 2000). Por outro lado, existem cada vez mais evidências de que os hormônios controlam processos fisiológicos e do desenvolvimento de fungos. Por exemplo, esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* são capazes de formar apressório em resposta a etileno (Kolattukudy e Rogers, 1995), leveduras haplóides podem se diferenciar em diplóides em resposta à auxina (Prusty *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem que tanto a percepção do hospedeiro quanto a invasão do patógeno estão influenciados por hormônios.

Devido à conhecida importância dos hormônios na interação fungo-planta e ao especial impacto proposto para estes compostos no desenvolvimento dos sintomas vassoura de bruxa torna-se essencial aprofundar na genética e a biologia da interação *M. pernicioso* – cacau no que diz respeito da sinalização hormonal. Estes estudos auxiliariam na determinação (i) dos mecanismos hormonais envolvidos na suscetibilidade da planta ao patógeno, e (ii) dos fatores que permitem a evasão do patógeno às respostas de defesa da planta.

Neste trabalho pretendemos integrar informações sobre os mecanismos utilizados por *M. pernicioso* para influenciar na suscetibilidade da planta, focando especificamente naqueles processos envolvidos na manipulação das vias hormonais através do controle dos genes de sínteses, sinalização, transporte e degradação destes compostos. A seguir, se encontra uma revisão atualizada da literatura com primícias que sustentam a nossa hipótese de trabalho: ***M. pernicioso* seria capaz de produzir um composto análogo da auxina que estaria envolvido no aumento da suscetibilidade da planta ao patógeno.**

1. Variedades de cacau

Tradicionalmente as variedades de cacau são classificadas em três grupos: *Criollo*, *Forastero* e *Trinitario* que variam de acordo com a morfologia, genética e origem geográfica (Bartley, 2005). O *Criollo* foi cultivado por muito tempo na América do Sul e Central e representa a primeira variedade domesticada (Sounigo *et al.*, 2003). Neste grupo estão as

variedades que tem fruto com amêndoas grossas, brancas ou rosadas as quais tem mais sabor e dão origem aos chocolates finos (Marita *et al.*, 2001). Não obstante, esta variedade na atualidade é pouco cultivada por ter alta suscetibilidade a doenças (Marita *et al.*, 2001). As variedades do grupo de *Forastero* são amplamente cultivadas devido aos seus altos rendimentos em campo e resistência a doenças. Elas têm 80% da produção de amêndoa do cacau (Marita *et al.*, 2001). Os *Forasteros* são subdivididos em baixa Amazônica e alta Amazônica, os primeiros foram cultivados na bacia Amazônica e seus cultivares introduzidos na África. Entretanto, os segundo são considerados geneticamente mais diversificados e são freqüentemente usados em programas de melhoramento devido ao vigor, precocidade e resistência às doenças (Iwaro *et al.*, 2001). *Trinitarios* são considerados híbridos recente originados do cruzamento de genótipos de *Criollos* e *Forasteros* da baixa Amazônica (Motamayor, 2001). Exemplos de trinitários são as variedades de cacau TSH1188 (“tolerante” à vassoura de bruxa) e Catongo – ou cacau comum (suscetível à vassoura de bruxa) (Bartley, 2005).

O método ideal para o controle da vassoura de bruxa é a introdução de variedades de cacau com maior resistência genética uma vez que o controle químico e/ou biológico têm se mostrado ineficientes. A poda de tecidos infectados é uma medida fitossanitária de ultimo recurso, devido à difícil aplicação em grandes áreas da cultura e o alto custo econômico por mão-de-obra (Purdy e Schmidt, 1996). Avaliação da resistência das variedades é baseada na incidência e/ou gravidade dos sintomas, e os mecanismos de resistência no cacaueiro ainda são pouco conhecidos (Silva *et al.*, 1998). O genótipo de cacau “Scavina 6”, inicialmente coletado no Peru, foi a única fonte de resistência reconhecida e amplamente utilizada em programas de melhoramento genético de cacau. Esta variedade (Scavina 6) parecia ser dominante e predominantemente monogênica (Faleiro *et al.*, 2006). No entanto, a resistência desta variedade já foi quebrada no Equador e no Brasil apresentaram sintomas de infecção acentuados (Leal *et al.*, 2007). A perda de resistência pode estar associada com a variabilidade genética de *M. perniciosa*. Novas fontes de resistência têm sido intensamente procuradas na Amazônia Brasileira (Serenio *et al.*, 2006). Como resultado deste trabalho as adesões “CAB 214” e “CAB 208” têm exibido níveis significativos de resistência à vassoura de bruxa no sul da Bahia e no Amazonas (Albuquerque e Figueira, 2004).

2. Agente causal da vassoura de bruxa

O agente causal da vassoura de bruxa foi inicialmente classificado como *Marasmius* (Stahel, 1915) e reclassificado por Singer em (1942) como *Crinipellis perniciosa*. Recentemente Aime e Phillips-Mora (2005) realizaram estudos tanto morfológicos quanto moleculares e colocaram o biótipo patogênico dentro do gênero *Moniliophthora*, pertencente à família *Tricholomataceae* da ordem *Agaricales*.

Moniliophthora perniciosa é um patógeno hemibiotrófico (Purdy e Schmidt, 1996) apresentando dois tipos de nutrição: biotrófica ou parasítica e saprofítica ou necrotrófica. Em *M. perniciosa*, as diferentes fases do crescimento do fungo podem ser associadas a mudanças na biologia do micélio vegetativo. Os basidiósporos que são as unidades infectivas do fungo apresentam aspecto hialino e são uninucleados, monocarióticos. Inicialmente são dispersos pelo vento ou chuva durante a noite, garantindo que tenham um tempo de sobrevivência maior já que são sensíveis à luz ultravioleta e à dessecação. Os basidiósporos formam um ou dois tubos germinativos e penetram pelos estômatos, por ferimentos ou diretamente pela epiderme sem formação de haustórios (Sreenivasan, 1989). Os basidiósporos germinam em tecidos de crescimento rápido como o tecido meristemático de gemas vegetativas ou florais, ou frutos jovens induzindo o aparecimento dos sintomas. Durante esta fase, o fungo garante um suprimento de energia vivendo como um parasita intercelular obrigatório ou biotrófico. O fungo nesta fase está caracterizado por apresentar micélio monocariótico sem grampos de conexão.

M. perniciosa tem caráter homotático. Esta natureza autofértil foi observada em estudos citológicos mediante a dicarionização de hifas monocarióticas derivadas de um único basidiósporo (Delgado e Cook, 1976). De oito até doze semanas depois de iniciada a infecção, os tecidos começam um processo de necrose e são colonizados inter e intracelularmente pelas hifas saprofíticas do fungo. Estas hifas são dicarióticas e apresentam grampos de conexão, necessários para a manutenção de dois núcleos por célula (Delgado e Cook, 1976; Evans, 1980). As vassouras necrosadas tornam-se marrons formando as estruturas chamadas de vassouras secas. Depois de um período latente de três a nove meses, as vassouras secas começam a produzir corpos de frutificação (basidiocarpos), completando um ciclo de vida de *M. perniciosa* (Wheeler e Mepsted, 1988; Purdy e Schmidt, 1996).

As hifas no estado biotrófico crescem lentamente no espaço intercelular e são encontradas em baixa densidade (Penman *et al.*, 2000); Silva e Matsuoka, 1999). Durante esta fase, o tecido infectado apresenta aumento da peroxidação lipídica sugerindo ativação do estresse oxidativo (Scarpari *et al.*, 2005). Uma importante contribuição ao estresse oxidativo pode ser a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio produzido pela provável degradação enzimática de cristais de oxalato de cálcio identificados em plantas de cacau suscetíveis e infectadas com *M. perniciosa* (Ceita *et al.*, 2007). No genoma de *M. perniciosa* foram identificados genes que codificam para proteínas secretadas semelhantes a proteínas das famílias das NEPs (necrosis and ethylene inducing proteins) (Garcia *et al.*, 2007), ceratoplataninas (Zaparoli *et al.*, 2009), proteínas relacionadas com patogenicidade (Tomazella et al; 2012; Teixeira et al., 2013) e metanol oxidase (de Oliveira *et al.*, 2012) entre outras, mostrando o arsenal de proteínas que o fungo utiliza durante a colonização dos tecidos do hospedeiro.

Durante a segunda fase, os tecidos vegetais infectados tornam-se necróticos (vassouras secas) e o fungo apresenta um micélio dicariótico saprofítico ou necrotrófico, com grampos de conexão. Contrariamente ao que acontece durante o desenvolvimento biotrófico do fungo, o micélio saprofítico cresce vigorosamente e rapidamente coloniza a vassoura levando à destruição do tecido vegetal (Evans, 1980). Estudos bioquímicos da interação cacau - *M. perniciosa* foram realizados pelo nosso grupo (Scarpari *et al.*, 2005). Foram coletados brotos de cacauzeiros infectados com a vassoura de bruxa representantes dos diferentes estádios do desenvolvimento da doença. Estas amostras foram utilizadas para a análise do conteúdo de açúcares solúveis, aminoácidos, alcalóides, etileno, fenóis, taninos, flavonóides, pigmentos, malondialdeído (MDA), glicerol e ácidos graxos. Os resultados revelaram alterações bioquímicas em plantas infectadas com *M. perniciosa*. Além disso, vassouras verdes apresentaram quantidades significativamente maiores de glicerol quando comparadas com vassouras secas e tecidos não infectados sugerindo que este composto poderia desempenhar um papel fundamental durante a fase biotrófica do fungo *in planta*. Baseado nestes dados, foram testadas várias condições de crescimento do fungo na fase biotrófica utilizando glicerol como única fonte de carbono em culturas axênicas. Este foi um ponto decisivo do projeto já que permitiu resolver um dos principais gargalos encontrados para estudar a fase mais importante do desenvolvimento do fungo. - a fase biotrófica, impossível de se

obter até esse momento já que o fungo imediatamente passava para fase necrotrófica quando em contato com outras fontes de carbono (sorbitol, manitol, frutose, sacarose, glicose, e etanol) (Meinhardt *et al.*, 2006). Esses estudos revelam a complexidade das interações bioquímicas que ocorrem durante a interação cacau – *M. pernicioso* durante o desenvolvimento da doença vassoura de bruxa. Neste contexto, uma questão permanece não elucidada: Quais são as estratégias que *M. pernicioso* utiliza para modular as respostas de defesa da planta? (Rincones *et al.*, 2008).

3. Os hormônios vegetais na interação planta - patógeno

Os hormônios vegetais possuem um papel trófico para as plantas, garantindo o controle e regulação de vários processos essenciais para a vida e sucesso do organismo. Hoje são conhecidos 9 principais classes de hormônios: auxinas, citocininas (CK), giberelinas (GA), etileno (ET), ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ), ácido abscísico (ABA), stringolactone (SL) e brasinosteróides (BL) .

Hormônios vegetais tais como BL, auxinas, CK e GA regulam importantes processos para o desenvolvimento e crescimento da planta ativando uma complexa rede de vias de sinalização (Agrios, 2005). Além disso, existem evidências de que a regulação destas vias de sinalização influencia o resultado da interação planta-patógeno. Por exemplo, está descrito que um receptor quinase em *Arabidopsis thaliana* (SERK3/BAK1) relacionado com a embriogênese somática é necessário para controlar a morte das células infectadas, a produção de ROS e a restrição de infecções biotróficas e necrotróficas (Heese *et al.*, 2007; Kemmerling *et al.*, 2007). Entretanto, estudos sugerem que BAK1 interage com outros receptores de reconhecimento do patógeno para ativar e regular a defesa basal da planta (López *et al.*, 2008).

Evidências experimentais revelam que parte da estratégia de invasão dos patógenos pode ser o estímulo da sinalização da auxina, enquanto a supressão deste hormônio favorece a resistência da planta. Em concordância com esta observação, Chen e colaboradores (2007) mostraram que *P. syringae* pode usar fatores de virulência como AvrRpt2 para aumentar os níveis de auxina durante a infecção em *Arabidopsis* e promover suscetibilidade ao patógeno. Esse mesmo trabalho relaciona o aumento da produção de auxina à supressão das defesas vegetais (Chen *et al.*, 2007) e

à alteração de outros parâmetros fisiológicos da planta que poderiam facilitar a invasão e colonização do patógeno. Como resultado desta estratégia, as plantas têm evoluído desenvolvendo respostas para reprimir a sinalização da auxina como um componente de defesa básica (Robert-Seilanianz *et al.*, 2007). Em recentes estudos de RNA pequenos incluindo os miRNAs, eles são apontados como chaves nas respostas de resistência a doenças em plantas e animais (L. Navarro *et al.*, 2006; H., Jin, 2008; Gibbings e Voinnet, 2010). Navarro e colaboradores (2006) descobriram que o miR393 pode ser induzido por um elicitor bacteriano - flg22 - contribuindo positivamente à imunidade associada a padrões moleculares (PTI) por silenciamento dos receptores da auxina e subsequentemente supressão da sinalização desta. Assim, esta seria uma das formas de regulação das respostas a auxina, mediado em parte pela ativação de microRNAs que reprimem a sinalização deste hormônio (L. Navarro *et al.*, 2006).

Uma resposta de defesa típica de plantas à presença do patógeno é a resposta de hipersensibilidade (HR) (Agrios, 2005). Robinette e Matthysse (1990) demonstraram que a HR produzida pela infiltração de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em tabaco pode ser suprimida se o ponto de infecção for previamente infiltrado com *A. tumefaciens* ou *Pseudomonas*, bactérias capazes de sintetizar auxina. Análise de deleções nas vias de síntese deste hormônio nas referidas cepas bacterianas demonstrou que a produção de auxina é necessária para a supressão da HR (Robinette e Matthysse, 1990). O efeito negativo da auxina na defesa contra patógenos biotróficos também foi demonstrado por Navarro e colaboradores (2006 e 2004). Os autores sugeriram que a repressão da regulação na sinalização da auxina forma parte da resposta imune induzida pela planta e que alguns fatores de resposta à auxina (ARFs) podem atuar como repressores da resistência de plantas a patógenos biotróficos.

Outro papel da auxina na interação planta - bactéria foi determinado mediante o estudo de bactérias epífitas. De fato, a produção de IAA por bactérias aumenta sua “fitness” na superfície das folhas (Brandl e Lindow 1998). Um dos efeitos da auxina produzida pela bactéria é o aumento do dreno de polissacarídeos da planta para ser usados pelo metabolismo bacteriano, permitindo mais disponibilidade de nutrientes para o micróbio (Lindow e Brandl 2003). A auxina também pode ter um efeito direto sobre a virulência do patógeno. Yang e colaboradores (2007) demonstraram que a mutação do gene de síntese de auxina *iaaM* (ASAP16562) em *Erwinia chrysanthemi* 3937 diminui a indução de efetores T3SS e pectato liases, sugerindo um possível

papel da auxina como indutor da virulência. Mais genericamente, a auxina é usada por alguns micróbios como uma molécula de sinalização, e sua produção aumenta a sobrevivência do microrganismo em condições de estresse (Remans *et al.*, 2006).

4. Alteração da sinalização hormonal em hospedeiros infectados por patógenos.

As interações entre as vias da auxina e o ácido salicílico (AS) em *A. thaliana* estão bem documentadas. Conhece-se que alterações na sinalização da auxina são correlacionadas com suscetibilidade a patógenos biotróficos (Navarro *et al.*, 2008). Esta sinalização parece estar relacionada de forma antagônica com o AS, afetando as vias de biossínteses deste hormônio por um mecanismo ainda em estudo (figura 1). Uma das hipóteses é que a estabilização de reguladores negativos das vias de um hormônio estaria sendo regulado pelo outro hormônio (Wang *et al.*, 2007). Quando plantas de *A. thaliana* são tratadas com AS exógeno, os reguladores negativos da auxina são estabilizados indiretamente através da repressão do complexo receptor da auxina TIR1, provocando uma diminuição da sensibilidade à auxina para limitar a ubiquitinação e posterior degradação das proteínas repressoras AUX/IAA (A. Robert-Seilanianantz *et al.*, 2010). Consistente com o antagonismo entre a auxina e AS, foi feito um experimento usando plantas mutantes para a sinalização da auxina no núcleo (*axr1* e *axr2*), interferindo na degradação das proteínas AUX/IAA. Estas plantas foram infetadas com patógenos necrotróficos e foi encontrada uma maior virulência nestas linhagens quando comparadas com a selvagem (Llorente *et al.*, 2008).

A auxina também tem interações com as sinalizações do ácido jasmônico (AJ). Entretanto, os estudos até agora não apresentam um consenso no tipo de correlação existente entre estes dois compostos. Tabata e colaboradores (2010) encontraram que os fatores de regulação da auxina ARF6 e ARF8 promovem a biossínteses do AJ. Reciprocamente, Grunewald e colaboradores (2009) demonstraram que a proteína JAZ1, proteína com domínio ZIM e repressora da sinalização por jasmonato é induzida pela auxina, indicando uma relação positiva entre auxina e AJ. Entretanto, estudos de expressão gênica em *A. thaliana* usando microarranjos demonstraram que o tratamento com auxina reprime as vias de biossíntese do AJ e as respostas

transcricionais iniciais a uma resposta sistêmica à infecção com *Pseudomonas syringae* (Truman *et al.*, 2010).

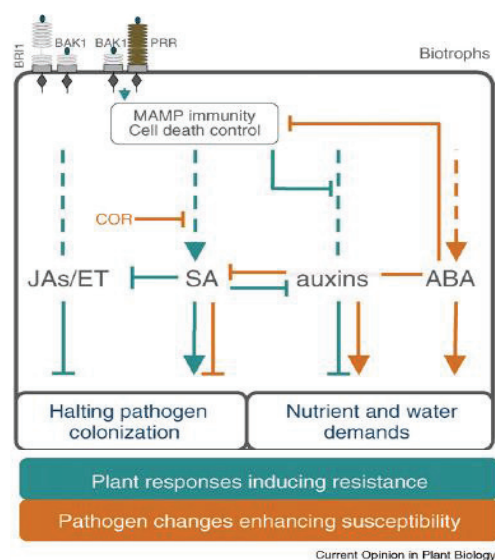


Figura 1. Ações moleculares dos hormônios e vias de sinalizações hormonais durante interações planta – patógenos biotróficos. (López *et al.*, 2008).

Em *A. thaliana* estão descritas quatro vias de síntese da auxina, duas das quais são compartilhadas com vias de produção de compostos antimicrobianos: indol-glucosinolato e camalexina (Morant *et al.*, 2010). Plantas mutantes para estas vias foram testadas em relação à acumulação de auxina. Estes estudos revelaram que os níveis de auxina não mudaram nas plantas deficientes em fitoalexina e/ou camalexina, contrário ao encontrado no mutante do glucosinolato onde a acumulação de auxina foi elevada e os níveis de glucosinolato foram reduzidos. Estes dados sugerem uma correlação negativa entre a biossíntese da auxina e acumulação de glucosinolato (Morant *et al.*, 2010). Uma correlação semelhante foi observada em plantas de *A. thaliana* superexpressando o microRNA miR393. Neste estudo foi verificada supressão da sinalização da auxina e incremento das quantidades de glucosinolato. Além disso, foram identificados dois fatores repressores da auxina - ARF1 e ARF9 - regulando a acumulação de glucosinolato (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Estes dados suportam a hipótese de que a sinalização da auxina é um mecanismo antagonista à biossíntese do antimicrobiano glucosinolato.

Recentemente, pesquisas realizadas na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, têm mostrado especial atenção na conexão entre o estresse oxidativo e a sinalização dos hormônios clássicos.

Estudos de mutantes *cad2* para os genes da tioredoxina redutase (*ntr*) - deficiente na produção de tioredoxina através do *knockout* da biossíntese da glutatona - tem deficiência na capacidade antioxidante resultando na alteração da homeostase da auxina e subsequentemente em alterações no desenvolvimento da planta (Bashandy *et al.*, 2010). Mutantes de *Arabidopsis* no receptor da auxina *tir1/abf* são mais tolerantes ao H₂O₂ e ao estresse salino (Iglesias *et al.*, 2010). Por outro lado, a supressão na sinalização da auxina contribui à tolerância a patógenos via antagonismo com AS (Wang *et al.*, 2007). Em células de *Arabidopsis* tratadas com H₂O₂ diminui a expressão dos genes de resposta à auxina via ativação com a MAP quinase - proteína ativada por mitógeno (Kovtun *et al.*, 1999). Potters e colaboradores (2009) sugeriram que, em geral, plantas submetidas a estresse prolongado sofrem alteração dos padrões de crescimento sendo verificado um crescimento compacto, redução da divisão celular e incrementando no crescimento lateral. Este fenômeno é conhecido como “*stress-induced morphogenic response*” (SIMR) e parece estar regulado pela interação entre ROS e auxina (Blomster *et al.*, 2011). Neste mesmo trabalho, os autores observaram que em *Arabidopsis* existe um rápido e transiente decréscimo na atividade do promotor responsivo à auxina DR5 ao tratamento com ROS sugerindo que a auxina é regulada por ROS de forma tempo dependente. Adicionalmente, foi observado que o O₃ gera alterações na expressão dos genes sinalizadores da auxina e que alguns destes genes, estão também relacionados com respostas a patógenos e à sinalização por ácido salicílico.

a. Produção de hormônios pelos patógenos

Patógenos podem modular a homeostase dos hormônios em plantas mediante (i) a indução das vias de síntese desses compostos no hospedeiro, como descrito anteriormente, e/ou (ii) mediante a produção de hormônios ou análogos destes pelo próprio patógeno. Um dos exemplos mais conhecidos é o caso das bactérias formadoras de galhas, como *P. syringae* pv. *savastanoi* (Robinette e Matthysse, 1990), *Pantoea* (Brandl e Lindow 1998), *Erwinia chrysanthemi* (Yang *et al.*, 2007) e *fascians Rhodococcus* (Vandeputte *et al.*, 2005), que são capazes de produzir auxinas e citocininas. *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes*, são bem conhecidas por produzir elevada quantidade de hormônios em células de plantas transformadas. No entanto, em cada interação, a produção de hormônios é necessária para o estabelecimento da doença (Jameson,

2000). Dados de sequenciamento de genomas de linhagens de *Pseudomonas* permitiram identificar genes semelhantes a genes envolvidos na biossíntese dos hormônios descritos em outros microrganismos (Feil *et al.*, 2005). Valls e colaboradores (2006) demonstraram que *Ralstonia solanacearum* pode também produzir auxinas no meio de cultura e que uma mutação no gene que controla as reações de hipersensibilidade (HrpG) também pode regular a síntese desse hormônio, influenciando na virulência do patógeno. Os patógenos bacterianos não são apenas os únicos agentes capazes de produzir hormônios. *G. fujikuroi*, fungo causador da doença “bakanae” em arroz, produz GA. *Ustilago maydis* (Basse *et al.*, 1996), *Aciculosporium take* (Tanaka *et al.*, 2003), *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp., *Aeschynomene* e o próprio *M. perniciosa* (Kilaru *et al.*, 2007) têm sido descritos como capazes de produzir auxina em experimentos *ex planta*. Curiosamente, *C. gloeosporioides* é capaz de produzir as auxinas *in planta* (Maor *et al.*, 2004).

b. Auxina na vassoura de bruxa

Desde a década de 70 a auxina já tem sido apontada como um fator atuante no desenvolvimento da vassoura de bruxa do cacau. Evans (1980) sugeriu que na doença deveria existir uma fase primária de indução de auxinas responsável por malformações em *T. cacao* tais como hiperplasia e hipertrofia dos tecidos (Dabydeen, 1989; Kilaru e Hasenstein, 2005) facilitando também a colonização do fungo (Prusty *et al.*, 2004). Recentemente, Kilaru e colaboradores (2007) mediram o conteúdo de quatro hormônios vegetais (auxinas, ABA, AJ e AS) em plântulas de cacau infectadas com *M. perniciosa*. Os resultados obtidos *in planta* mostraram que os níveis de ABA e AJ não mudam com a infecção enquanto que os níveis de auxina aumentaram consideravelmente 10 dias após a inoculação do fungo. Estes estudos sugerem que o aumento de auxina nos tecidos de cacau infectados com *M. perniciosa* pode ser uma resposta da planta à presença do patógeno ou devido à produção deste hormônio pelo próprio fungo (Kilaru *et al.*, 2007). Os níveis de AS também aumentaram em estádios avançados da doença, como é esperado já que se trata de um composto capaz de ser induzido por resistência sistêmica adquirida (Chaves e Gianfagna, 2006). As respostas descritas ativam mecanismos de resistência a patógenos biotróficos, mas conferem suscetibilidade a patógenos necrotróficos

(Robert-Seilanianantz *et al.*, 2007). No trabalho de Kilaru e Hasenstein (2005) é sugerido que *M. pernicioso* é capaz de produzir auxina em altas concentrações em basidiomas do fungo. Interessantemente, *Aciculosporium take*, causador da vassoura de bruxa do bambu, caracterizada pela formação de folhas anãs, brotamento lateral e alongamento do caule, é capaz de produzir IAA *in vitro* (Tanaka *et al.*, 2003).

c. Auxina durante as interações planta – micróbio.

O estado da arte sobre o papel da auxina nas interações planta – micróbios foi objeto de um capítulo do livro “Auxins: Structures, Biosynthesis and Functions” da editora NOVA publishers em 2012 (https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=29135&osCsid=). O capítulo intitulado “*The roles of auxin during plant-microbe interactions*” foi escrito sob a autoria de Javier Correa Alvarez, Marcos Henrique de Moraes, Odalys Garcia Cabrera, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e Jorge Maurício Costa Mondego. O resumo deste capítulo é apresentado a seguir:

Entre todos os fitormônios, auxina é provavelmente aquela que desempenha maior número de funções na fisiologia da planta. Com uma rede gênica e uma via de biossíntese complexa, a cascata de sinalização de auxina é capaz de ditar diferentes atividades, tais como o crescimento da planta e a resposta contra um potencial agente patogênico. Tem sido amplamente documentado que alguns microrganismos são capazes de sintetizar este hormônio, especialmente indol-3-acéticoácido (IAA), a auxina mais comumente produzida em plantas. Num cenário ambiental onde bactérias e fungos interagem com as plantas, a produção de auxina por tais microrganismos pode levar a desequilíbrios hormonais no hospedeiro. Esse estado de desarranjo hormonal da planta pode modular o metabolismo e as respostas de defesa, favorecendo as relações de simbiose ou patogênese. Novas evidências sobre os mecanismos pelos quais os micróbios afetam as atividades de auxina de plantas são foco de estudo na biologia das plantas. Esta revisão centra-se nos efeitos de auxinas produzidas por microrganismos durante interações planta-micróbio. Vias da biossíntese de auxina de bactérias e fungos são descritos para alguns organismos. São exemplificados também os efeitos da auxina produzida por micróbios em

eventos simbióticos e patogênicos, e de como as plantas modulam a sinalização do IAA para neutralizar a infecção de patógenos biotróficos.

OBJETIVO GERAL

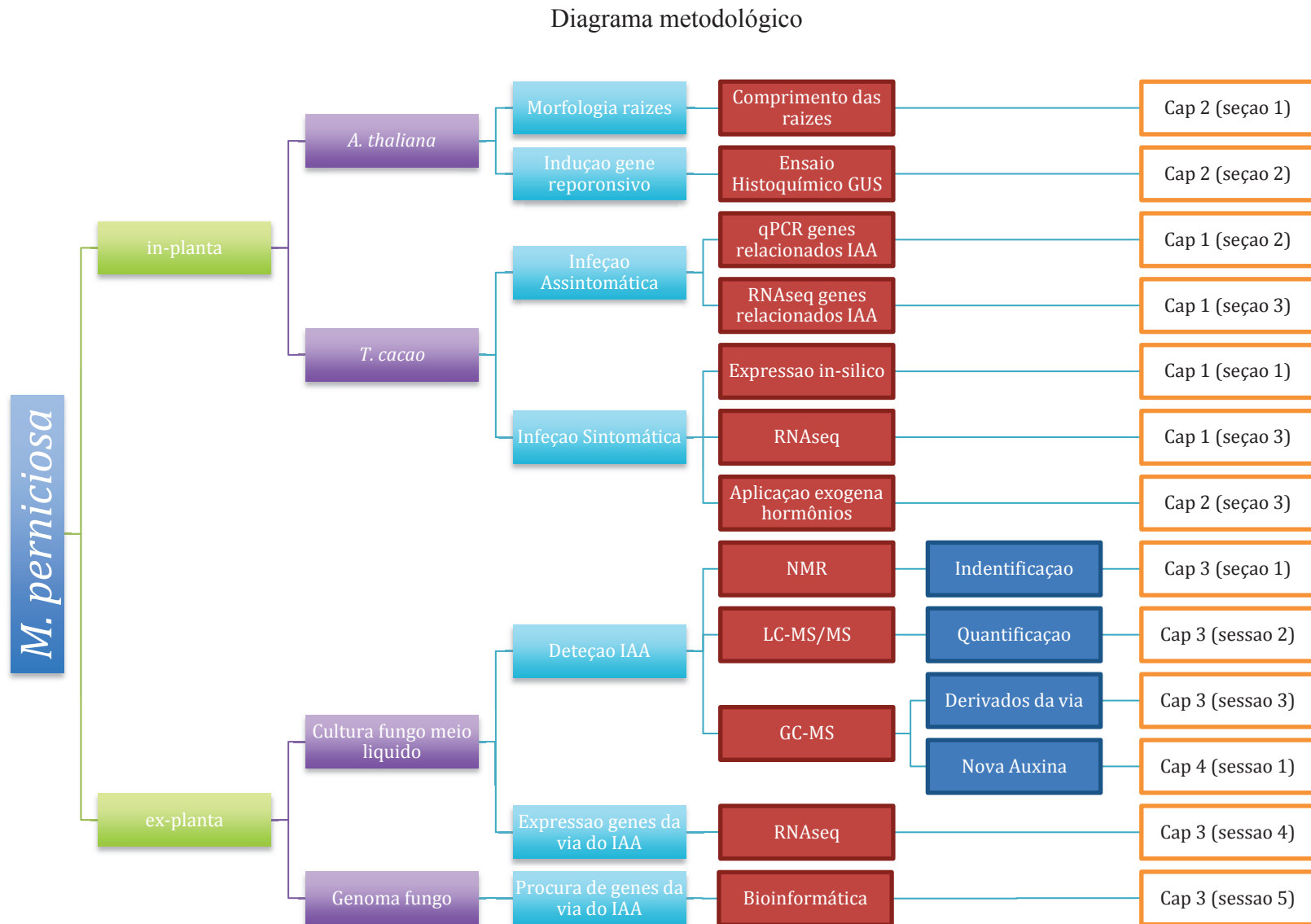
Atualmente os hormônios vegetais são tema de grande interesse no estudo das interações planta – patógeno, pois a modulação das vias de sinalização hormonal em plantas contribui diretamente com as respostas de defesa. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi:

Estudar os mecanismos de supressão da resposta de defesa basal do cacaueiro, mediada pela auxina, responsáveis pela invasão de *M. pernicioso* na planta e o estabelecimento da sua fase biotrófica.

Para cumprir esse abrangente objetivo o trabalho foi dividido em objetivos específicos:

- I. Analisar a expressão de genes relacionados com a resposta à auxina no cacaueiro durante uma interação compatível inicial com *M. pernicioso*.
- II. Determinar o efeito *in-planta* de compostos secretados pelo fungo *M. pernicioso*.
- III. Identificar e quantificar os metabolitos relacionados com auxina produzidos por *M. pernicioso*.
- IV. Análise dos efeitos *in planta* de um composto produzido por *M. pernicioso*, diferente estruturalmente do IAA, mas com função semelhante a este hormônio (*auxin-like*).

Este trabalho foi dividido em capítulos referentes a cada um dos objetivos específicos. A abordagem metodológica aparece esquematizada no seguinte diagrama de fluxo para facilitar o entendimento do trabalho.



CAPITULO I

Objetivo I: Analise da expressão de genes relacionados com a resposta à auxina no cacauero durante uma interação compatível inicial com *M. perniciosa*.

Para cumprir este objetivo o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

1. Análise *in-silico* da expressão de genes de resposta à auxina durante as interações compatíveis e incompatíveis cacau - *M. perniciosa* em meristemas da planta.
2. Crescimento e infecção de plantas de cacauero em casa de vegetação para análise de expressão gênica durante a fase assintomática da vassoura de bruxa.
3. Padronização do PCR em tempo real para genes de cacau relacionados com a resposta a hormônios.
4. PCR semi – quantitativa de genes relacionados com hormônios em tecidos infectados com *M. perniciosa*.
5. Validação de amostras infectadas usando qPCR
6. Quantificação relativa de genes relacionados com hormônios
7. Sequenciamento da fase assintomática da vassoura de bruxa usando RNAseq da Illumina

A seguir se apresenta uma descrição da metodologia, resultados e discussão associada ao desenvolvimento de cada uma destas etapas.

1. Análise *in-silico* da expressão de genes de resposta à auxina durante as interações compatíveis e incompatíveis cacau - *M. pernicioso* em meristemas da planta.

É conhecido que estímulos bióticos e abióticos geram perfis de expressão gênica característicos em cada organismo resultantes da indução de genes responsáveis pelas respostas a esses estímulos (Volodarsky *et al.*, 2009). Uma via para determinar a capacidade indutora de resposta de um determinado estímulo biótico em um organismo assim como os genes responsáveis por essa resposta é a comparação do seu perfil de expressão com o perfil de um organismo modelo submetido ao mesmo estímulo. Esta abordagem foi utilizada no presente trabalho para estudar a papel da auxina na interação *M. pernicioso* – cacau utilizando como organismo modelo *A. thaliana*.

Metodologia

Os dados de expressão gênica utilizados nestes estudos foram extraídos de duas bases de dados públicas: (i), dados de expressão gênica (*microarranjos*) de *A. thaliana* (TAIR) induzida com auxina (IAA) em cultura líquida em função do tempo (http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=expression_set&id=1007965859); e (ii) base de dados de cacau que foi extraída dos dados de expressão eletrônica da biblioteca de meristemas compatíveis e incompatíveis infectados com *M. pernicioso* do projeto cacau (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cacau/>). Os dados de expressão extraídos desta base, para as variedades resistente e susceptível, estão disponíveis na aba <Norther> no material online em <http://www.lge.ibi.unicamp.br/~jcalvarez/dataexpressioncacaoarabi.xlsx>

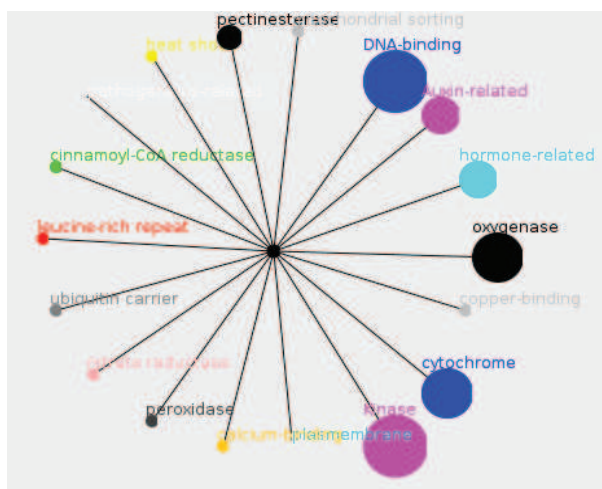
Primeiramente foram identificados os genes que foram induzidos por auxina na biblioteca de *A. thaliana* tratada com este hormônio (p-value < 0.01, as identidades e os valores de expressão estão disponíveis no material online, aba <MicroArabi>) quando foram comparados com um controle sem indução. Os genes selecionados foram utilizados para a identificação dos homólogos nas bibliotecas de interação *M. pernicioso* – cacau susceptível e resistente a traves do algoritmo tBlastX (aba <TblastX> na planilha de Excel). As sequencias que apresentaram um valor de significância inferior ao valor do erro 10^{-20} (*e-value*) e identidade >50% foram anotadas

com a identidade do banco referência, neste caso TAIR. Posteriormente, as sequências de nucleotídeos destes genes foram traduzidas em peptídeos com o programa FrameDP e finalmente, os peptídeos foram agrupados por famílias de proteínas usando o algoritmo TribeMCL (ver planilha online, aba <CacaoExp>). Para cada um dos genes codificadores destas proteínas foi extraído o valor de expressão gênica *in silico* dado pelo número de transcritos presente em cada uma das bibliotecas (planilha online, aba <Plan1>). Com estes resultados foram diagramados em grupos de expressão representados na figura 2. Cada grupo representa uma família gênica e o diâmetro do grupo representa o número de transcritos dos genes dessa família nas variedades resistente e susceptível infectadas com *M. perniciosa* (Mais informação do *pipeline* e das famílias de proteínas encontradas, ver Anexo 1).

Resultados e discussão

As análises realizadas resultaram na formação de grupos de expressão representados na figura 2. Cada grupo representa uma família gênica e o diâmetro do grupo representa o número de transcritos dos genes dessa família nas variedades resistente e suscetível infectadas com *M. perniciosa* (Anexo 1).

A. Variedade Resistente



B. Variedade Suscetível

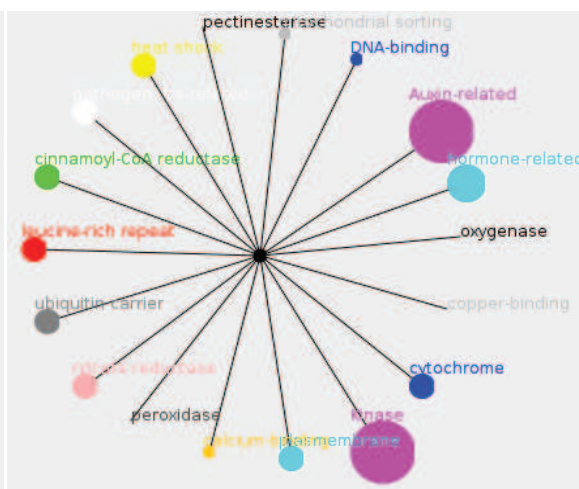


Figura 2. Comparação de famílias de genes induzidos pela auxina entre as bibliotecas de meristemas infectados com esporos de *M. perniciosa*

Legenda: O diâmetro dos círculos representa o número de genes no grupo.

Esta abordagem permitiu identificar nas bibliotecas de interação *M. pernicioso* – cacau, o 50% (1084) das 2157 sequências diferencialmente expressas em *A. thaliana* em presença de auxina exógena. A análise destes genes revelou que um número considerável (24 genes) está relacionado com genes codificando proteínas envolvidas na síntese, percepção nuclear, transporte e metabolismo de diferentes hormônios como auxinas, ET, CK, GA, AJ, AS (Anexo 1).

Os resultados mostram um predomínio daqueles genes que codificam proteínas relacionadas diretamente com a auxina (9 proteínas). Este resultado sugere uma intercomunicação entre as vias de sinalização destes hormônios, provavelmente desencadeada pela auxina. A figura 2 resume as famílias de proteínas mais representadas considerando o número de membros encontrado; o diâmetro do círculo, refere-se ao número de proteínas agrupadas em cada família nas variedades resistente (em A) e suscetível (em B). Estes resultados mostram claramente que na interação compatível (susceptibilidade) *M. pernicioso* – cacau foi identificado um maior número de genes (proteínas) relacionado com a resposta a auxina. Esta resposta inicial poderia estar relacionada com aumento da susceptibilidade da planta ao patógeno como foi argumentado na introdução. É interessante observar que na planta resistente ocorreu um aumento do número de fatores de transcrição (DNA-binding) que poderiam estar envolvidos no aumento dos níveis de fotossíntese, reforço da parede celular, e detoxificação celular (da Hora Junior *et al.*, 2012). Respostas semelhantes foram observadas em trabalhos recentes realizados no LGE utilizando tecnologias de sequenciamento de última geração (RNaseq). Estes resultados serão publicados em breve.

Dos resultados obtidos durante o desenvolvimento desta etapa do trabalho pode-se concluir que a auxina poderia ter um papel chave na susceptibilidade do cacau ao patógeno *M. pernicioso* mediante (i) a sua intercomunicação com outros hormônios, como por exemplo, o ácido salicílico, um hormônio antagonista que evita a progressão de patógenos biotróficos, e (ii) através da indução - em resposta ao patógeno - de vias metabólicas de importância fisiológica. Devido à natureza destes dados, não é possível até este momento falar de genes específicos que estariam envolvidos na intercomunicação entre as vias, a resposta foi avaliada a nível global. Assim, com o objetivo de identificar especificamente estes genes e suas inter-relações durante a fase inicial da infecção, foram desenhados os seguintes experimentos.

2. Crescimento e infecção de plantas de cacauero em casa de vegetação para análise de expressão gênica durante a fase assintomática da vassoura de bruxa.

Desde 2009 vários trabalhos no LGE foram desenvolvidos com o intuito de estudar o transcriptoma de *M. pernicioso* durante a progressão da doença vassoura de bruxa. Entretanto, a fase inicial e assintomática da doença não tinha sido analisada. Uma vez que os nossos resultados de análise de expressão (seção anterior) apontam a auxina como um fator que influencia a suscetibilidade do cacau ao patógeno torna-se fundamental o estudo da fase inicial da doença. Para isso foi estruturada uma casa de vegetação próxima ao LGE onde foram mantidas plântulas de cacau.

Metodologia

Frutos de cacauero da variedade comum foram obtidos da fazenda Porto Novo, Ilhéus, Bahia, Brasil. Todos os frutos usados foram provenientes da mesma planta (S 14°48.099'; W 039°06.101'). As sementes foram crescidas em sacos plásticos numa mistura 3:1 de terra adubada e vermiculita. A temperatura e umidade foram mantidas constantes (26 ± 2 °C, $80 \pm 10\%$ HR) na casa de vegetação instalada com recursos do projeto temático FAPESP 2009/50119-9. As plântulas que cresceram assincronicamente e com malformações foram descartadas. Mas de 300 plântulas com crescimento uniforme foram utilizadas para as infecções e para controles de suscetibilidade. Na figura 3 são apresentadas as plântulas usadas para o experimento de infecção em condições controladas.



Figura 3. Plântulas de cacau variedade comum com quatro semanas de idade, crescidas em casa de vegetação e sincronizadas antes de serem infectadas.

Os meristemas apicais das plantas sincronizadas foram cortados com um estilete estéril para induzir o brotamento de novos meristemas (figura 4.6). Estes meristemas foram infectados usando esporos do fungo *M. pernicioso*. Para a obtenção destes esporos, cogumelos de *M. pernicioso* foram induzidos depois de duas semanas de crescimento num meio artificial adequado seguindo o procedimento padronizado por Kilaru e Hasenstein (2005) (figura 4.1). Os esporos foram coletados numa solução de glicerol – PVP - EDTA estéril durante 12 horas. Posteriormente os esporos foram quantificados na câmara de Neubauer e diluídos para uma concentração final de 10^6 esporos / mL (figura 4.2). Antes de prosseguir à inoculação das plantas de cacau, foi realizado um teste de viabilidade de germinação desses esporos usando o corante Azul de Metileno (figura 4.3). As plantas com brotamento de novos meristemas apicais foram colocadas em câmara de umidade durante 24 horas antes da inoculação. Após este tempo foram aplicados 20 μ L da suspensão de esporos em cada plântula e 20 μ L do tampão de suspensão para as plântulas controles (figura 4.6). As plântulas infectadas foram colocadas de volta em câmara de umidade durante 24 horas (figura 4.5). As amostras foram coletadas nos tempos exatos pós-inoculação (6, 12, 24, 48, 96 horas, 8 dias, 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias), cortando com um estilete estéril o meristema completo junto com os primórdios foliares e colocados imediatamente

em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA. Três plântulas de cacau por tratamento foram inoculadas, deixando a terceira réplica como controle da infecção. Estas plântulas foram acompanhadas e fotografadas no desenvolvimento dos sintomas das plantas.

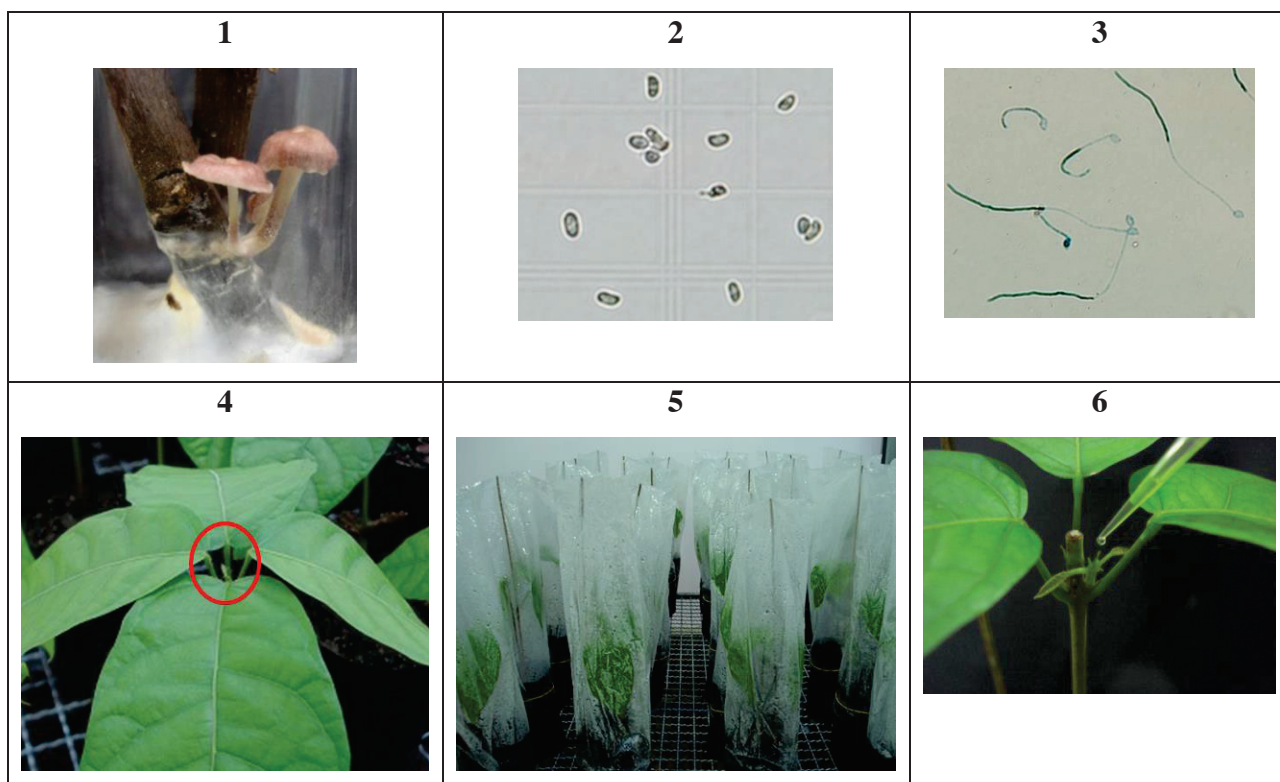


Figura 4. Procedimento de infecção e coleta de meristemas em condições controladas em casa de vegetação.

Legenda: (1). Cogumelo de *M. perniciosa*, (2). Esporos coletados e quantificados em solução com glicerol, (3). Teste de germinação de esporos previa infecção, (4). Corte e brotamento do meristema apical em plântulas crescidas em casa de vegetação, (5). câmara de humidade antes e depois inoculação, (6). Inoculação dos meristemas.

Resultados e discussão

A figura 5 apresenta o acompanhamento da progressão da doença vassoura de bruxa de uma planta utilizada no experimento começando no 4^{to} dias após infecção (superior esquerdo), 8 dias, 15 dias, 30 dias, 45 dias e 60 dias. Esta planta é representativa de todas as plantas infectadas no experimento. Pode-se observar que antes dos 15 dias as plantas infectadas não apresentam sintomas da doença da vassoura de bruxa, que é precisamente o estágio assintomático da doença. Os sinais de hiperplasia e hipertrofia começam aparecer 15 dias após a inoculação (vassoura verde); a necrose das folhas se inicia após 30 dias e constitui a fase referida como necrose 1 (SI); e finalmente acontece a necrose do caule após 60 dias de iniciada a infecção e é a fase referida

como necrose 2 (SII). A vassoura seca aparece em um tempo superior a 90 dias, referida como necrose 3 (SIII).

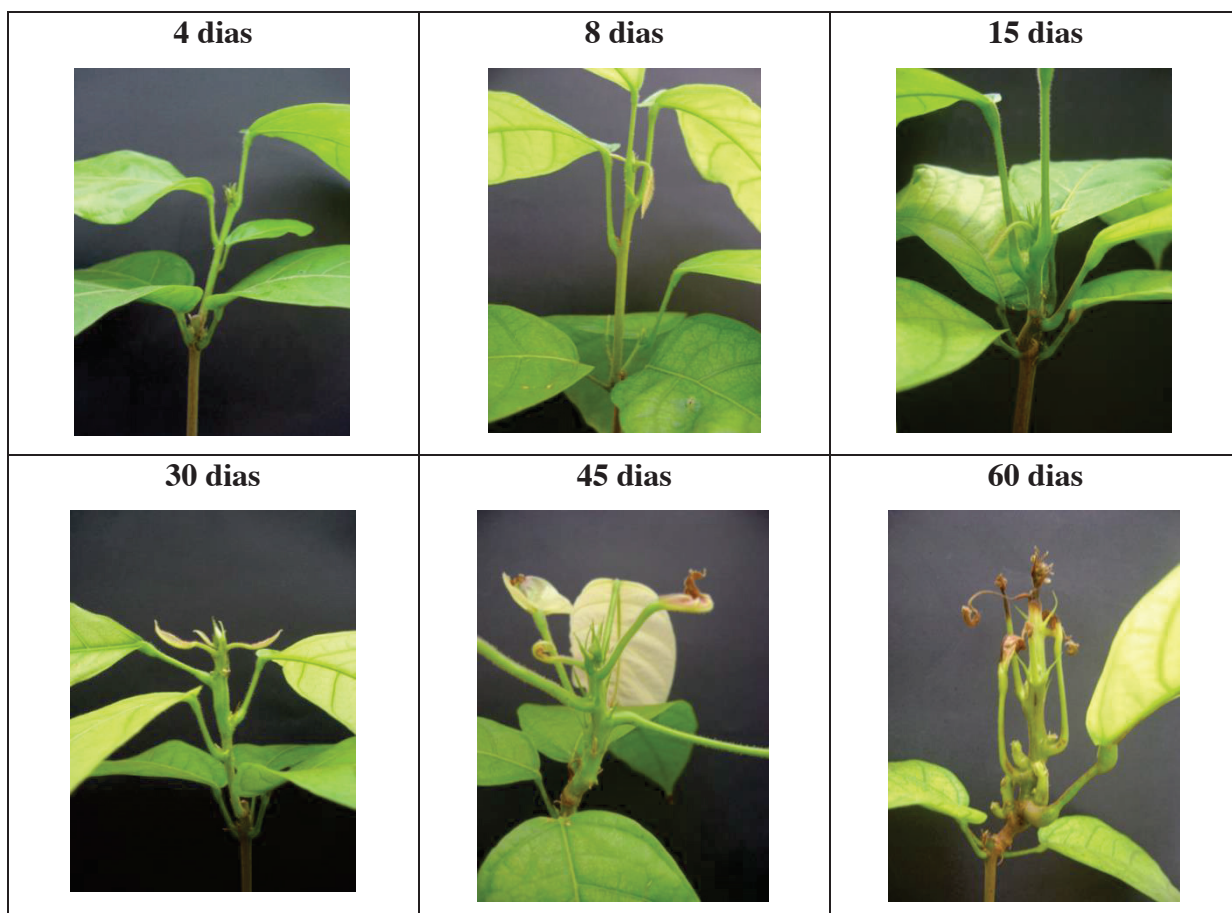


Figura 5. Progressão dos sintomas da vassoura de bruxa obtida mediante a inoculação de plântula de cacau com esporos de *M. perniciosa* em casa de vegetação.

As amostras de meristemas infectados e seus respectivos controles foram coletadas em cada ponto e imediatamente guardadas a -80 °C para uma posterior extração de RNA total.

3. Padronização do PCR em tempo real para genes de cacau relacionados com a resposta a hormônios.

Com o objetivo de analisar a expressão de genes relacionados com a resposta à auxina durante a progressão da doença vassoura de bruxa, as amostras coletadas na seção 2 foram processadas para a obtenção do RNA e posteriores ensaios de PCR em Tempo Real (qPCR).

Metodologia

Amostras dos meristemas das plantas infetadas e seus respectivos controles foram maceradas e o RNA extraído partindo de 45 mg de material vegetal em um tubo de 2 mL. O protocolo seguido foi padronizado no LGE usando a metodologia do CTAB com algumas modificações e cloreto de lítio para a precipitação do RNA total (Barau *et al*, em preparação para publicação). O RNA em gel de agarose desnaturante apresentou uma ótima integridade. Foram gerados os cDNAs usando o protocolo da SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA).

A seleção de genes alvo (genes da planta responsivos a hormônios) foi realizada a partir da procura de sequências de genes anotados e referenciados na literatura, na base de dados da planta modelo *Arabidopsis* (TAIR; <http://www.arabidopsis.org>). Posteriormente, as sequências de nucleotídeos da referência foram *blasteadas* nas bibliotecas de ESTs de cacau (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cacau/>), usando o algoritmo tblasx. Os alinhamentos que apresentaram uma identidade >70% foram anotados com a função putativa do banco de referência. Destas sequências foram desenhados nove pares de oligonucleotídeos utilizando o programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) e validados pelo programa Primer-Blast (GenBank). Os oligonucleotídeos foram desenhados flanqueando regiões intrônicas a fim de detectar possíveis contaminações com DNA genômico. Entre os nove genes selecionados, dois são genes *housekeepings*, estes genes encontrados nas bibliotecas de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) sendo expressos em iguais proporções tanto na condição infectada como no controle e para as duas variedades de cacau: Proteína ribossomal L22 (Fw: 5'CCTCTGACGCCAACTTTTCT3', Rv: 5'GATCCTTGTTGGAAGCAATCAC3'); e o gene da alfa tubulina 2 (Fw:5' CCTTGACAATGAGGCTATCTAT, Rv: AGAGATGACTGGAGCATAAGAG3'). Os sete genes restantes estão envolvidos com a sinalização de hormônios. A tabela 1 apresenta os pares de oligonucleotídeos desenhados para a amplificação desses genes.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação por qPCR de genes relacionados com hormônios.

Gene	Sequências dos oligonucleotídeos 5' - 3'	Alvo e função
IAA1	F GAATTGCTCAAGGCCCTA R TGTATCCTTCCCTCTCTGAA	Aux/IAA gene Codifica para a principal proteína de resposta à auxina, regula a transcrição de outros genes como os ARFs,
TIR1	F AAGGGTTCTCAACTGATGGACT R TGTGTACGTCTCAGGAAAATGG	<i>Transport Inhibitor Response</i> Principal componente do complexo de ubiquitinação E3, regula os genes IAA em presença de altas concentrações de auxina.
ARF8	F AAGGGACTTGCCTGATAATG R ACAAATACACTCCATCCAGTTG	<i>Auxin response factor</i> Fator de resposta à auxina, fator de transcrição, une-se aos elementos de resposta à auxina e interage com a RNA polimerase, envolvido no desenvolvimento floral e do fruto.
AAO1	F TGTCGAAATCTTGAACAGTGGA R TATAGCTGCCCTTGTAGCACAG	Indo-3-acetaldeído oxidase, última enzima da via de síntese da auxina.
ACC	F TGGTACAAGGATGTCTATTGCT R GGATGTCTCAGCTTCTTTCTC	Ácido carboxílico aminociclopropano oxidase, última enzima envolvida na síntese do etileno.
EFR2	F AGAGAGTGATGAGTTTGTGGAG R ATTGTCTTCAATAGGCGTAACA	Fator de resposta a etileno.
WRKY	F GGGCAGAAGGTGGTGAAGGG R TGGCATCTCGTGGTTATG	Fator de transcrição regulador da resposta a ácido salicílico, união ao DNA.

Os ensaios de qPCR foram realizados no equipamento StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA) usando SYB®green (Invitrogen, CA). As amostras foram amplificadas em triplicata e com duas réplicas biológicas. Foi realizada a amplificação dos fragmentos seguindo o programa: 1 ciclo de 95 °C por 10'; 40 ciclos: 94 °C por 30'', 55 °C por 30'', 60 °C por 30''. Posteriormente foram avaliadas as curvas de *Melting* para cada fragmento amplificado seguindo o programa 95 °C por 15''; 60 °C por 1', 95 °C por 15''. A corrida incluiu controles negativos da PCR (sem cDNA). A eficiência da amplificação de cada um dos genes *housekeeping*s foi determinada previamente mediante a confecção de uma curva padrão usando

três diluições seriadas do cDNA (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). A análise dos dados foi efetuada com o software REST (Corbett, Alemanha) considerando os valores do ciclo linear (Ct; *Cycle threshold*) e a eficiência da PCR (E). A média do Ct foi utilizada para determinar as diferenças de expressão utilizando as referências internas e a diferença com o controle sem tratamento, segundo a equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Resultados e discussão

A figura 6 apresenta os resultados da padronização da reação de RT-PCR. O gel de agarose mostra claramente que os oligonucleotídeos desenhados não geram amplificações inespecíficas e que são capazes de diferenciar os fragmentos contendo íntrons daqueles que não possuem. Esta observação permite garantir que os genes foram amplificados a partir de RNA não contaminado com DNA genômico.

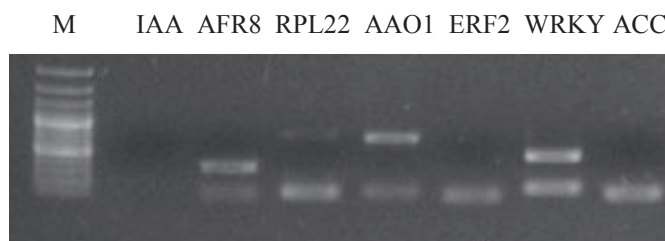


Figura 6. Amplificação dos genes envolvidos com hormônios, usando cDNA contaminado com DNA genômico

Legenda: Fragmentos contendo íntrons apresentam uma banda de maior tamanho comparado com amplificações de cDNA não contaminados. Leader 100 pb (M).

4. PCR semi – quantitativa de genes relacionados com hormônios em tecidos infectados com *M. pernicioso*.

Primeiramente decidimos analisar os efeitos dos esporos do fungo na expressão dos genes relacionados com a auxina na planta durante a fase inicial da doença mediante PCR semi-quantitativa. Para isso, RNAs de plantas infetadas (*pool* de amostra de 2, 4 e 8 horas após-infecção) foram isolados, sintetizados os respectivos cDNAs e amplificados com os oligonucleotídeos apresentados na tabela 1 seguindo a metodologia da seção anterior.

Resultados e discussão

Os resultados sugerem que houve inibição da expressão dos genes envolvidos com a síntese e regulação da auxina (figura 7). Em princípio, estes resultados parecem não apoiar a nossa hipótese de que a auxina estaria em altos níveis durante esta fase inicial da interação compatível cacau - *M. perniciosa*, influenciando na expressão dos genes responsivos a este hormônio. Se os níveis de auxina nos tecidos infectados estivessem aumentados era de se esperar que os genes de resposta à auxina (ARF8) estivessem ligados e o receptor de auxina (TIR1) estaria sobre-expresso; entretanto isso não é o que mostram os nossos resultados (figura 7). Além disso, é interessante observar que o gene do cacau relacionado com a síntese da auxina (AAO1) aparece desligado sugerindo que não há indução da síntese de auxina pela planta durante a fase inicial da infecção. Uma possível explicação seria a existência na planta, de um mecanismo de regulação negativa dos genes de produção de auxina e que este mecanismo é estimulado pela presença do patógeno. Análises de expressão de genes de resposta a etileno e ao ácido salicílico (WRKY) mostram que estes genes permanecem inalterados durante a fase inicial da doença, sugerindo que a planta ainda não estaria reagindo ao patógeno com a produção de etileno e AS. A síntese destes hormônios de defesa poderia ser regulada em fases mais avançadas da doença, como já foi documentado em pesquisas prévias (Scarpari *et al.*, 2005; Kilaru *et al.*, 2007).

Posteriormente, passamos à validação desses resultados por dois métodos (i) qPCR e (ii) o sequenciamento do RNA (RNAseq) de amostras que representam um *time course* mais amplo da doença.

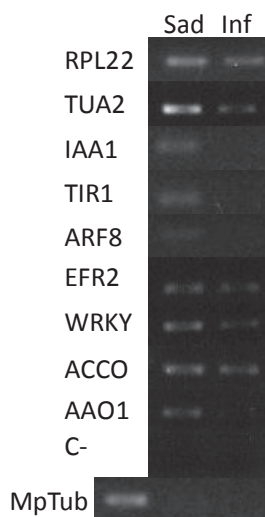


Figura 7. PCR semi-quantitativa de genes envolvidos nas vias hormonais durante interação compatível com *M. pernicioso*. Legenda: Sad; sadia, Inf; *pool* infectado 2, 4 e 8 horas depois da infecção. MpTub, gene da tubulina do fungo com controle de amplificação à direita.

5. Validação de amostras infectadas usando qPCR

Amostras de meristemas de cacau infectadas com *M. pernicioso* foram coletadas em diversos pontos representativos da progressão da doença vassoura de bruxa (seção 2 deste capítulo). Essas amostras foram levadas em gelo seco para a Universidade de Carolina do Norte em Chapel Hill, para ser validadas e sequenciadas por RNAseq no laboratório de *High Throughput Sequencing Facility*.

Metodologia

Análises qualitativas das amostras indicaram a presença de quantidades elevadas de polissacarídeos que poderiam afetar a reação de sequenciamento (figura 8A). Para resolver esse problema as amostras foram purificadas usando o kit RNeasy minelute (Qiagen, CA, USA). Após a purificação as amostras apresentaram ótima integridade no Bioanalyzer (BioRad, PA, USA), com valores de RQI (R Quality) superiores a 8, segundo mostram as figuras 8B e 9.

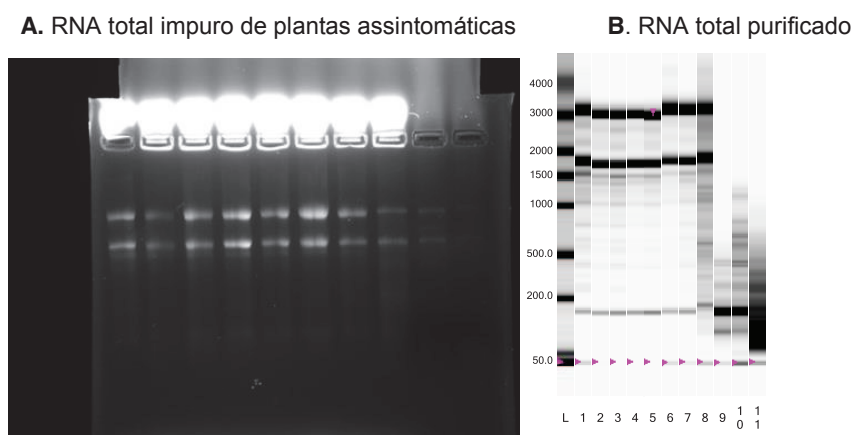


Figura 8. RNA total de alguns das amostras da fase assintomática.

Legenda: Em A, gel de agarose desnatante 0.8%. Em B, gel digital do Bioanalyzer, coluna 9 e 10 sem purificação, coluna 11 amostra degradada.

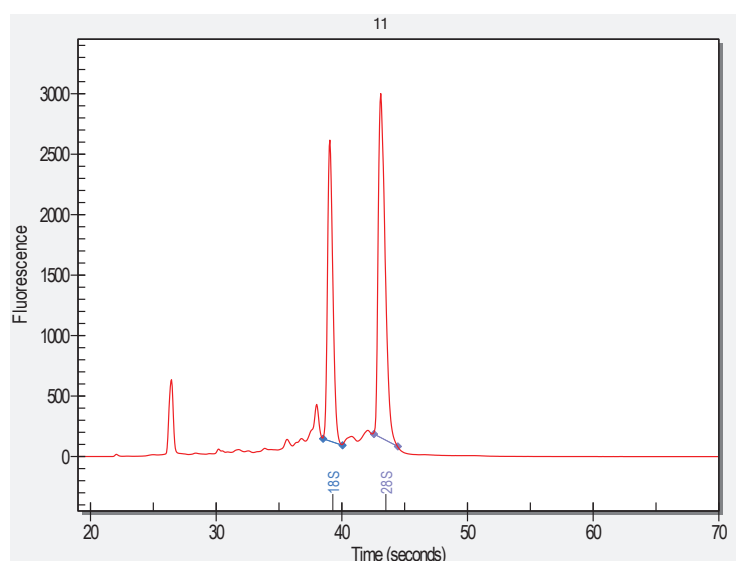


Figura 9. RNA ribossomal indicando ótima qualidade do RNA total com valores de RQI superiores a 8.0.

Uma vez contando com RNA de boa qualidade passamos à síntese do cDNA. A transcrição reversa foi feita com 1 µg de RNA total, oligonucleotídeos randômicos e o procedimento padrão da *Superscript II* (Invitrogen) para gerar a primeira fita de DNA complementar. As amostras de cDNA foram utilizadas para análise de expressão gênica por qPCR e por sequenciamento de RNA (RNAseq).

Os oligonucleotídeos usados nos experimentos de qPCR foram previamente testados através de PCR convencional (seção 4 deste capítulo). Para os experimentos de quantificação

foram confeccionadas duas curvas padrão a partir de amostras de DNA genômico de concentrações conhecidas: (i) DNA genômico de *M. pernicioso* - linhagem CP02, a mesma linhagem usada para os experimentos de infecção de plântulas de cacau e para o sequenciamento do genoma do fungo; (ii) DNA genômico de cacau variedade comum. Para a construção das curvas padrões, ambos os DNAs foram quantificados usando Qubit (Invitrogen, CA) e posteriormente foram feitas 4 diluições seriadas (fator de diluição 1:10) para um total de 5 pontos em cada curva.

Para as reações de quantificação dos cDNAs foram utilizadas as seguintes condições: 1 µL de cDNA, 200 nM de oligonucleotídeos e 10 µL SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, PA). Os gráficos de amplificação, curvas *Melting*, estimativa da eficiência da reação, dentre outras análises foram feitas usando o software StepOne V2.1 da Applied Biosystem. Os níveis de expressão relativa dos genes em estudo foram estimados em relação aos genes referência do cacau (gene da tubulina A - tcTUA) e do fungo (gene da tubulina B -mpTUB- e gene da actina - mpACT) usando a equação de abundância do $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Foram corridas três replicas experimentais, duas replicas biológicas por cada tratamento e controles, além dos controles negativos em cada placa de reação. As médias das razões entre as replicas biológicas foi usada para determinar o *fold change* entre os níveis dos transcritos do tratamento comparado com o controle correspondente.

As amostras dos pontos de infecção representativos da fase inicial da doença vassoura de bruxa (6, 12, 24, 48 horas após a infecção) e seus respectivos controles foram amplificadas com os oligonucleotídeos dos genes de referência do fungo, mpACT e mpTUB. Na mesma placa de reação foi colocada a curva padrão confeccionada com DNA de *M. pernicioso*. A quantificação das amostras foi realizada em relação ao Ct de cada amostra. Brevemente, numa PCR em tempo real uma reação positiva é detectada pelo acúmulo do sinal de fluorescência. Ct é definido então como o número de ciclos requerido para obter um sinal de fluorescência superior aos níveis de fluorescência do *background*. O Ct de cada amostra foi validado com a Tm (*melting temperature*) da curva para cada fragmento amplificado (*amplicon*).

Resultados e discussão

A figura 10 apresenta as curvas padrões obtidas para os dois genes referências do fungo, actina (com pendente “*slope*” = -3,35) e tubulina (-3,72). As curvas apresentam diferentes equações da reta, devido á eficiência na reação para cada gene. Assim foi escolhida a actina como gene de referência por ter um *slope* adequado ($-3.6 \geq \text{slope} \geq -3.3$). Pose-se observar que em geral as quantidades de *amplicon* nas amostras da fase inicial da infecção (pontos azuis) são baixas já que estão próximas do último ponto da curva padrão com 0.025 ng. Interessantemente, as amostras coletadas 6 e 12 horas após a infecção apresentam menos quantidade do gene mpACT sendo expresso (0.003 ng e 0.008 ng, respectivamente) quando comparado com as amostras coletadas 24 e 48 horas após a infecção (0.04 ng e 0.07 ng, respectivamente). Os controles não infectados apresentaram quantidades muito baixas de amplificado, com valores de $C_t > 35$ e curvas de T_m diferentes dos Padrões em correspondência com o fato de que estas amostras não foram infectadas. Curiosamente, uma amostra de 12 horas que representa uma réplica biológica infectada, apresentou quantidades do *amplicon* próximas dos controles, sugerindo que mesmo após a inoculação dos esporos do fungo, esta amostra provavelmente não estaria infectada.

As amostras de pontos mais tardios de infecção, foram validadas com o mesmo oligonucleotídeos de mpACT e com as curvas de *Melting*. Na figura 11 observamos as curvas de amplificação de amostras de diferentes tempos de infecção (>48 horas) com valores do C_t entre 28 e 18, sugerindo que as amostras apresentam expressão do gene do fungo em quantidades superiores aos pontos analisados anteriormente. As curvas vermelhas com um $C_t > 30$ correspondem aos controles não infectados, isso devido ao *background* inato da amostra.

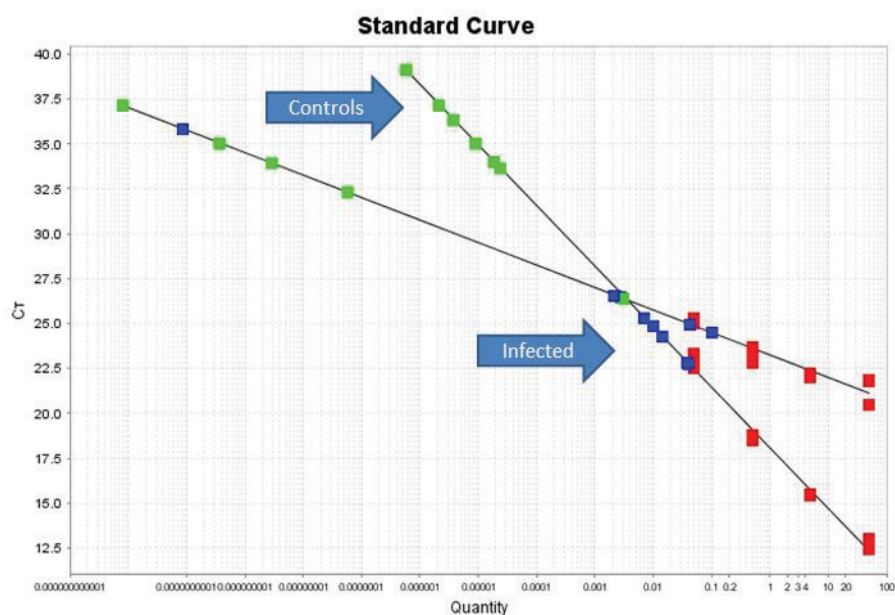


Figura 10. Quantificação de genes de fungo em amostras de meristemas de cacau infectadas e os respectivos controles. Curvas Padrões para mpACT e mpTUB.

Legenda: Pontos vermelhos correspondem ao padrão, pontos verdes representam os controles sem infecção; pontos azuis correspondem às amostras infectadas (<48 horas após-infecção).

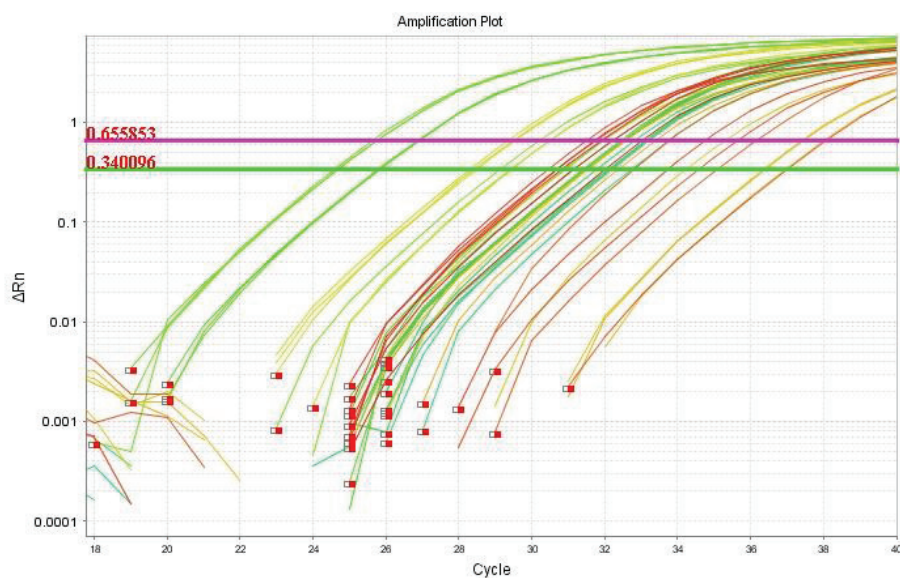


Figura 11. Curvas de amplificação para o gene mpACT de amostras de cacau infectadas >48 horas com *M. perniciosa*

Legenda: As réplicas técnicas e biológicas estão com a mesma cor da curva.

6. Quantificação relativa de genes relacionados com hormônios

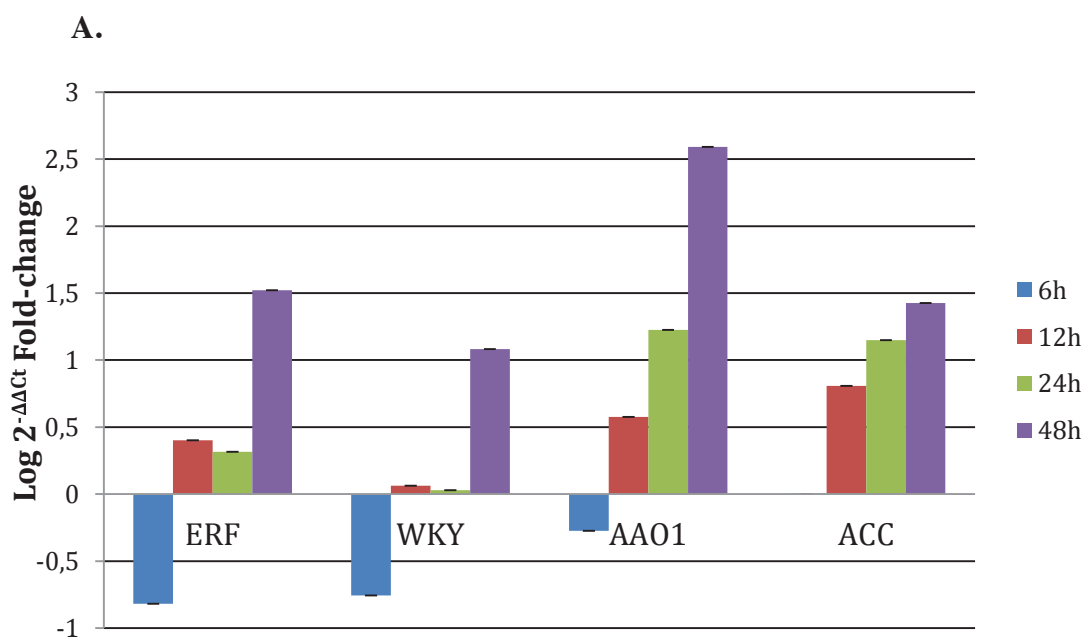
Analizamos o *Time course* da expressão de genes relacionados com hormônios (auxina, etileno e ácido salicílico) durante os estágios iniciais da vassoura de bruxa usando a mesma metodologia padronizada nas seções anteriores.

Metodologia

A reação de amplificação comparativa foi realizada no StepOnePlus Real Time PCR System (Apply biosystem) usando SYB®green. As amostras foram amplificadas em triplicata e com duas réplicas biológicas. Após a reação de amplificação (programa: 95 °C por 10', 40 ciclos de 94 °C por 30'', 55 °C por 30'', 60 °C por 30'') foram avaliadas as curvas *Melting* para cada fragmento amplificado (95 °C por 15'', 60 °C por 1', 95 °C por 15''). A corrida incluiu controles negativos (sem cDNA), e a eficiência da amplificação foi determinada por extrapolação na curva padrão para cada um dos genes de referência.

Resultados e discussão

A figura 12 apresenta os resultados da comparação da expressão dos genes envolvidos na síntese/sinalização de hormônios em relação ao gene referência do cacau (tcTUA) durante a progressão inicial da infecção.



B.

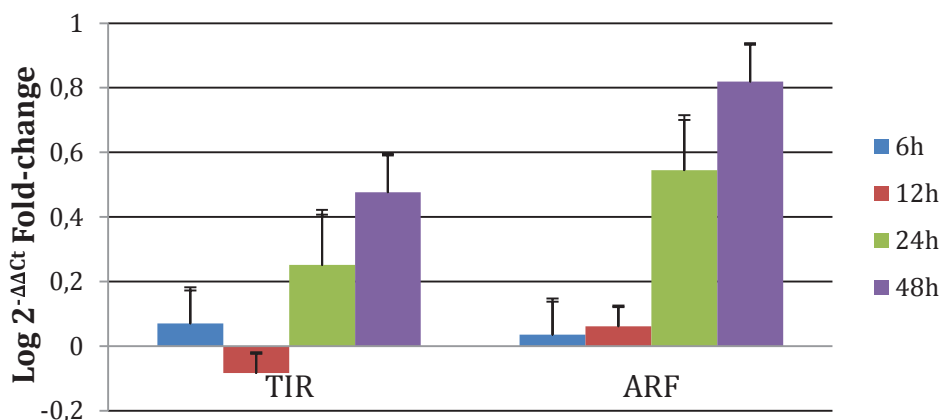


Figura 12. Expressão relativa de genes relacionados com hormônios usando a tubulina A como gene referência para amplificação por qPCR.

Legenda: (A). EFR2; Fator de resposta a etileno, WRKY; Fator de transcrição relacionado com o ácido salicílico, AOO; Indo-3-acetaldeído oxidase. ACC; Acido carboxílico aminociclopropano oxidase. (B). TIR; receptor nuclear da auxina, ARF; Fator de Resposta à auxina 8.

No começo da interação cacau – *M. perniciosa* (< 12 horas) se observa uma repressão da expressão dos genes relacionados com a percepção da auxina (TIR). Passadas 12 horas o gene da indol-3-acetaldeído oxidase (AAO1), última enzima da via de síntese da auxina da planta, apresenta uma indução da expressão de aproximadamente duas vezes. Estes dados sugerem, como observado anteriormente, que a resposta gênica durante as primeiras horas de iniciada a interação compatível caracterizam uma repressão da síntese de auxina pela planta. Em geral, o perfil transcricional dos genes analisados durante a interação inicial *M. perniciosa* - cacau sugere que ocorre uma inibição da sinalização da auxina e posterior indução nas horas seguintes à germinação do esporo. O fato do gene (AAO1) estar desligado no começo da interação e somente ser expresso após o estabelecimento do patógeno, sugere que durante a interação compatível cacau – *M. perniciosa* há uma regulação da produção da auxina na planta devido à presença do patógeno.

Análises do perfil de expressão de genes relacionados com a síntese de outros hormônios foram realizadas. O gene que participa na síntese do etileno, ácido carboxílico aminociclopropano oxidase (ACC) é diferencialmente expresso, transcorridas 12 horas do início da infecção. Entretanto, o fator de resposta ao etileno (EFR2) e o fator de transcrição induzidos pelo AS (WRKY) aparecem induzidos após 48 horas. Estes resultados sustentam a hipótese de

que a planta estaria reagindo ao patógeno com a produção de etileno e AS como já foi documentado em varias pesquisas (Kilaru *et al.*, 2007; Scarpari *et al.*, 2005). O etileno e o ácido salicílico são hormônios relacionados com a indução das defesas da planta em resposta a patógenos biotróficos (López *et al.*, 2008). Entretanto, esta resposta não é suficiente no caso da interação cacau – *M. perniciosa* para confinar o patógeno no local da infecção, provavelmente por não ser uma resposta imediata.

7. Sequenciamento da fase assintomática da vassoura de bruxa usando RNAseq da Illumina

Metodologia

A metodologia utilizada para a coleta e processamento das amostras de RNA para sequenciamento foi descrito na seção 2. Foram preparadas 30 bibliotecas de RNA para sequenciamento na Universidade de Carolina do Norte, usando RNAseq da Illumina. O número de réplicas de cada biblioteca aparece entre parênteses na Tabela 2. Os RNAs das amostras referente aos primeiros tempos de coleta da fase assintomática da vassoura de bruxa e seus respectivos controles foram previamente validados por qPCR (seção 5). Para a preparação das amostras para sequenciamento de RNAseq foi usado o protocolo de Truseq RNA padronizado no laboratório para sequenciamento tipo *Solexa Single End* x 50 pares de bases na versão 3.0 do Hiseq2000 (Illumina). Na tabela 2 se apresentam os resultados de sequenciamento em milhões de *reads* obtidos e o número de réplicas biológicas feitas em cada ponto somando no total, 30 amostras.

Tabela 2. Bibliotecas e número de *reads* sequenciados por Solexa SingleEndx50 usando Hiseq2000 V.3 da interação cacau – *M. perniciosa*.

Tempo	6h	12h	24h	48h	96h	8d	16d	SI	SII	SIII
Controle	(1)60	(1)31	(1)49	(1)27	(1)29	(1)20	(1)23	(1)19	(1)15	(1)30
Infectado	(1)36	(2)102	(2)76	(3)85	(2)74	(2)22	(2)50	(2)45	(2)36	(2)60

(#) representa o número de réplicas da biblioteca. Um milhão de *reads* gera 50 Mb de sequências. O transcriptoma de cacau é de ~25000 genes com tamanho meio de ~2 kb = ~50 Mb para 1 transcriptoma. O número poderia representar o número de vezes que o transcriptoma foi sequenciado.

Para validar a uniformidade entre as réplicas de cada tratamento e os seus respectivos controles, foram desenvolvidas rotinas de análises de variância usando a linguagem R e os pacotes de *softwares* DESeq (Anders e Huber, 2010) e edgeR (Robinson *et al.*, 2010), especialmente criados para análise de dados provenientes de sequenciamentos RNAseq. Os *reads* obtidos foram alinhados com os *genes models* provenientes tanto do projeto genoma do cacau (Argout *et al.*, 2011) quanto do projeto genoma de *M. perniciosa* (http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/perniciosa_v3/), usando o programa *Bowtie* (Langmead *et al.*, 2009). Sobre estes alinhamentos foi calculado o número de *reads* por gene usando *scripts* em perl. Posteriormente foram calculados os RPKMs (Mortazavi *et al.*, 2008) e os coeficientes de variação biológica de cada amostra usando os pacotes edgeR em R (Robinson *et al.*, 2010). A nomenclatura das bibliotecas é baseada na hora ou dia da coleta, seguida pela condição infectada (I) ou controle (C) e depois pelo número da planta coletada; assim 12I8 significa amostra coletada às 12 horas, infectada da planta 8. Em alguns casos a nomenclatura inclui um dígito decimal depois do número da planta se referindo a uma réplica técnica.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos são apresentados na figura 13. Pode-se observar que a dimensão 1 separa o 80% da variação entre as bibliotecas sequenciadas. As coordenadas de cada réplica foram consideradas na escolha das amostras com maior correlação entre o tratamento e a sua respectiva réplica. Pode-se observar que os tratamentos S1, S2 e S3, que correspondem com os pontos de coleta da fase sintomática, se agrupam distantes dos pontos coletados nas primeiras horas após a infecção. Adicionalmente, nestas amostras coletadas em pontos mais avançados da infecção podem ser separadas as amostras infectadas dos seus respectivos controles. Entretanto, no caso das amostras coletadas nas primeiras horas da infecção é difícil separar os tratamentos dos seus controles. Adicionalmente, as réplicas da fase inicial da infecção não se comportam homogeneamente. Estas diferenças podem ser atribuídas à baixa densidade do fungo nas primeiras horas da infecção e/ou ao estágio fisiológico da planta. Este resultado foi considerado decisivo para a escolha das réplicas a serem utilizadas nas análises de expressão gênica. Assim sendo, foram selecionadas as réplicas contendo quantidade de *reads* do fungo >0,2% e com o gene MP14035 (sem função conhecida). Este gene de *M. perniciosa* foi encontrado altamente

expresso nas bibliotecas de fungo germinando pelo que foi selecionado como gene marcador de germinação em planta (comunicação pessoal, Teixeira 2013).

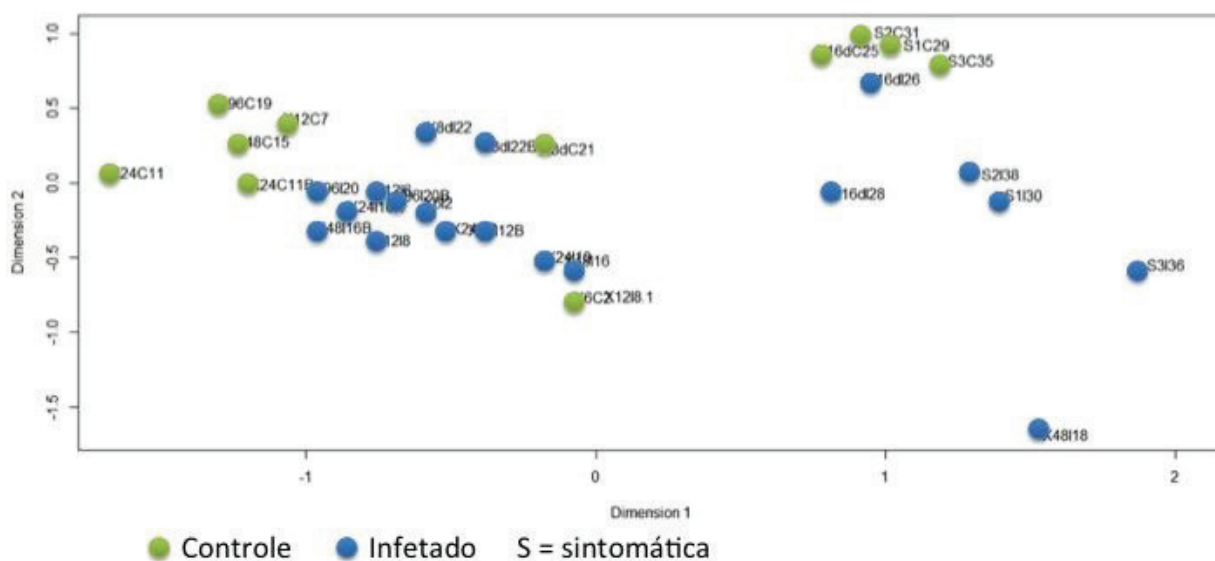


Figura 13. Análise de variação de todas as bibliotecas RNAseq da fase inicial da infecção com *M. perniciosus*.

Usamos os RPKMs das amostras validadas correspondentes aos tratamentos após a infecção e comparamos com os valores de RPKMs dos seus respectivos controles. Assim, utilizando o pacote edgeR, geramos os valores de expressão em termos de *fold change* para todos os genes expressos de cacau. Paralelamente, foram selecionados 143 genes com alta especificidade para ser induzidos com IAA, provenientes da biblioteca de *Arabidopsis thaliana* (*Hormone Databank*; <http://ahd.cbi.pku.edu.cn>). Os parâmetros escolhidos que definimos como filtragem com alta adstringência foram (i) responder somente à auxina, e (ii) ter dados de expressão gênica por microarranjos.

As sequências dos genes selecionados foi utilizada para a busca dos seus ortólogos em cacau utilizando o algoritmo TribeMCL nos *genes models* do projeto genoma de cacau (Argout *et al.*, 2011). Mediante estas análises, foram encontrados 57 genes ortólogos em cacau e os seus valores de *fold change* foram identificados nas bibliotecas de cacau (os dados disponíveis *on-line* em http://www.lge.ibi.unicamp.br/~jcalvarezcacao_IAAhigh_sheet.txt). Para comparação foram utilizados os valores de *fold change* dos experimentos de microarranjos realizados com plantas de *Arabidopsis* tratadas com diferentes hormônios exógenos e em presença de patógenos produtores

de hormônios vegetais (Volodarsky *et al.*, 2009). Na tabela 3, são apresentados os tratamentos escolhidos para esta comparação de expressão dos 57 genes ortólogos altamente responsivos à auxina. Uma matriz com 25 experimentos de expressão em *A. thaliana* e *T. cacao* contendo 57 genes ortólogos foi gerada e os arranjos foram posteriormente agrupados usando a correlação de Spearman do programa Cluster 3 (de Hoon *et al.*, 2004).

Tabela 3. Descrição de experimentos de expressão em *A. thaliana* e *T. cacao* usados para análise de agrupamento.

ID	Tratamento	Organismo/FonteDados
SA_1d	1 dia com ácido salicílico	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
Bc48h	<i>Botritis cinerea</i> (necrotrófico)	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
Zeatin_3h	3 horas com Zeatina (citocinina)	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
ABA_90min	90 min com ABA	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
JA_4h	4 horas com ácido jamônico	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
Ps24h	24 horas com <i>Pseudomonas syringe</i>	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
GA_3h, 6h, 9h	Horas com Giberelina	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
A8d	Assintomático 8 dias pós infecção	<i>T. cacao</i> /RNAseq
A16d	Assintomático 16 dias pós infecção	<i>T. cacao</i> /RNAseq
ET3d	3 dias com Etileno	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
At6dpi	6 dias com <i>A. tumefaciens</i>	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
A6h	Assintomática 6 horas pós infecção	<i>T. cacao</i> /RNAseq
IAA_30min, 1h, 3h	0.5, 1 e 3 horas com auxina	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
Pi24h	24 horas com <i>P. infestans</i>	<i>A. thaliana</i> /Microarranjo
A24h	Assintomática 24 horas	<i>T. cacao</i> /RNAseq
A96h	Assintomática 96 horas pós infecção	<i>T. cacao</i> /RNAseq
A12h	Assintomática 12 horas pós infecção	<i>T. cacao</i> /RNAseq
A48h	Assintomática 48 horas pós infecção	<i>T. cacao</i> /RNAseq
S3, S1, S2	Sintomática	<i>T. cacao</i> /RNAseq

A figura 14 apresenta o resultado de agrupamento dos tratamentos bióticos e abióticos descritos na tabela 3. Pode-se observar que as bibliotecas referentes às amostras de cacau infectado que correspondem com os tempos iniciais da infecção foram agrupadas próximas aos tratamentos de *Arabidopsis* inoculadas com IAA exógena e distantes dos tratamentos com ácido salicílico e citocinina, hormônios antagonistas da expressão de genes responsivos à IAA.

Interessantemente, os tratamentos de *A. thaliana* com etileno e com o patógeno hemibiotrófico *P. infestans* estiveram próximo dos tratamentos com IAA e as bibliotecas de cacau. Igualmente, os tratamentos referentes à infecção de *Arabidopsis* com o patógeno *A. tumefaciens*, conhecido como produtor de hormônios em plantas, foi agrupado entre o perfil dos tratamentos com etileno e IAA. Interessantemente é observada uma forte indução e correlação dos 22 primeiros genes com os tratamentos com IAA. As anotações destes genes extraídos de TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) são relacionadas a proteínas induzíveis com IAA e genes de resposta à auxina. Estes resultados sugerem que estes 57 genes marcadores estão respondendo a uma condição de presença de auxina nos tecidos de cacau infectados com *M. perniciosa*.

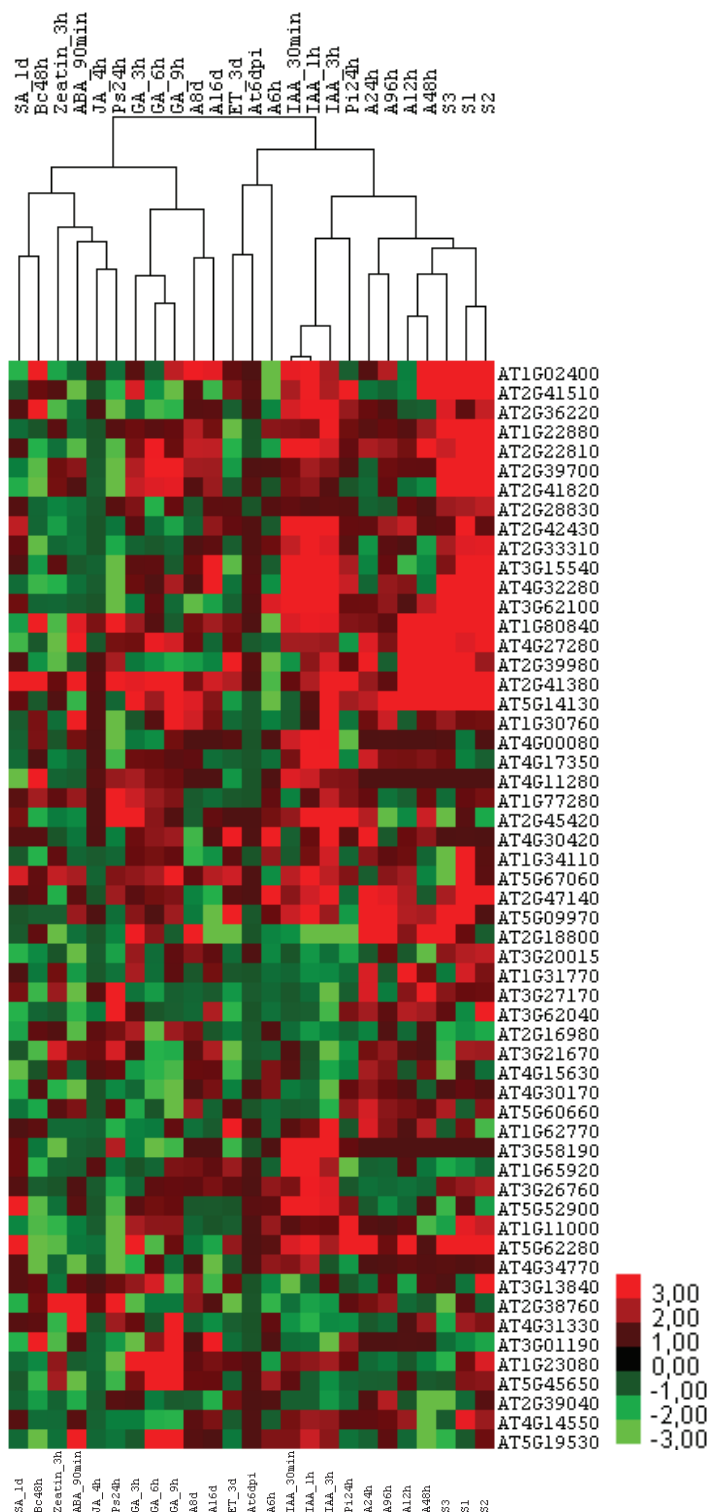


Figura 14. Perfil de expressão de 57 genes ortólogos com alta adstringência para auxina em *Arabidopsis* e cacau durante tratamentos bióticos e abióticos.

Após a validação das bibliotecas, também foram gerados valores de expressão gênica em forma de *fold change* para os genes previamente estudados por qPCR (Tabela 1). A figura 15 mostra uma comparação entre as diferentes abordagens: (qPCR) valores de *fold change* baseados no valor Ct para cada gene com relação ao gene TcTUB *housekeeping*; (edgeR) valores baseados na comparação dos *reads counts* entre controle e infectado; e RPKM usando DESeq foi comparado o número de *reads* normalizados das bibliotecas controle vs infectadas.

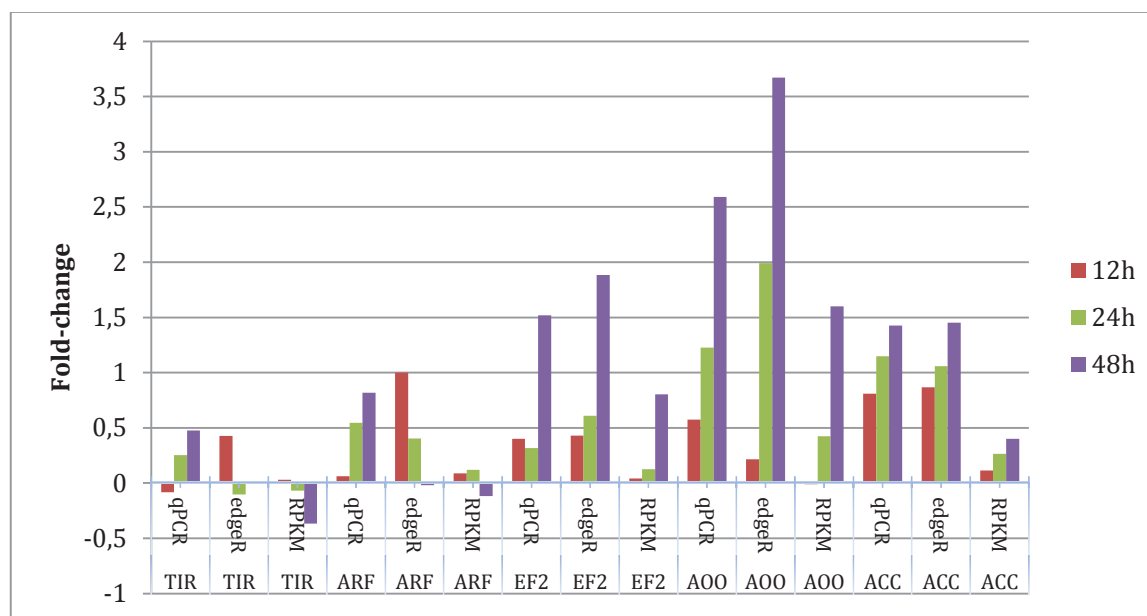


Figura 15. Comparação da expressão de genes de cacau relacionados com hormônios nas primeiras 48 horas depois da infecção com *M. perniciosa* usando três abordagens.

Legenda: TIR, receptor nuclear da auxina; ARF, fator de resposta à auxina; EF2, fator de resposta ao etileno; AOO, Indo-3-acetaldeído oxidase; ACC, Ácido carboxílico aminociclopropano oxidase.

A figura 15 mostra uma correlação na tendência global da expressão destes genes relacionados com hormônios nas três abordagens. Pode-se observar que quanto maior o número de transcritos do gene na amostra, maior é a correlação entre as abordagens. Os valores de expressão do gene ARF foram os que apresentaram maior divergência entre as abordagens; embora mantenha a tendência de aumento às 12 e 24 horas e supressão às 48 horas. A abordagem com maior proximidade aos valores de qPCR foi dado pelo pacote de programas edgeR. Sendo assim, este pacote foi usado para o análise do *time course* de expressão destes genes. O agrupamento dos perfis de expressão foi realizado com o programa CLUSTER 3.0 (de Hoon *et al.*, 2004).

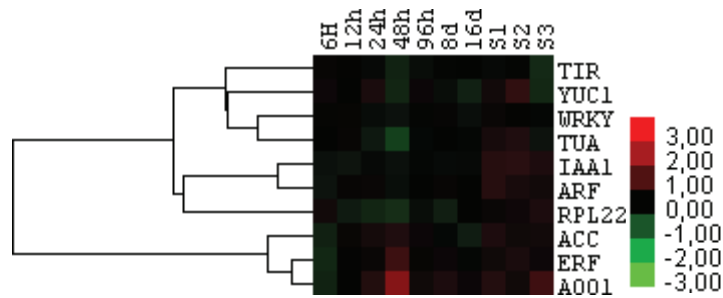


Figura 16. Time-course da expressão de genes relacionados com hormônios e agrupamento por perfis de expressão gênica.
 Legenda: Dados gerados por RNAseq e analisados com o pacote de programas edgeR.

A figura 16 apresenta a formação de três grupos de expressão: (i) aqueles genes que ao longo do tempo não mudam consideravelmente a expressão como TIR, YUC1, WRKY; (ii) aqueles que são expressos somente no final da infecção como IAA e ARF2; e (iii) um grupo de genes com alta expressão desde as etapas iniciais da infecção e que mantém esse padrão de expressão até o final do estudo como ACC, ERF e AOO.

Estes resultados mostram que nas primeiras horas da fase assintomática da infecção, não é claro a indução destes genes que respondem a hormônios, sugerindo que esta abordagem não garante que estes genes sejam diferencialmente expressos nas primeiras horas da infecção. É preciso utilizar outra abordagem com uma estatística mais robusta para validar a hipótese de que os genes responsivos à auxina seriam regulados positivamente nesta fase da doença. Entretanto, nas etapas mais avançadas, os genes envolvidos na síntese e sinalização de auxina são altamente expressos como já foi descrito nas seções anteriores. Estes resultados confirmam os dados de que no início da infecção do cacau por *M. perniciosa* não há síntese deste hormônio pela planta, mas se observa aumento da sinalização deste hormônio sugerindo que a auxina poderia provavelmente estar sendo produzida pelo patógeno. Esta auxina seria capaz de induzir os genes da planta responsivos ao hormônio influenciando na suscetibilidade da planta ao patógeno.

Para validar a existência de genes responsivos à auxina sendo diferencialmente expressos no início da infecção (primeiras 48 horas), dados da montagem do RNAseq foram utilizados e validados com uma estatística mais robusta. Primeiramente foi realizada uma análise de variação biológica, com o intuito de incluir parâmetros estatísticos que suportem o critério de escolha dos genes diferencialmente expressos entre as condições de cacau sadio e infectados. Como resultado foi obtido o gráfico que mostra a Análise dos Componentes Principais (PCA do inglês *Principal Component Analysis*) para as bibliotecas referentes às primeiras horas da infecção. PCA é um dos

métodos estatísticos de múltiplas variáveis mais simples sendo considerada a transformação linear ótima dentre as transformadas de imagens (Jolliffe, 2002). A figura 17 apresenta as bibliotecas correspondentes às amostras coletadas 12, 24 e 48 horas após a infecção. Estas bibliotecas foram consideradas como réplicas biológicas já que formaram um grupo homogêneo no análise PCA e podem ser vistas como um *pool* de RNAs coletados nas primeiras horas onde o estado fisiológico da planta não afetou a expressão global dos genes de forma significativa. Assim sendo, foi comparada a condição de cacau infetado no início da doença com os seus respectivos controles.

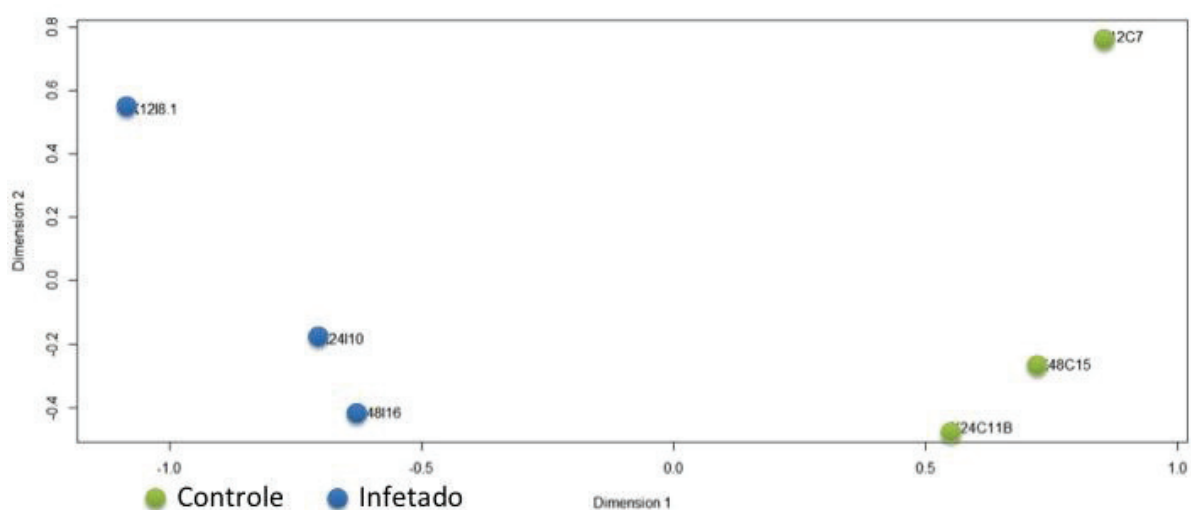


Figura 17. Análise PCA das bibliotecas RNAseq escolhidas da fase inicial da infecção com *M. perniciosa*.

Para a identificação dos genes diferencialmente expressos foi executando o pacote edgeR. O critério para filtragem dos genes foi *p-value* ajustado (FDR <0.05). A tabela 4 apresenta os genes diferencialmente expressos identificados por esta metodologia que estão envolvidos com a sinalização, síntese e degradação de auxina.

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos relacionados com auxina durante a fase inicial da infecção com *M. perniciosa*.

GENE	Função Putativa	LogFold change	FDR <0.05	pValue
GH3				
CGD0026825	GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	2,0337	0,0003	7,06E-06
CGD0009775	GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	1,7993	0,0027	6,20E-05

CGD0003037	GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	1,7073	0,0022	4,83E-05
CGD0026788	GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	1,2525	0,0492	2,14E-03
CGD0026828	GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	1,3407	0,0373	1,48E-03
CGD0000544	GH3.4; indole-3-acetic acid amido synthetase	-1,3104	0,0389	1,56E-03
ARG				
CGD0003025	Indole-3-acetic acid-induced protein ARG2	1,7871	0,0228	8,03E-04
CGD0025560	DYL1 dormancy/auxin associated protein-related	1,2653	0,0412	1,69E-03
CGD0026185	dormancy/auxin associated protein-related	1,7751	0,0111	3,27E-04
SAUR				
CGD0004301	Indole-3-acetic acid-induced protein ARG7	1,5219	0,0139	4,35E-04
CGD0016638	Auxin-induced protein 10A5	1,2331	0,0335	1,29E-03
PILS				
CGD0000019	Auxin efflux carrier family protein	2,6601	9,97E-08	6,67E-10
AUX/IAA				
CGD0003885	IAA3 SHY2 (SHORT HYPOCOTYL 2); transcription factor	-1,1917	*0,0938	5,03E-03

Análises do transcriptoma de cacau durante o início da fase assintomática da infecção, revelaram que seis (6) genes responsivos à auxina da família GH3.1 estão sobre-regulados durante as primeiras 48 horas após a infecção das plantas. A família de proteínas GH3 agrupa proteínas com função acetil-amido sintetase, que atuam como moduladores críticos da concentração de hormônios vegetais, dentre eles o IAA (Wang *et al.*, 2012). A proteína GH3.17 (*indole-3-acetic acid-amido synthetase*) de *Arabidopsis* catalisa a conjugação da auxina ao ácido glutâmico (Glu) e ao ácido aspártico (Asp) e logo depois estes conjugados são direcionados para o mecanismo de degradação (Staswick *et al.*, 2005). Assim, a cacau poderia sobre expressar estas enzimas para “sequestrar” à auxina em forma de conjugados de aminoácidos e regular a concentração deste hormônio livre dentro da célula. Reforçando a teoria de que a planta estaria tentando controlar os níveis de auxina endógena foi identificado um gene altamente expresso (Log *fold-change* de 2,660) que codifica uma proteína de transporte ex-fluxo da auxina (CGD0000019).

Alguns patógenos que secretam IAA podem induzir eficientemente genes GH3 da planta durante a infecção (Fu *et al.*, 2011). Por exemplo, a infecção de *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis* conduz à ativação da transcrição da GH3.2 resultando na acumulação de IAA-Asp (González-Lamothe *et al.*, 2012). Assim, uma auxina produzida pelo patógeno poderia ser percebida igualmente pela planta como uma auxina endógena, conseguindo ativar os mesmos genes no hospedeiro.

Estes dados validam os resultados obtidos pelas metodologias anteriores (seção 6) suportando a nossa hipótese de que os tecidos infectados estão respondendo a presença ou aumento de uma auxina "exógena", já que este hormônio não estaria sendo sintetizado pela planta. Agora temos elementos suficientes para propor que *M. perniciosa* seria capaz de produzir auxina durante a fase inicial da sua interação compatível com o cacau. Repassando os fatos: (i) a presença do fungo provoca a expressão de genes responsivos à auxina nas fases iniciais da vassoura de bruxa; (ii) não há indução significativa de genes de síntese de auxina da planta nestas horas; (iii) auxina produzida por patógenos pode mimetizar a ação da auxina endógena e (iv) trabalhos prévios sugerem que este fungo é capaz de produzir auxina. Com estas premissas passamos ao próximo capítulo. No entanto, é importante aclarar que a dosagem do hormônio no tecido é crítico para a ativação ou repressão os genes de resposta a auxina, por isso é necessário determinar a concentração na qual esta sendo produzido assim pode ser melhor correlacionado.

Conclusão do capítulo I

Análises de transcriptoma -seja por qPCR e/ou RNAseq- mostram que na fase inicial da interação cacau – *M. perniciosa*, a planta apresenta um perfil de expressão gênica que sugere a presença de altos níveis de auxina, os quais poderiam modular suscetibilidade da planta ao patógeno. Entretanto, análises de expressão gênica nas mesmas bibliotecas de interação indicam que a planta não estaria sintetizando auxina *de novo*.

CAPITULO II

Objetivo II: Determinação do efeito *in-planta* de compostos secretados pelo fungo *M. pernicioso*

Para cumprir este objetivo, o trabalho foi dividido em etapas:

1. Efeito da aplicação exógena de hormônios vegetais no desenvolvimento de sintomas da vassoura de bruxa no caule sobre condições controladas.
2. *M. pernicioso* causa alterações no crescimento das raízes de *Arabidopsis thaliana*?
3. Extratos de sobrenadante do fungo causam alterações na produção e transporte da auxina em plantas de *A. thaliana* DR5::GUS.

A seguir se apresenta uma descrição da metodologia, resultados e discussão associada ao desenvolvimento de cada uma destas etapas.

1. Efeito da aplicação exógena de hormônios vegetais no desenvolvimento de sintomas da vassoura de bruxa no caule sobre condições controladas.

Está descrito que a inoculação de plantas com hormônios exógenos leva ao pré-condicionamento das mesmas para a chegada do patógeno tornando-as mais suscetíveis ou resistentes à doença (Grant e Jones, 2009). Dentre os hormônios estudados está o ácido salicílico cuja aplicação conduz à indução da resposta sistêmica adquirida (SAR) que combate principalmente patógenos biotróficos (Kazan e Manners, 2009). Contrariamente, a aplicação de auxina torna as plantas mais suscetíveis a patógenos biotróficos e mais resistentes aos fungos necrotróficos (López *et al.*, 2008). Assim sendo, a aplicação exógena de hormônios vegetais em plântulas de cacau antes da inoculação com esporos de *M. perniciosus* poderia interferir na sua germinação e posterior infecção do tecido pelas hifas do fungo.

Metodologia

Para testar esta hipótese, hormônios vegetais (IAA e SA) foram aplicados em meristemas de plântulas de cacau. Além disso, foi testada a efetividade do ácido p-Chlorophenoxyisobutyric (PCIB) que é um inibidor da ação da auxina. Este composto ainda não está muito bem caracterizado a nível molecular, mas análises fisiológicas demonstram que PCIB inibe a formação de raízes laterais e o crescimento da raiz primária em plantas de *A. thaliana* (Oono *et al.*, 2003). As plântulas de cacau tratadas com estes compostos foram posteriormente inoculadas com esporos do fungo *M. perniciosus* com o objetivo de estudar os efeitos deste pré-tratamento das plantas nas suas respostas de defesa e no desenvolvimento da doença vassoura de bruxa.

Especificamente, meristemas apicais de plântulas de cacau mantidas em casa de vegetação (capítulo 1, seção 2) foram inoculados com 100 μ M de ácido indol-3-acético (IAA), 5 mM de ácido salicílico (SA) e 50 μ M do inibidor da auxina (PCIB). Transcorrida uma hora deste pré-tratamento foi aplicada por pipetagem 30 μ L uma suspensão de basidiósporos do fungo *M. perniciosus* (10^6 esporos / mL). As plantas inoculadas foram incubadas em câmara úmida por 24 h em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura e umidade. Plântulas de cacau da variedade 'Comum- Catongo' foram utilizadas como controles de suscetibilidade para estimar a

eficiência da infecção. Igualmente foram utilizadas plantas controles (i) inoculadas com o esporos do fungo sem pré-tratamento com hormônios, e (ii) plantas tratadas unicamente com hormônios vegetais sem inoculação com esporos do fungo. Para cada controle/tratamento foram feitas quatro réplicas biológica. O experimento foi acompanhado e documentado através de fotos tomadas durante um mês para verificação do desenvolvimento de sintomas. Os resultados deste estudo são apresentados na figura 18.

Resultados e discussão

Tratamento	Dia 0	Dia 10	Dia20
A Controle sem pré-tratamento e sem infecção			
B Controle infectado sem pré-tratamento			

C Controle IAA			
D Controle AS			
E Controle PCIB			

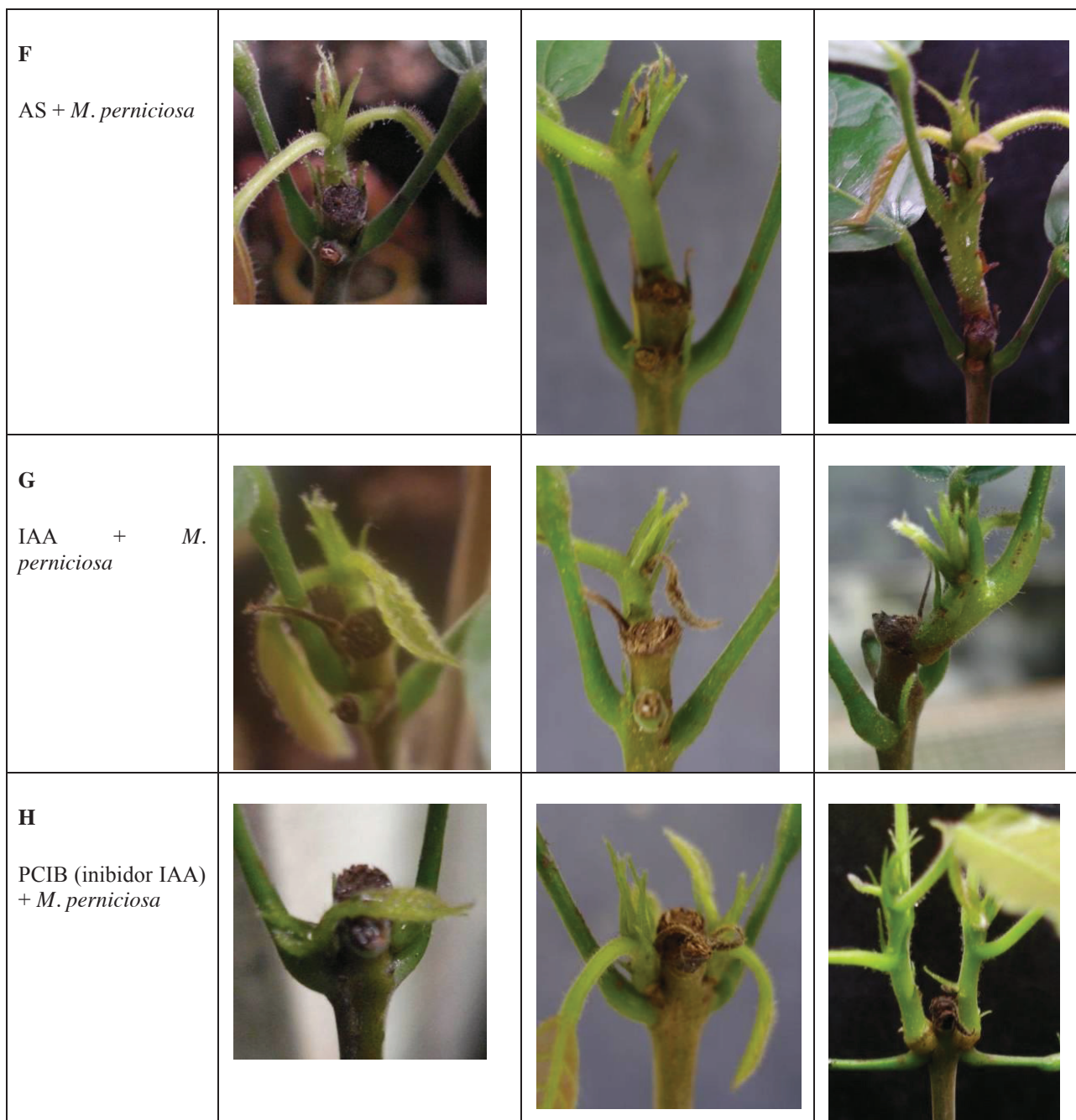


Figura 18. Tratamentos com hormônios e inibidores em meristemas de plântulas de cacau prévio à infecção com *M. perniciososa*.

Legenda: (A) controle sem infecção; (B) controle infectado; (C) planta tratada com 100 μ M IAA; (D) planta tratada com 5 mM AS; (E) planta tratada com 50 μ M de PCIB; (F) planta tratada com 100 μ M IAA e infectada 12 e 3 horas antes; (G) planta tratada com 5 mM AS e infectada 12 e 3 horas antes; (H) planta tratada com 50 μ M de PCIB e infectada 12 e 3 horas antes.

A figura 18 mostra que a plantas controle inoculadas com esporos de *M. perniciososa* sem prévio tratamento com hormônios vegetais apresentam sintomas de vassoura verde após 20 dias

da inoculação (Figura 18; B). Estes resultados garantem a eficiência do protocolo de inoculação utilizado e a capacidade de infecção dos esporos nas condições dos ensaios. Os controles tratados somente com hormônios vegetais (IAA e AS) ou com inibidor de auxina (PCIB) não mostraram nenhum efeito na morfologia dos meristemas (Figuras 18; C, D e E, respectivamente). Interessantemente as plantas previamente tratadas com IAA e posteriormente infectadas com esporos do fungo, apresentaram sintomas de vassoura verde após 20 dias da inoculação. Este estágio da doença vassoura de bruxa é aquele em que prevalece a presença do fungo na forma biotrófica. Esta indução dos sintomas de vassoura verde também foram observados nas plantas inoculadas com esporos do fungo que foram previamente tratadas com o inibidor da auxina PCIB (Figura 18; H) e ácido salicílico (Figura 18; F).

Estes dados sugerem que a aplicação exógena destes hormônios nas concentrações ensaiadas não tem influencia no desenvolvimento dos sintomas da doença vassoura de bruxa. Entretanto, uma conclusão sobre esse efeito somente poderá ser validada através do desenvolvimento de outros experimentos utilizando abordagens diferentes. Isso porque no modelo de infecção em condições controladas criado no nosso laboratório as taxas de infecção obtidas são muito baixas. Vale a pena sublinhar que o cacau e a vassoura de bruxa são originários de regiões com condições climáticas muito diferentes das que ocorrem no Estado de São Paulo e muito difíceis de mimetizar mesmo em casa de vegetação.

2. *M. perniciosa* causa alterações no crescimento das raízes de *Arabidopsis thaliana*?

Vários trabalhos relacionam auxinas produzidas por fungos fitopatogênicos com indução de mudanças macro-morfológicas nos respectivos hospedeiros (Tanaka, 2010; Reineke *et al.*, 2008). É bem conhecido que em plantas, o IAA pode afetar processos fisiológicos que incluem alongamento e divisão das células, diferenciação dos tecidos, além das respostas à luz e à gravidade (Woodward e Bartel, 2005). Adicionalmente, a auxina é o principal regulador da formação das raízes laterais (Laskowski *et al.*, 2008) causadas por acumulação local deste hormônio nos tecidos das raízes (Dubrovsky *et al.*, 2008). Sendo assim, um experimento viável para identificar se o fungo *M. perniciosa* é capaz de produzir algum composto com atividade semelhante à auxina poderia ser o tratamento de sementes de uma planta modelo como *A. thaliana* e a análise da indução de raízes laterais. Para isso, sementes de *A. thaliana* wild-type

foram tratadas com extratos de sobrenadante de culturas do fungo coletadas nas fases biotrófica e necrotrófica do seu desenvolvimento.

Metodologia

Obtenção de culturas do fungo *M. pernicioso* em meio líquido

Meio de cultura sólido contendo *M. pernicioso* (isolado CP02, CBMAI 0350 em <http://webdrm.cpqba.unicamp.br/cbmai/>) na fase necrotrófica foi seccionado; quatro (4) pedaços esféricos (diâmetro 5 mm) foram inoculados em meio líquido em *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 50 mL de meio de crescimento biotrófico (Meinhardt *et al.*, 2006), sem a adição de IAA. Os tratamentos consistiram na suplementação do meio de cultura com 0.08% de L-triptofano (Trp, Sigma-Aldrich, SP, Brasil) ou 3 mM de indol acetonitrila (IAN, Sigma-Aldrich, SP, Brasil) e crescido a 28 °C, 200 rpm, no escuro. Os controles negativos (fungo crescido em meio de cultura sem suplementação de Trp ou IAN) foram submetidos às mesmas condições de crescimento. Os extratos foram preparados através da recolha do sobrenadante do fungo utilizando um papel de filtro comercial. Para os experimentos em *time-course* de crescimento, as culturas foram coletadas nos dias 3, 7, 14 e 30 dias após a inoculação e posteriormente armazenadas a -20 °C, até serem submetidas ao procedimento de extração.

Extração e purificação dos compostos

Todas as amostras foram acidificadas a pH 2.5 com HCl. Cem mililitros (100 mL) de acetato de etilo foram adicionados às amostras, e cada mistura foi agitada em vórtex pelo menos durante 5 minutos e imediatamente pipetada para um funil de separação. Posteriormente, 80 mL da fase de acetato de etilo foram transferidos para um *Erlenmeyer* limpo. Este procedimento foi repetido três vezes para cada amostra e cerca de 250 mL de extrato foram coletados por amostra. A fase de acetato de etilo foi reduzida por vácuo utilizando um roto-evaporador com uma temperatura do banho Maria a 50 °C e 73 mm Hg de pressão. Os extratos foram dissolvidos em 2 mL de acetato de etilo e cada volume final foi dividido igualmente em cinco tubos. Um tubo foi usado para os experimentos de GC-MS e outro foi armazenado a 4 °C. Os restantes três extratos foram secados totalmente usando um SpeedVac, e uma delas foi armazenado a 4 °C. Os outros foram

ressuspensos em 1 mL de etanol a 10% e 1 mL de água para os experimentos com plantas e LC-MS/MS, respectivamente.

Condições de crescimento para *A. thaliana*

Sementes de *Arabidopsis wild-type*, variedade Col-1 obtidas por autofertilização (doação do laboratório de genoma funcional LGF/IB/UNICAMP), foram esterilizadas e colocadas de forma alinhada em placas de Petri contendo meio MS 0.5X, sem vitaminas, 1% de Agar e 1% (wv) de sacarose (Murashige e Skoog, 1962). Os tratamentos foram realizados suplementando o meio com 1% (v/v) de EtOH como um controle negativo, 1% (v/v) de um meio de cultura extraído sem inoculação com fungos como um controle negativo da extração, IAA a 20 μ M, PCIB a 20 μ M (Sigma-Aldrich, SP, Brasil), 1% (v/v) do extrato do fungo induzido com Trp ou IAN. As fotografias foram tomadas com um microscópio Olympus BX51 (Olympus, Alemanha).

O comprimento das raízes dos seguintes tratamentos também foi medido: 20 μ M IAA (IAA), 1% de extrato do sobrenadante de cultura do fungo necrotrófico (EN), 1% sobrenadante de cultura do fungo necrotrófico (SN), 2% solução sonicada de esporos (SSS), PCIB 20 μ M (PCIB), 1% sobrenadante de cultura do fungo biotrófico (SB), 1% de meio de cultura necrotrófico (MN), 1% meio de cultura extraído necrotrófico (EMN), extrato 1% micélio do fungo necrotrófico (EMiN), água (Mock), extrato de esporos de 1% (SE) e 1% de extrato de esporos sonicados (SSE). Para a obtenção da amostra SSE, 1 mL de solução com esporos de *M. perniciosa* foi sonicada usando um disruptor de células ultrassônico (UNIQUE, SP, Brasil) por dois pulsos de 25 s de 20 kHz. As placas foram colocadas em casa de vegetação a 22 °C com um fotoperíodo de 16 luz 8 noite, durante 9 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes com resultados semelhantes.

Resultados e discussão

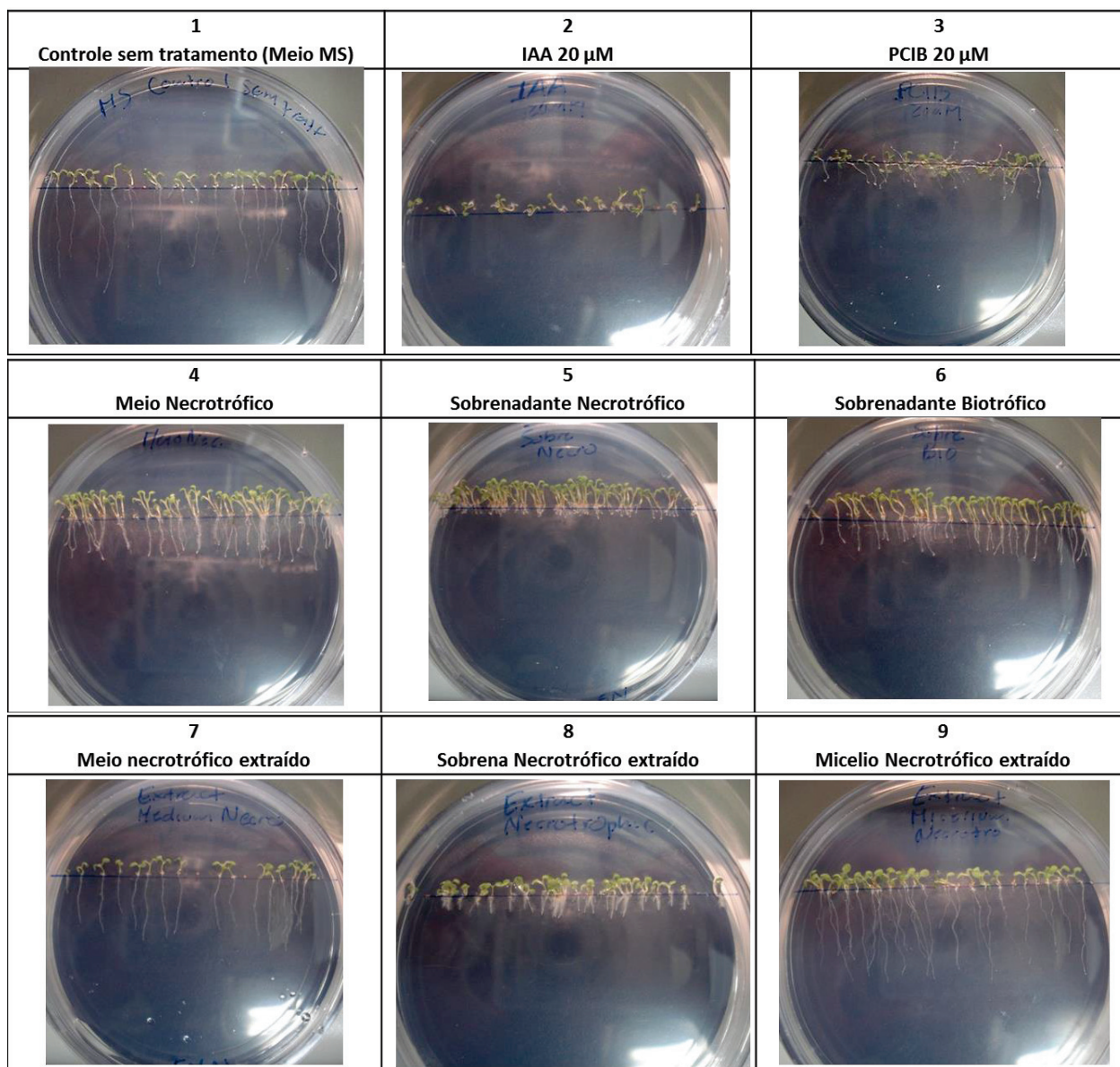


Figura 19. Crescimento de raízes de *Arabidopsis thaliana* com meio MS suplementado com hormônios e extratos de fungo *M. perniciosus* 9 dias depois do tratamento.

Legenda: (1) Controle negativo 1: meio de cultura das sementes sem tratamento; (2) Controle positivo: adição de IAA; (3) Controle positivo: adição de PCIB; (4) Controle negativo 2: meio de cultura do fungo na fase necrotrófica filtrado; (5) Tratamento com sobrenadante do fungo na fase necrotrófica – filtrado; (6) sobrenadante do fungo na fase biotrófica; (7) Controle negativo 3: meio de cultura do fungo na fase necrotrófica -extraído; (8) Tratamento com sobrenadante do fungo na fase necrotrófica – extraído; (9) Extrato do micélio do fungo na fase necrotrófica extraído.

A figura 19 mostra o visível efeito dos hormônios IAA e PCIB sobre a redução da raiz principal e no surgimento das raízes laterais (figura 19; 2 e 3, respectivamente) em contraste com

a morfologia das raízes no controle sem tratamento (figura 19; 1). O tratamento com IAA reduz drasticamente (na sua totalidade) o comprimento da raiz principal. Entretanto, a adição de PCIB diminuiu as raízes e desorienta o crescimento das plantas (figura 19; 3).

A figura 19 (5 e 8), mostra o tratamento com o sobrenadante do fungo necrotrófico e pode-se observar que há um efeito maior na redução do tamanho da raiz principal favorecendo a formação de raízes laterais. Este fenômeno é parecido ao observado quando são adicionados IAA ou PCIB no meio (figura 19; 2 e 3, respectivamente). Vale a pena destacar que o meio de crescimento do fungo na fase necrotrófica (controle negativo 2, figura 19; 4) também induz alterações no tamanho das raízes. Esse efeito é devido provavelmente a que o meio de crescimento do fungo nesta fase é complexo contendo diversos nutrientes que poderiam interferir no desenvolvimento da planta. Por esta razão, foi utilizado um protocolo de extração ácida, amplamente usado para extrair IAA e outros ácidos de amostras vegetais, incluído outros hormônios, como detalhado acima na metodologia.

Plantas crescidas em meio suplementado com sobrenadante de fungo necrotrófico após o processo de extração de ácidos apresentaram a mesma morfologia observada quando tratadas com o sobrenadante depois de filtrado - sem passar pelo processo de extração- (figura 19; 5 e 8, respectivamente). Entretanto, no caso do controle negativo 3 referente ao meio de cultura do fungo na fase necrotrófica extraído, verificou-se o normal desenvolvimento das raízes (figura 19; 7). Estes resultados validam o protocolo de extração utilizado mostrando que foi capaz de eliminar substância(s) ácidas do meio de cultura do fungo necrotrófico que estariam induzindo alterações na morfologia das raízes e inviabilizando o experimento. Sendo assim, estes resultados sugerem também que os efeitos induzidos nas sementes tratadas com sobrenadantes do fungo após o processo de extração (figura 19; 8) são devido à presença de substância(s) produzida(s) pelo fungo.

Micélio do fungo necrotrófico coletado e sonificado também foi submetido ao protocolo de extração previamente descrito. Sementes de *A. thaliana* foram tratadas com estas amostras e apresentaram um crescimento das raízes semelhantes ao normal (figura 19; 9 e 1). Destes resultados pode-se sugerir: (i) que *M. perniciosus* é capaz de produzir um composto que induz alterações morfológicas em raízes de *A. thaliana* (figura 19; 8); (ii) este composto seria secretado pelo fungo e acumulado no meio de cultura.

Adicionalmente, foi feito outro experimento incluindo mais tratamentos (ver metodologia) tais como: esporos sonificados e sobrenadante de cultura do fungo em crescimento na fase biotrófica. Foi medido o comprimento das raízes em todos estes experimentos. Os dados obtidos foram utilizados para realizar um teste de comparação de médias entre os tratamentos usando o estatístico de Fisher. As análises estatísticas mostraram a existência de diferenças significativas entre os tamanhos das raízes submetidas aos diferentes tratamentos (figura 20).

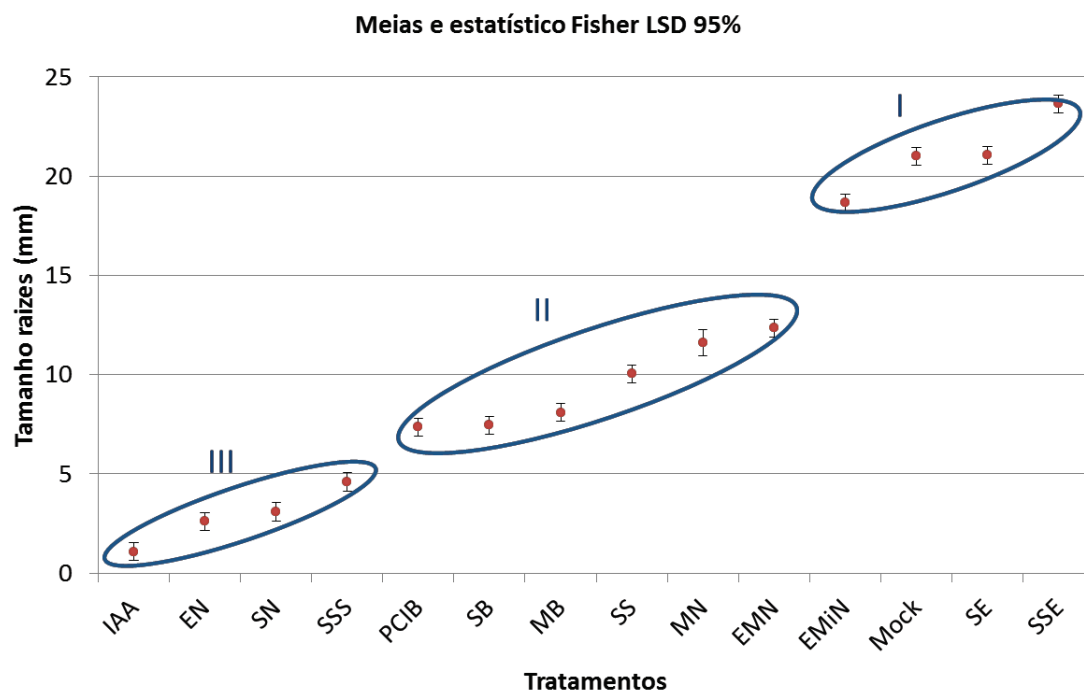


Figura 20. Tamanho de raízes de *Arabidopsis thaliana* após nove dias de crescimento em meio MS suplementado com hormônios e extratos de fungo *M. perniciosa*.

Legenda: Estatístico de Fisher com um 95% de confiança, n=30 por tratamento. (IAA); tratamento com IAA 20μM; (EN); Extrato Necrotófico; (SN); Sobrenadante Necrotófico; (SSS) Solução de esporos sonificados; (PCIB) 50 μM; (SB) Sobrenadante Biotrófico; Meio Biotrófico; (SS) Solução Esporos; (MN); Meio Necrotófico; (EMN); Extrato de Meio Necrotófico; (EMiN) Extrato de Micélio Necrotófico; (Mock) controle sem tratamento; (SE) Sobrenadante Esporo; (SSE) Solução de esporos extraídos.

Interessantemente, as amostras foram agrupadas em três grupos: grupo (I) inclui os tratamentos que não tiveram nenhum efeito sobre o desenvolvimento das raízes, ou seja, semelhantes ao Controle negativo 1. Neste grupo estão as amostras dos esporos (SE e SSE) e o micélio necrotófico extraído (EMiN); grupo (II) inclui os tratamentos que provocaram uma

redução média do crescimento das raízes em comparação com o controle negativo (Mock). Fazem parte deste grupo, o controle negativo referente ao meio de crescimento do fungo necrotrófico extraído e o tratamento com o sobrenadante de crescimento do fungo biotrófico (MN e SB). Vale a pena ressaltar que mesmo que o meio de cultura do fungo necrotrófico extraído (controle negativo) tem certo efeito nas raízes, este é insignificante estatisticamente quando comparado com o tratamento do sobrenadante de cultura do crescimento do fungo necrotrófico; o grupo (III) inclui os tratamentos com o efeito mais drástico sobre o tamanho das raízes. Fazem parte deste grupo, o tratamento das sementes com sobrenadante do fungo necrotrófico extraído (EN) e os controles positivos (tratamentos com IAA e PCIB). Esta análise reforça a nossa hipótese de que compostos secretados pelo fungo *M. perniciosus* causariam malformação nas raízes de *Arabidopsis*, semelhantes aos induzidos quando tratadas com IAA ou PCIB exógenos.

3. Extratos de sobrenadante do fungo causam alterações na produção e transporte da auxina em plantas de *A. thaliana* DR5::GUS.

Uma vez observado que extratos do fungo *M. perniciosus* poderiam alterar a morfologia normal das raízes de *Arabidopsis thaliana* de forma semelhante à adição de auxina exógena decidimos aprofundar no estudo deste fenômeno. Para isso aproveitamos o fato de que se trata de uma planta modelo, tanto o desenvolvimento das raízes laterais quanto a sua regulação molecular estão bem caracterizadas (Casimiro *et al.*, 2001; De Smet *et al.*, 2006). Recentes estudos mostraram que raízes de *A. thaliana* em contato com o fungo ectomicorriza *Laccaria bicolor* apresentaram mudanças na resposta e transporte da auxina (Felten e Ditengou, 2010). Os autores demonstraram que a presença deste fungo potencializa a resposta e distribuição da auxina na raiz. Surpreendentemente, eles não identificaram os compostos que poderia regular a homeostase da auxina na planta, propondo que poderiam ser compostos voláteis (Felten e Ditengou, 2010).

O gene sintético repórter DR5::GUS (T. Ulmasov *et al.*, 1997) tem sido amplamente usado em estudos de indução e transporte da auxina utilizando plantas de *A. thaliana* transformadas (figura 21). Esta abordagem pode ser usada como marcador para monitorar a distribuição da IAA endógena (Sabatini *et al.*, 1999). Adicionalmente, trabalhos recentes mostraram que auxinas

produzidas por patógenos eram capazes de induzir a expressão de DR5::GUS em células de arroz e tomate (Tanaka *et al.*, 2011; Marelli *et al.*, 2009).

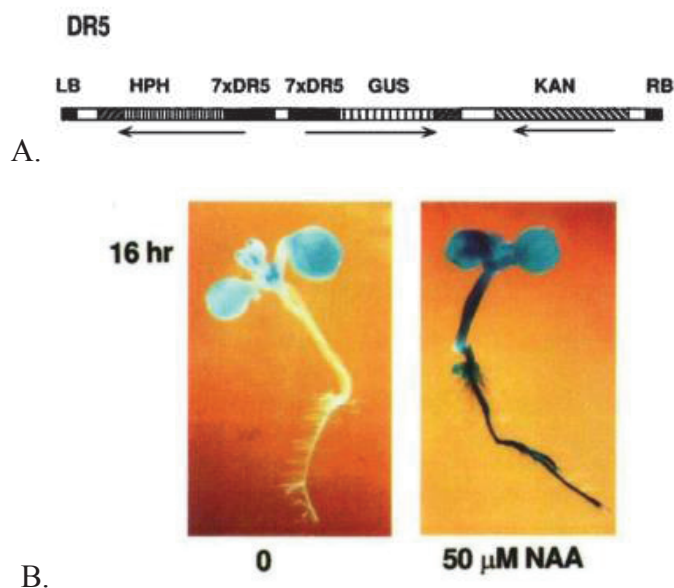


Figura 21. Origem dos promotores de resposta á auxina DR5. Em A, plasmídeo com a construção DR5::GUS original. Em B, plantas de *Arabidopsis* transgênicas DR5(7x)-GUS com X-Glc sem e com a auxina sintética NAA (Ulmasov *et al.*, 1997).

Assim sendo, decidimos utilizar esta metodologia para analisar se compostos do fungo *M. perniciosus* seriam capazes de induzir a expressão do gene repórter de resposta à auxina. Para isso, foram utilizadas plantas transformadas com a construção DR5::GUS (gene repórter de resposta à auxina). Estas plantas foram obtidas do ABRC stock (CS16715, TAIR; www.arabidopsis.org). Brevemente, esta construção permite visualizar regiões de acumulação de auxina já que DR5 é um promotor responsivo para auxina sintética fundido com o gene repórter GUS que codifica para a enzima β -glucuronidase. Em *Arabidopsis*, DR5::GUS é sensível à auxina de forma dose dependente, e a sua atividade reflete os níveis de auxina endógena em partes da planta. Em presença de auxina, se ativa o promotor DR5 que permite a expressão do gene da β -glucuronidase que degrada o substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-glc) originando uma cor azul. A intensidade da cor varia em dependência da quantidade de auxina presente (T. Ulmasov *et al.*, 1997). Amostras do fungo *M. perniciosus*, crescendo em meio de cultura líquida, foram testados quanto à capacidade para induzir a expressão da enzima β -glucuronidase em plântulas de *Arabidopsis* transformadas com DR5::GUS com 7 dias de crescimento.

Metodologia

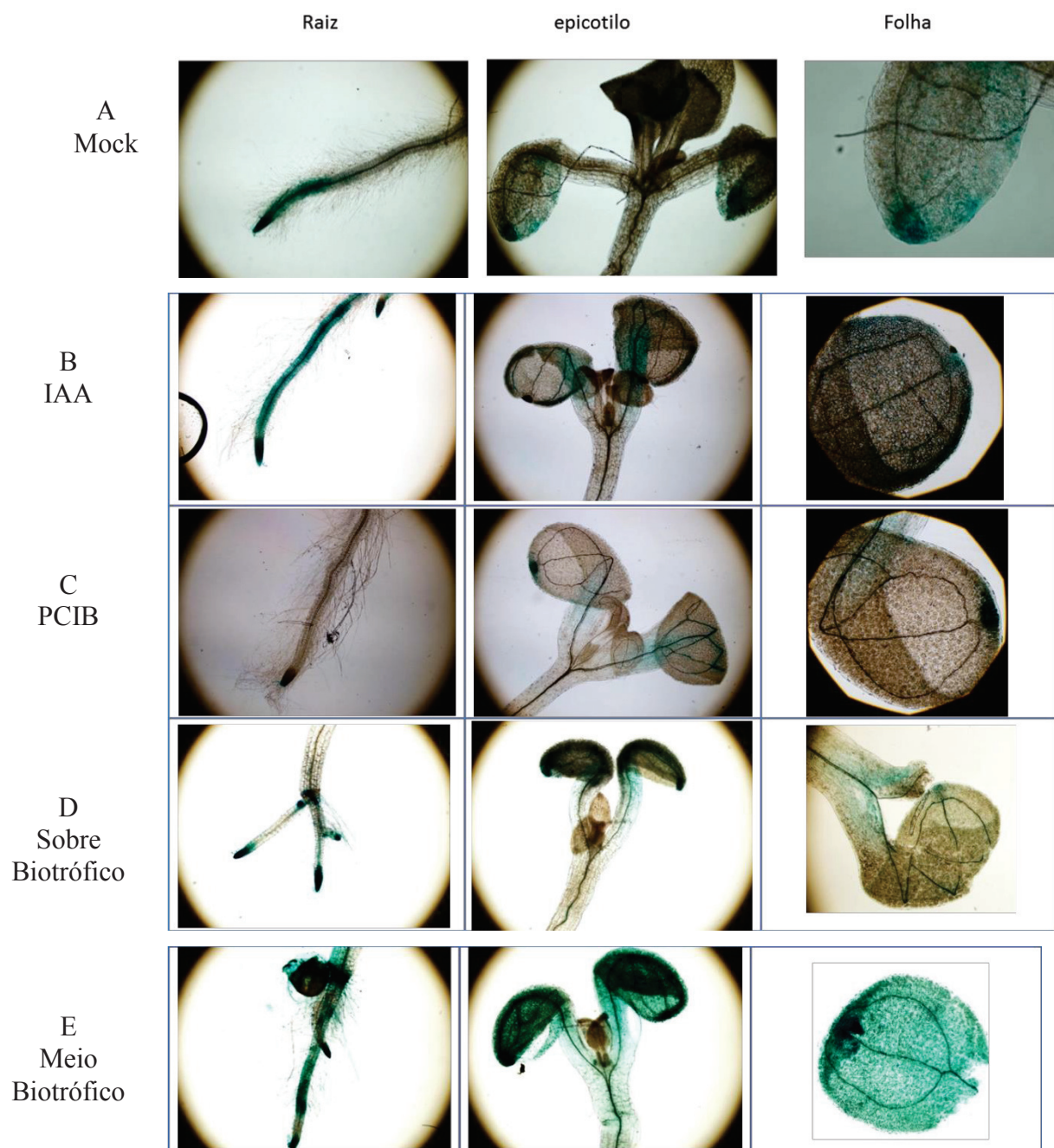
Os procedimentos para o crescimento das plântulas de *A. thaliana* transformadas e a suplementação no caso dos tratamentos com os meios e sobrenadantes de crescimento isolados do fungo *M. perniciosus* foram semelhante aos descritos na seção anterior. Para o ensaio histoquímico da atividade de GUS, todas as plântulas utilizadas no experimento foram submergidas em tampão contendo 1 mM X-glc, 10 mM fosfato de sódio (pH 7.5), 0.5 mM ferrocianida de potássio, 10 mM EDTA, e 0.1% Triton X-100 (Kidd *et al.*, 2011). A solução contendo as plântulas foi colocada no vácuo por 2 min e posteriormente incubada a 37°C no escuro por 12 h. As plântulas foram clareadas com etanol 70% e posteriormente fotografadas no microscópio Olympus BX51TF.

Resultados e discussão

A figura 22 apresenta os resultados obtidos neste experimento. Pode-se observar que o gene DR5::GUS está altamente expresso em raízes, folhas e caule das plantas suplementadas com IAA 20 μ M, especialmente nos ápices das raízes e folhas comparado com o controle sem tratamento (figura 22; B e A, respectivamente). Neste tratamento com IAA (figura 22; B), podemos observar como é realizado o transporte de auxina através da planta. Foi observada também nestas plantas a formação de raízes secundárias possivelmente devido à acumulação de IAA nos lugares de diferenciação celular. Em correspondência com o esperado, no tratamento com o inibidor da auxina PCIB se observa o contrário, uma drástica diminuição da expressão de GUS e a não formação de raízes secundárias (figura 22; C). Trabalhos anteriores mostraram que o tratamento de *A. thaliana* DR5::GUS com PCIB previne o fluxo da auxina no interior dos tecidos (Oono *et al.*, 2003).

Plantas de *Arabidopsis* transformadas com DR5::GUS e tratadas com sobrenadantes de meios de cultura do fungo *M. perniciosus* nas fases necrotrófica e biotrófica (extraídos) apresentam uma morfologia atípica nas raízes; com redução da raiz principal, formação de raízes laterais e localizações da expressão de GUS somente nos ápices da raiz e folhas (figura 22; D e F, respectivamente), propondo uma quebra no transporte da auxina pelo tecido. Estes resultados sustentam a nossa hipótese de que o fungo *M. perniciosus* poderia produzir e secretar um

composto(s) semelhante à auxina já que é capaz de ativar o promotor DR5 e que estaria inibindo o transporte da auxina. No caso das plantas tratadas com extrato do meio de cultura do fungo foi observado efeito na expressão de GUS (figura 22; E) sugerindo a presença, mesmo após a extração, de algum composto capaz de estimular a produção endógena de IAA, provavelmente o triptofano.



F
Sobre
Necrotrófico

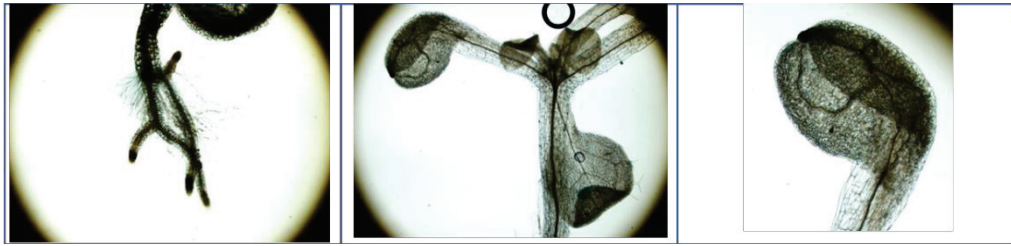


Figura 22. Ensaio histoquímico GUS com promotor de resposta à auxina DR5::GUS em *Arabidopsis thaliana*

Legenda: As plântulas foram crescidas em meios suplementados com extratos de meio de crescimento de *M. perniciosus*. (A) Mock sem tratamento; (B) plantas crescidas em 20 μ M de IAA; (C) plantas crescidas em 20 μ M de PCIB; (D) plantas crescidas em 1% (v/v) de extrato de sobrenadante de fungo biotrófico; (E) plantas crescidas em 1% (v/v) de extrato de meio de cultura de fungo; (F) plantas crescidas em 1% (v/v) de extrato de sobrenadante de fungo necrotrófico. Plântulas de 7 dias de crescimento com cada tratamento, foram sometidas a ensaio histoquímico de GUS, usando X-glc como substrato da enzima e incubada a 37°C no escuro por 12 h antes da descoloração com etanol.

Conclusões do capítulo II

- A aplicação exógena de auxina e inibidor PCIB em plântulas de cacau não interfere na indução dos sintomas.
- O fungo secreta um composto que afeta a formação das raízes de *Arabidopsis*. Este efeito é relacionado com um desbalanço nas concentrações de hormônios, entre eles a auxina da planta é um candidato.
- Composto(s) não identificado(s) secretado(s) pelo fungo causa inibição no transporte da auxina em raízes de *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo III

Objetivo III: Identificação e quantificação de metabolitos relacionados com auxina produzidos por *M. pernicioso*.

Para cumprir este objetivo, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

1. Detecção do IAA por Ressonância Magnética Nuclear (NMR).
2. Quantificação do IAA por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS).
3. Identificação de auxinas em amostras de *M. pernicioso* usando cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS).
4. Identificação das enzimas das vias metabólicas propostas para *M. pernicioso* baseado em análises do genoma.
5. Expressão dos genes envolvidos na biossíntese da auxina do fungo.
6. Análise filogenética na família das nitrilases.

A seguir se apresenta uma descrição da metodologia, resultados e discussão associada ao desenvolvimento de cada uma destas etapas.

Uma vez que todos os nossos experimentos conduzem a hipótese de que *M. perniciosa* estaria produzindo um composto com atividade semelhante à auxina, o próximo passo seria a identificação deste composto em amostras do fungo.

Na literatura tem sido relatado que a suplementação de L-triptofano a 0.1% aumenta a concentração de compostos indólicos até 1000 vezes em algumas espécies de *Rhizoctonia* (Furukawa *et al.*, 1996). Prevendo que a provável substância(s) análoga à auxina poderia estar sendo produzida(s) pelo fungo *M. perniciosa* em baixas concentrações - com relação aos limites de detecção das técnicas de identificação e quantificação de metabolitos - decidimos suplementar o meio de crescimento do fungo com triptofano no intuito de aumentar a produção dos compostos indólicos.

Metodologia

Assim sendo foram preparados meios de cultura para crescimento de fungo biotrófico e necrotrófico suplementados com triptofano (Trp) ou indol-3-acetonitrila (IAN). O triptofano é o precursor primário da via de síntese de auxina em plantas (Zhao, 2012) e o IAN o último precursor antes de formação do IAA (Park e Kriechebaumer, 2003). Os respectivos controles não foram suplementados com precursores da síntese de auxina. Tanto os tratamentos quanto os controles foram crescidos até 4 semanas a 28 °C e 200 rpm no escuro. Posteriormente, amostras de sobrenadante das culturas tratadas e controles foram submetidas ao processo de extração de ácidos seguindo a metodologia modificada proveniente de Zhang e colaboradores (2008). Para isso, todos os meios de cultura foram filtrados com papel filtro, e ajustado pH a 2.5 – 3 com 3M de HCL. Cada amostra foi extraída três vezes com acetato de etila usando um funil de separação. As fases orgânicas foram coletadas e evaporadas a vácuo em roto-evaporador até secar completamente. Os extratos foram diluídos em 2 mL de ETOH 10% ou 2 mL de Éter e foram adicionadas duas gotas de diazometano a -20 °C. Posteriormente foram incubadas a 4 °C durante 12 h. Os extratos resultantes foram usados para experimentos *in-planta* e para a identificação de metabólitos por três técnicas diferentes: Ressonância Magnética Nuclear (NMR), Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) e Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS). NMR; permite uma alta resolução na estrutura

molecular quando os compostos estão em altas concentrações, além de que é possível comparar espectros entre os diferentes equipamentos. LC-MS/MS; permite quantificar moléculas específicas com alta resolução e em baixas quantidades, mas é restringido a usar um padrão para identificar o composto e o perfil dependente do tipo de coluna utilizada no equipamento. GC-MS; permite identificar uma ampla gama de moléculas em baixas concentrações, através de comparações dos espectros com bibliotecas locais, é restringido pelo tipo de coluna e natureza das moléculas.

1. Detecção do IAA por Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Aproveitando a estreita colaboração entre o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas – SP e o LGE foi realizada a técnica de NMR sobre supervisão da Dra. Ana Carolina M. Zeri. As amostras obtidas pela metodologia anteriormente descrita foram liofilizadas e posteriormente resuspendidas em tampão B padronizado por Freund e Kalbitzer (1995). Os espectros dos átomos de hidrogênio foram adquiridos num Agilent Inova NMR Spectrometer (Agilent Technology, CA, USA) operando à 600 MHz. Foram acumuladas 256 scans com 32k pontos à 25 °C usando sequências de pulsos de supressão de água e depois analisado no programa Chenomx NMR Suite V.7.5 (Edmonton, AB, CA).

Resultados e discussão

Na figura 23 são apresentadas as superposições dos espectros obtidos comparando o extrato do sobrenadante do meio de crescimento do fungo necrotrófico induzido com IAN durante 15 dias de crescimento, uma amostra controle negativo (meio de crescimento do fungo) e o padrão de IAA. Pode-se observar que a amostra proveniente do fungo crescido em presença de IAN apresenta um espectro equivalente ao do padrão de IAA e que este espectro está ausente no controle negativo. Este resultado foi verificado em amostras de fungos necrotróficos induzidas com precursores da síntese de IAA (tanto triptofano quanto IAN). Os espectros das amostras se apresentam em forma independente no Anexo 3. Estes resultados mostram que efetivamente o fungo *M. perniciosus* é capaz de sintetizar IAA na presença de precursores da síntese deste hormônio.

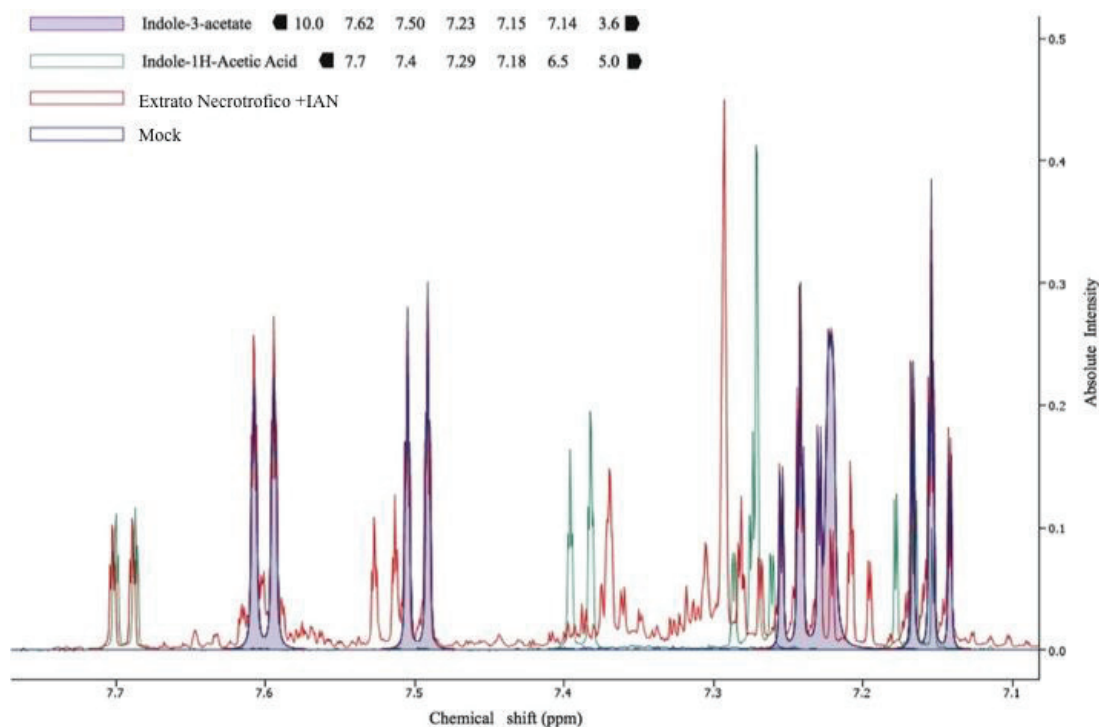


Figura 23. Detecção por NMR de IAA em meio induzido com o precursor (IAN).

2. Quantificação do IAA por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS)

Metodologia

Para quantificar a IAA produzida por *M. perniciosus* na fase necrotrófica foi realizado um estudo de *time-course* coletando amostras do sobrenadante de cultura do fungo crescido em meio suplementado com precursores da síntese de auxina (i) 4 mM de L-triptofano, ou (ii) 3 mM de IAN. As condições de crescimento e processamento das amostras foram as mesmas descritas na seção anterior. Após 3 dias de crescimento do fungo em presença dos precursores foi começado o *time-course* que consistiu na coleta de amostras em quatro tempos (3, 7, 14 e 30 dias). Cada amostra constou com uma réplica biológica. Os sobrenadantes foram extraídos com o protocolo de extração de ácidos descritos no início do capítulo e analisados por LC-MS/MS. Para a detecção dos compostos foi utilizado um detector de espectrometria de massa do tipo triplo quadrupolo, com fonte de ionização à pressão atmosférica do tipo *electrospray* assistido por

nebulização no modo positivo (ESI+) como interface entre a cromatografia líquida e o detector de massas (Acquity UPLC TQD [ultra performace] e uma coluna C18 ACQUITY UPLC BEH de 1.7 μm 2.1 x 50mm). A fase móvel “A” foi água e fase móvel “B” foi acetonitrila, ambos continham 0.15% de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi realizado em fluxo de 0.5 mL x min^{-1} , como se segue: 0-3.5 min, 1-30% de B e 3.6-4 min, 1% de B. Os espectros de massas foram obtidos no intervalo de 100-400 $[\text{M}/\text{Z}]^+$ no modo negativo. Os dados de espectrometria de massa (MS/MS) foram controlados pelo software Masslynx V4.1 (Waters, USA).

Os compostos IAA (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) e IAN (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) foram usados como padrões. Para isso cada um destes compostos foi injetado diretamente (a uma concentração a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na fonte de ionização e foram obtidos os seus tempos de retenção e os seus cromatogramas iônicos.

Primeiramente foram identificados os íons moleculares da IAA e do IAN. Brevemente, cada substância é caracterizada por um padrão de fragmentação. Este padrão é visualizado no espectro de massas em forma de picos de fragmentação, cada um com a sua massa molecular nominal $[\text{M}/\text{Z}]^+$ específica. O pico com maior valor de $[\text{M}/\text{Z}]^+$ é denominado íon molecular $[\text{M}]^+$ e representa então a massa molecular relativa do composto analisado (Pan *et al.*, 2010). Nos casos de IAA e IAN os íons moleculares são 130.5 m/z e 26.3 $[\text{M}/\text{Z}]^+$, respectivamente.

Para a quantificação das amostras tomou-se como referência uma curva analítica para cada composto em estudo, IAA e IAN. Estas curvas foram confeccionadas contendo 3 pontos de concentrações seriadas conhecidas em cada caso (100, 10 e 1 mM). Nestas análises se considera também o parâmetro cromatográfico tempo de retenção (t_R) que não é mais do que o tempo que o composto em estudo permanece na fase estacionária. Caso os compostos IAA ou IAN estejam presentes em amostras do fungo, devem ser eluídos no tempo de retenção característico de cada um dos padrões de calibração correspondente, nas mesmas condições experimentais. Os tempos de retenção dos padrões IAA e IAN foram de 2.16 min e 2.75 min, respectivamente (figura 24).

Resultados e discussão

Os dados obtidos nas análises dos padrões foram utilizados para a identificação e quantificação nas amostras provenientes do fungo. As análises dos cromatogramas obtidos indica

que a amostra de fungo necrotrófico induzido com IAN (etiquetada em verde como 13A na figura 24) possui altas concentrações de IAA (6159 foi o valor de área integrada comparado com 757 do padrão a uma concentração de 10 μ M). Entretanto, não foi detectado o precursor IAN (2.75 min) na amostra sugerindo que *M. pernicioso* é capaz de utilizar IAN para a síntese de auxina. As prováveis vias de síntese de IAA utilizadas pelo fungo são discutidas na seção seguinte.

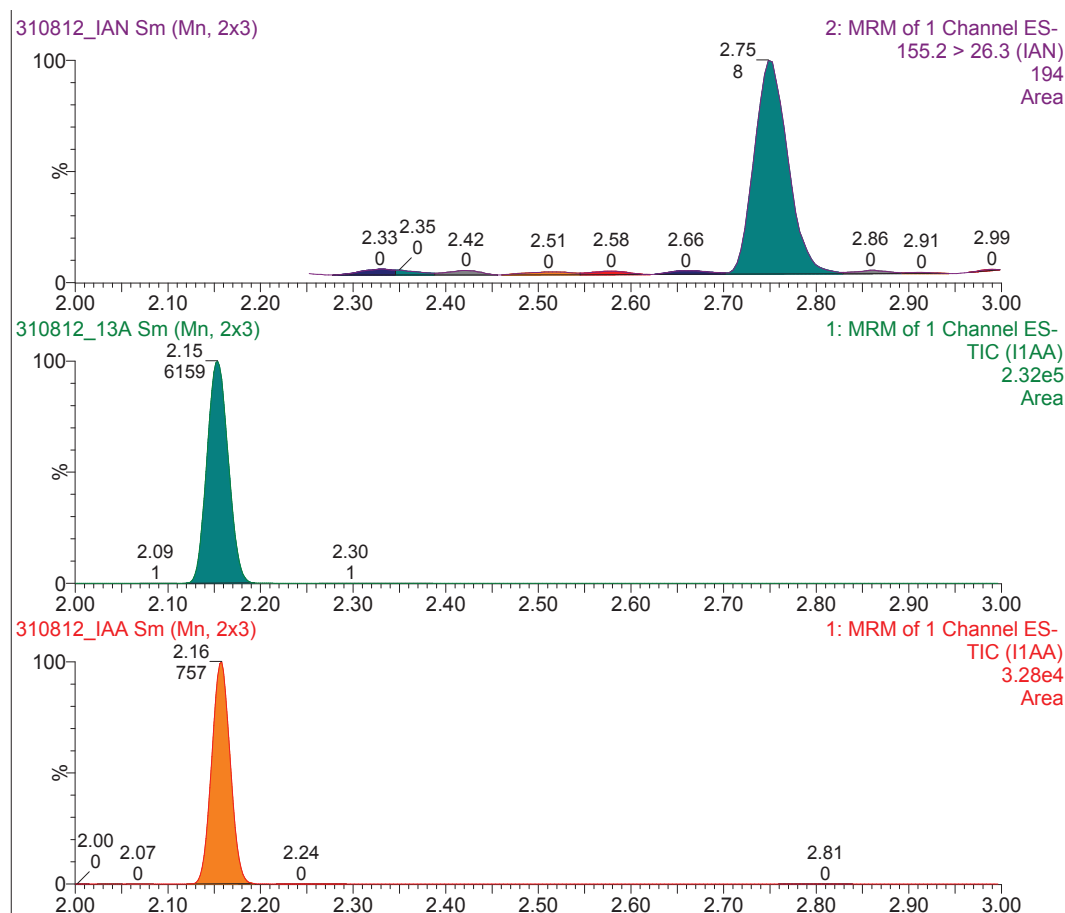


Figura 24. Análise LC-MS/MS do IAA e IAN derivado de extratos de sobrenadante de *M. pernicioso* cultivados em meio suplementado com IAN líquido de 15 dias após a inoculação.

Legenda: linha roxa: cromatograma do padrão de IAN com um tempo de retenção de 2,75 min; linha verde: cromatograma do extrato sobrenadante do fungo necrotrófica (amostra 13A) em meio suplementado com IAN. O pico a 2,15 min tem o mesmo tempo de retenção que o padrão de IAA (linha vermelha) e o espectro de massa foi semelhante ao do ácido indol-3-acético.

A tabela 5 apresenta o *time course* da produção de auxina de *M. pernicioso* na fase necrotrófica durante um mês (Anexo 4). Pode-se observar que a produção de IAA foi detectada por LC-MS/MS numa concentração de 0.52 μ M, mesmo sem a adição de triptofano (Trp) ou IAN no meio de cultura. Entretanto, a suplementação do meio com Trp aumenta a concentração de

IAA até 486 μM . Nestas culturas verifica-se um aumento da produção de IAA no tempo até os 14 dias onde atinge esse máximo. As análises mostram que *M. pernicioso* não utilizou todo o Trp adicionado no meio para produzir IAA (tabela 5 e Anexo 4). Interessantemente, quando o Trp do meio de crescimento acaba (dia 30), o IAA foi rapidamente metabolizado (dia 30). Este comportamento pode ser explicado (i) porque a partir do triptofano são sintetizados outros metabolitos que podem ou não pertencer à via de biossínteses do IAA (Mujahid *et al.*, 2011) e (ii) porque o IAA pode ser catabolizado em outros produtos (Kumavath *et al.*, 2010). Quando IAN foi adicionado ao meio de cultura, se observa que é convertido em IAA (tabela 5) logo após 3 dias de iniciado o experimento. Neste caso também não foi detectada acumulação de IAA no sobrenadante de cultura do fungo (tabela 5; dia 7 para frente).

Tabela 5. Quantificação por LC-MS/MS do IAA e precursores de culturas líquidas de *M. pernicioso*.

Tempo (dias)	Meio com triptofano (4mM)		Meio com IAN (3mM)	
	TRP	IAA	IAN	IAA
	(media $\pm$ SD) μM	(media $\pm$ SD) μM	(media $\pm$ SD) μM	(media $\pm$ SD) μM
3	688.8 $\pm$ 74.0	99.0 $\pm$ 23.1	403.1 $\pm$ 39.8	3015.8 $\pm$ 111.2
7	92.1 $\pm$ 1.6	168.2 $\pm$ 76.2	3.3 $\pm$ 0.2	231.3 $\pm$ 46.9
14	71.8 $\pm$ 11.2	486.0 $\pm$ 86.6	1.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0
30	9.1 $\pm$ 1.1	3.7 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0

3. Identificação de auxinas em amostras de *M. pernicioso* usando GC-MS

Paralelamente às técnicas de identificação e quantificação anteriormente descritas, foi utilizada também a técnica de GC-MS. As amostras coletadas do sobrenadante de crescimento do fungo em meios de cultura suplementados com precursores da síntese de auxina (Trp e IAN) foram utilizadas para a detecção de IAA e outros metabolitos indólicos usando um detector de GC-MS.

Metodologia

As amostras extraídas foram reduzidas de volume e posteriormente foram derivatizadas com 50 μL N, O-bis(trimetilsilil -acetamida) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) ou com diazometano antes da análise por GC-MS. As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo de gás GCT-Premier Waters, equipado com uma coluna Agilent HP-5 MS. O hélio foi utilizado como gás transportador com uma coluna de 1 mL min^{-1} . A temperatura do forno foi fixada em $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, depois aumentada para $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, e posteriormente elevada para $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, e mantida durante 2 min. Os dados espectrais foram obtidos com a energia de ionização de 70 eV e faixa de varredura de massa foi a 50-700 amu. A temperatura da fonte do MS foi fixada em $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. O volume de injeção foi de 1 μL . O experimento foi executado três vezes para verificar reprodutibilidade dos resultados. A faixa de varredura foi 29-540 $[\text{M/Z}]^{+}$. Os compostos em análises foram identificados através da comparação com os padrões disponíveis comercialmente na biblioteca de referências do equipamento NIST (98) com probabilidades superiores a 70%. Adicionalmente foi utilizado o índice de retenção (minutos) do IAA e IAN como parâmetro para a identificação

Resultados e discussão

A análise dos cromatogramas iônicos das amostras do fungo crescido com Trp ou IAN permitiu a identificação de picos cromatográficos com um núcleo comum do indol 130 $[\text{M/Z}]^{+}$ provavelmente correspondente aos metabolitos da via de biossíntese de IAA e/ou subprodutos (figura 25 e 26, respectivamente).

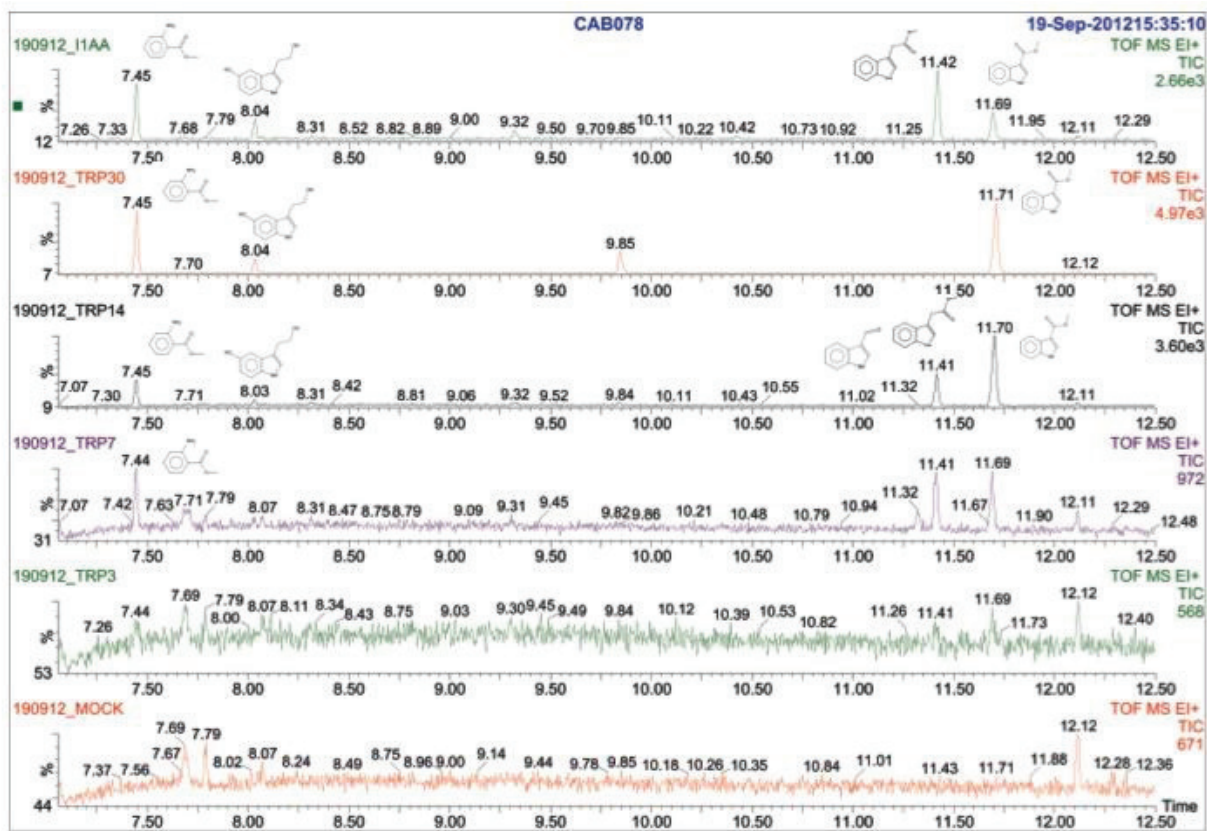


Figura 25. Detecção de GC-MS e quantificação de IAA e derivados do indol produzidos por *M. perniciosus* em culturas líquidas suplementadas com Trp.

Legenda: os sobrenadantes das culturas necrotróficas suplementadas com 0.8% de L-Trp foram extraídos, derivatizados e analisados por GC-MS/MS. Mock era um meio suplementado com triptofano, mas não inoculado com o fungo. O *time-course* foi coletado em 3, 7, 14 e 30 dias após da inoculação, com quatro secções meio de cultura contendo micélio necrotrófico cada um. Um padrão de IAA foi adicionado ao meio de cultura suplementado com fungos e, em seguida, extraiu-se 30 dias após a semeadura e usado como um controle interno. Todos os procedimentos foram realizados utilizando as mesmas proporções relativas. Antranilato (7.45 min), triptofol (8.04 min), IAN (11.36 min), IAA (11.43 min), indol-3-carboxílico (11.70 min).

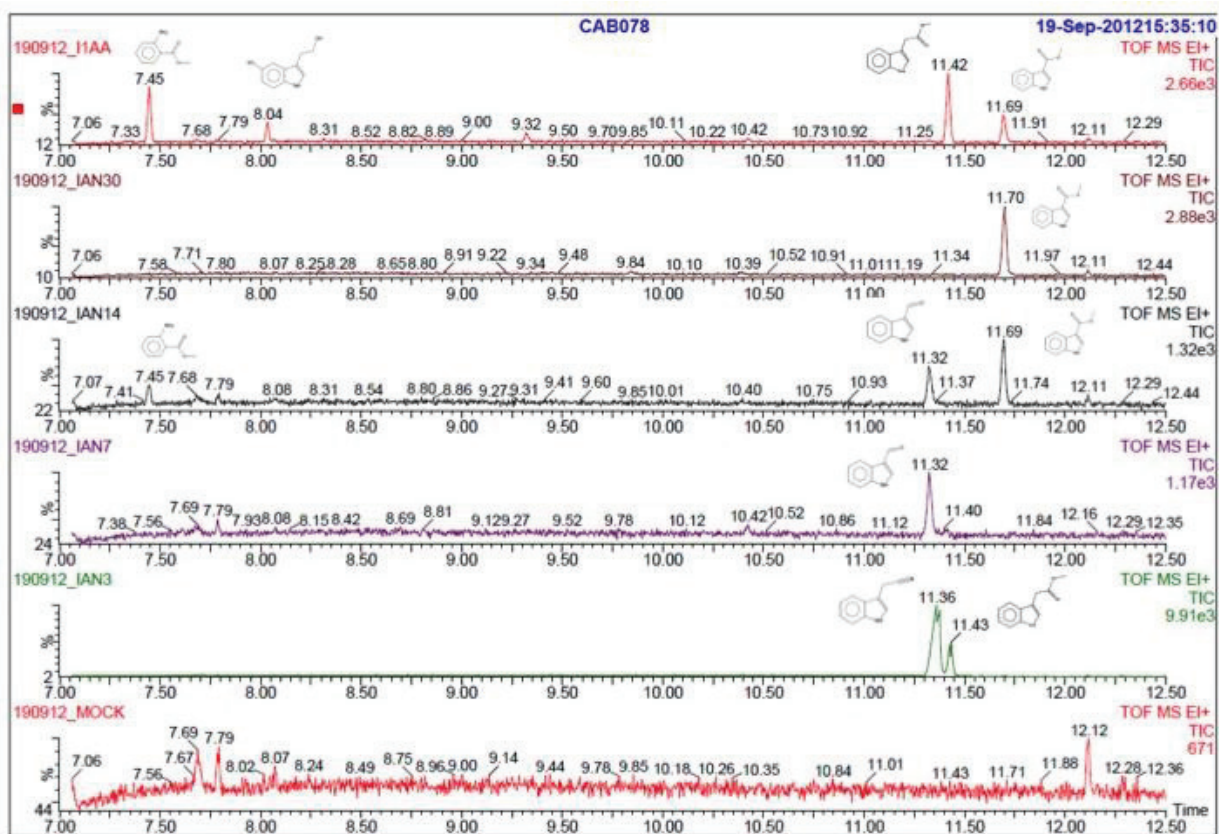


Figura 26. Produção de ácido indol-3-acético (IAA) e acumulação de ácido indol-3-carboxílico e outros derivados, em culturas de *M. perniciosus* suplementadas com IAN.

Legenda: GC-MS cromatogramas obtidos a partir dos extratos de culturas líquidas suplementadas com IAN aos 3, 7, 14 e 30 dias após a inoculação. IAN (11.36 min) foi convertido rapidamente em IAA (11.43 min) e indol-3-carboxílico (11.70 min) acumulados durante até 30 dias após a inoculação.

Em seguida, passamos a identificação de cada metabólito intermediário produzido durante o *time course* da cultura do fungo necrotrófico (aos 3, 7, 14 e 30 dias).

Decidimos comparar os intermediários e derivados indólicos identificados com aqueles produzidos pelas vias de síntese de IAA descritas previamente em bactérias, fungos e mesmo em *M. perniciosus* (Mondego *et al.*, 2008). Isso, no intuito de validar quais via(s) biossintéticas de auxina estariam sendo utilizadas pelo fungo *M. perniciosus*. A figura 27 apresenta os intermediários e os metabólitos principais derivados da via de IAA que foram identificados. Três destes metabolitos, antranilato, indol-3-carboxaldeído (IALD) e indol-3-carboxílico (ICA) foram se acumulando progressivamente acompanhando a produção de IAA no tempo (figura 26, em 11.70, 7.45 e 11.97 min, respectivamente, depois dos 14 dias de crescimento). Entretanto, pode-

se observar que os compostos indol-3-piruvato (IPyA) e indol-3-acetaldeído (IAALD) são produzidos mas não acumulados ao longo do tempo do experimento (figura 25). É conhecido que IPyA é um intermediário muito instável e decompõe-se naturalmente para produzir outros compostos indólicos, incluindo IAA (Tanaka *et al.*, 2011).

A figura 27 apresenta um resumo das vias biossintéticas de auxina propostas em bactérias e fungos. A sobreposição dos nossos resultados de identificação de compostos indólicos sugere a via de síntese de auxina que estaria sendo utilizada por *M. perniciosus*. Assim, pode-se observar que foram identificados os derivados indólicos das vias da IPA, IAM e IAN previamente descritas por Woodward e Bartel (2005). A via da IPA mostrou-se como a via dominante quando o Trp é adicionado ao meio de cultura do fungo. Neste mesmo meio foi observado também a acumulação do triptofol (figura 25; 8.04 min). Este composto tem sido proposto que serve como reservatório de IAA e mantém os níveis de IAALD em equilíbrio em plantas (Brown e Purves, 1980). No caso dos meios de cultura do fungo suplementado com IAN, pode-se observar que este intermediário foi rapidamente convertido em IAA, e subsequentemente, a auxina foi metabolizada a IALD; e por último o IALD foi convertido ICA (figura 26, depois do dia 14 em 11.70 e 11.97 min). Em plantas, IALD e ICA são acumulados nas células servindo de substratos na via de biossíntese da camalexina (Böttcher *et al.*, 2009). Na conclusão geral se discutirá o papel que poderia ter a camalexina na patogenicidade do fungo.

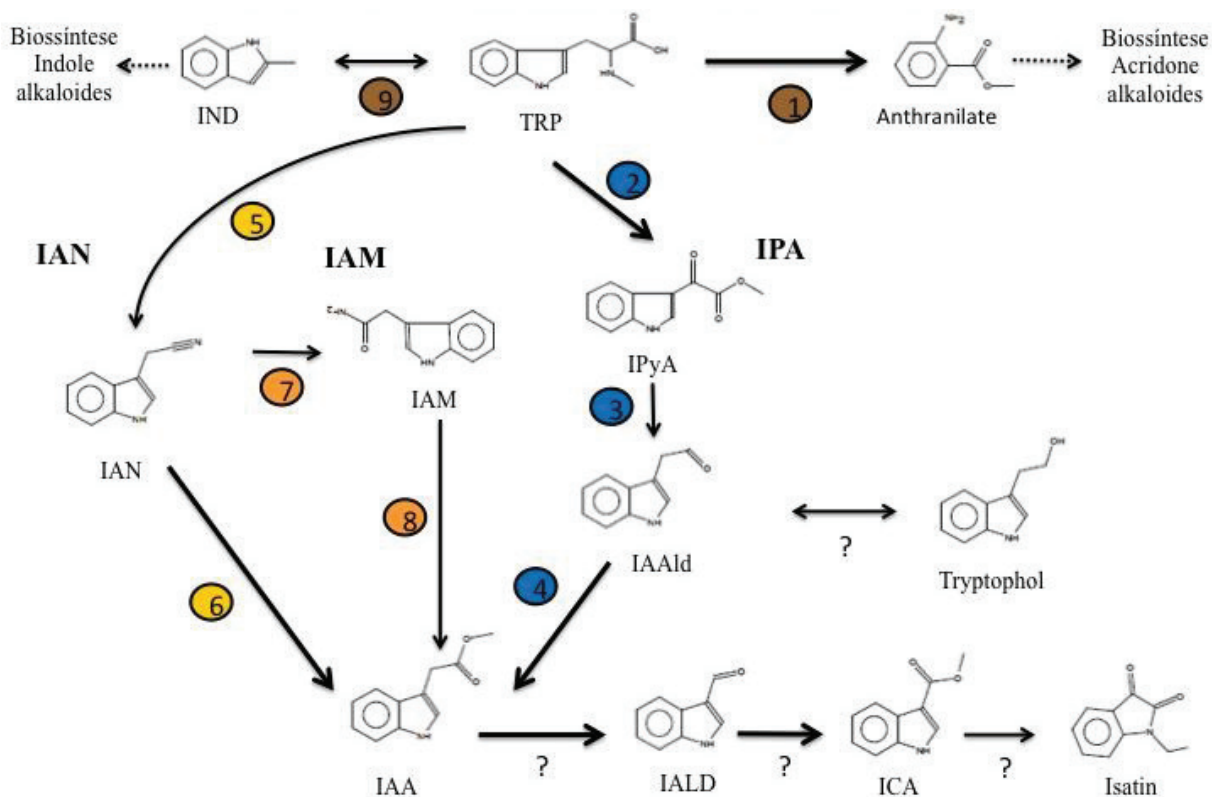


Figura 27. Vias biossintéticas sugeridas para *M. perniciosa* para a produção de IAA dependentes do Trp.

Legenda: As vias propostas para o catabolismo do Trp baseia-se num *time-course* de intermediários detectados por GC-MS e a evidência de algumas das enzimas obtidas a partir da literatura (Spaepen *et al.*, 2007; Spaepen e Vanderleyden, 2010). Círculos com números indicam as enzimas referidos na tabela 6. Três vias biossintéticas do IAA são propostas para existir em *M. perniciosa*: IAN (indol-3-acetonitrila, no amarelo), IAM (indol-3-acetamida, cor de laranja), e IPA (indol-3-ácido pirúvico, em azul). Enzimas da via dos alcaloides indólicos estão em castanho. TRP, L-Trp; IpyA, ácido indol-3-pirúvico; IND, indol; IAA, ácido indol-3-acético; IAM, indol-3-acetamida; IAN, indol-3-acetonitrila; ICA, indol-3-ácido carboxílico; IAALD, indol-3-acetaldeído e IALD, indol-3-aldeído.

4. Identificação das enzimas das vias metabólicas propostas para *M. perniciosa* baseado em análises do genoma.

Uma vez demonstrado que *M. perniciosa* produz IAA e proposto às vias metabólicas que o fungo utiliza para a síntese deste composto, passamos às análises do seu genoma para a identificação das enzimas potencialmente envolvidas na produção do hormônio. Para isso, procuramos na montagem do genoma do fungo *M. perniciosa* as enzimas envolvidas na síntese de IAA previamente descritas para microrganismos (Spaepen *et al.*, 2007; Spaepen e Vanderleyden, 2010), incluindo *M. perniciosa* (Mondego *et al.*, 2008), usando a ferramenta BLASTP. Vale a pena ressaltar que a montagem do genoma de *M. perniciosa* utilizada para este

trabalho inclui maior cobertura do que o draft do genoma publicado em 2008, no qual foram montados 18000 *contigs* e uma cobertura do genoma de 1.92X. A versão mais recente da montagem do genoma (http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/perniciosa_v3/) contém menos de 300 *contigs* com uma cobertura de 40X o genoma do fungo, oferece a possibilidade de ter genes completos e precisão nas anotações dos genes. Já em 2008 o nosso grupo tinha identificado no genoma de *M. perniciosa* os genes para: Trp decarboxilase, amina oxidase e uma triptamina oxidase. Essas enzimas fazem parte das vias de TAM (triptamina) e IPA (indol-3-piruvato), e foram referenciadas no manuscrito do genoma como potencialmente envolvidas na síntese da auxina (Mondego *et al.*, 2008). Neste trabalho, aproveitamos os últimos avanços na genômica deste patógeno para aprofundar na caracterização das vias em procura dos genes chaves que compõem todas as possíveis vias para a síntese auxina do fungo *M. perniciosa*. Assim temos um panorama mais amplo do potencial bioquímico que o fungo poderia gerar durante a infecção.

Resultados e discussão

Os genes candidatos de *M. perniciosa* para as vias de biossíntese do IAA foram identificadas utilizando como critério de identidade significativa (*e-value* <0,005 e identidade > 30%). Estes resultados são apresentados na tabela 6. Pode-se observar que foi identificada a maioria dos genes que codificam para as enzimas necessárias para o funcionamento das vias do IPA, IAM e do IAN. Mas não está claro ainda quais são as enzimas que fazem parte do catabolismo do IAA para formar IALD, ICA e finalmente Isatin. A proposta foi baseada no modelo de Kumavath *et al.* (2010) e nos tempos de aparecimento dos compostos no cromatogramas do GC-MS. Curiosamente, três membros putativos da via IPA (MP05600, MP5598, MP05180) estão localizados num *cluster* numa região de 6336 bp. Em bactérias é comum encontrar este tipo de genes em clusters formando operons (Leveau e Gerards, 2008).

Tabela 6. Enzimas putativas envolvidas na via de biossíntese do IAA em *M. perniciosa*.

Num	MP Gene	Gene	Nome enzima	Número EC	% Identida Blastp	Organismo Referência	Código Kegg
1	MP02299 MP05600	bn2	Indoleamine 2,3-dioxygenase	1.13.11.52	62	<i>Coprinopsis cinerea</i> gb EAU88739.2	K00463
1	MP05180	trpC	Indole-3-glycerol phosphate synthase	4.1.1.48	68	<i>Coprinopsis scobicola</i> gb CAC41002.1	K13501
2	MP08247 MP05598	kat1	Aromatic amino acid (trp) transferase	2.6.1.27	38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp P38840.3	K14265
3	MP01945	ipdC	Indole-3-pyruvate decarboxylase	4.1.1.43	70	<i>Punctularia strigosozonata</i> . EIN12769.1	K04103
4	MP11796	iad2	Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase	1.2.1.3	62	<i>Ustilago maydis</i> FB1 gi 1658175	K14085
5	MP09667 MP15654	myr	Myrosinase	3.2.1.147	45	<i>Verticillium dahlia</i> gi 346972977	K01237
7	?	nth	Nitrile hydratase	4.2.1.84	-	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	K01721
8	MP12757	gmd A	Amidase	3.5.1.4	54	<i>Laccaria bicolor</i> gb EDR04307.1	K01426
9	MP12307	trp1	bifunctional tryptophan synthase	4.2.1.20	81	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001874776.1	K01694

5. Expressão dos genes envolvidos na biossíntese da auxina do fungo.

Com o intuito de verificar se a expressão dos genes candidatos para as vias biossintéticas do IAA, encontrados no genoma de *M. perniciosus* (tabela 6), são co-regulados durante diferentes fases de vida do fungo, foi realizada uma análise de co-expressão gênica usando dados de expressão de RNA-seq de amostras coletadas em diferentes estágios de desenvolvimento do fungo *M. perniciosus* crescido em meio de cultura líquido.

Metodologia

Dados de sequenciamento de RNA fúngicos de *M. perniciosus* em estilos de vida foram obtidos a partir de pesquisas realizadas por o estudante de doutorado de nosso laboratório, as quais foram publicados no manuscrito final para obter o título de doutor (Teixeira *et al.*, dados não publicados). A descrição do material biológico aparece detalhada em Paulo J.P.L. Teixeira *et*

al. (2012). As seguintes bibliotecas de RNA fúngicas foram usadas: BDA4, basidiomas formado; PRD1, primórdio de basidiomas; GE1, esporos germinando; NGS1, esporos não germinando; BIO7, o estágio biotrófico micelial de 7 dias após a inoculação; PTA1, o estágio biotrófico micelial 14 dias após a inoculação; SAP7, o estágio necrotrófico micelial de 7 dias após a inoculação; NEC14, o estágio necrotrófico micelial de 14 dias após a inoculação; SB1, o estágio biotrófico micelial 28 dias após a inoculação, e NS28, o estágio necrotrófica micelial 28 dias após a inoculação. Foram contrastadas; Basidio = BDA4 vs PRD1; Germina = GE1 vs NGS1; Bio7 = PTA1 vs BIO7; Bio14 = PTA1 vs SB1; Nec7 = NEC14 vs SAP7 e Nec14 = NS28 vs NEC14.

Os *fold-change* foram calculados usando o RPKM para cada gene de *M. pernicios*, utilizando o algoritmo BLASTN. Em seguida, as matrizes foram agrupados usando a correlação de Spearman e algoritmos de ligação centroide contido no pacote CLUSTER V 3 (de Hoon *et al.*, 2004). A aplicação Java Tree View (Saldanha, 2004) foi usada para ver os resultados de agrupamento gerados.

Resultados

Pode-se observar que os genes que codificam para as enzimas 5 e 6 (tabela 6) potencialmente envolvidas na via do IAN (amarelo) estão co-regulados atingindo o maior nível de expressão durante a germinação dos esporos e nos pontos que caracterizam à fase biotrófica de desenvolvimento do fungo (micélio monocariótico).

As nitrilases são enzimas que catalisam a conversão do indol-3-acetonitrila à auxina IAA (Bartling *et al.*, 1992). Na nova versão do genoma de *M. pernicios* foram identificadas 5 proteínas com similaridade com genes que codificam nitrilases (identidade >30% e e-value < 0.001), a diferencia da primeira versão onde só foi possível encontrar 4 genes (Mondego *et al.*, 2008). Na figura 28 pode-se observar que o perfil de expressão do gene mpNit2 (MP04374), não agrupou com os outros membros das nitrilases, Contrariamente, mpNit2 parece estar mais relacionado com o perfil de expressão da via do IPA (figura 28, em azul). Adicionalmente, mpNit2 apresentou uma alta expressão durante a fase necrotrófica do desenvolvimento de *M. pernicios*.

Foi verificada também a expressão dos genes que codificam para enzimas envolvidas na biossíntese do alcaloide acridona, como indoleamina 2,3-dioxigenase e indol-3-glicerol-fosfato

sintase, enzimas envolvidas na conversão do triptofano a antranilato, composto relacionado com a resposta de defesa em *Arabidopsis* e conservado em fungos como *S. cerevisiae* (Niyogi e Fink, 1992), posteriormente o antranilato pode virar alcaloides de acridona através de uma acridona sintase (Rohde *et al.*, 2008), estes alcaloides poderiam estar relacionados com atividade antifúngica contra outros fungos oportunistas (Bohlmann *et al.*, 1996). Os genes que codificam para estas duas enzimas foram co-expressos com as enzimas da via do IPA (figura 28, enzimas 1 e 9; em castanho). Estes resultados levam à hipótese de que a síntese tanto do alcaloide acridona quanto dos compostos indólicos (IAA) seriam ativados no estágio necrotrófico do desenvolvimento de *M. perniciosus* (14 dias após iniciado o crescimento do fungo) usando como substrato, o triptofano. Este resultado foi coerente com o perfil cromatográfico característico da fase necrotrófica do fungo *M. perniciosus* obtido por GC-MS, o qual mostra que ocorre uma acumulação progressiva de antranilato e indol após sete dias de crescimento do fungo (figura 26).

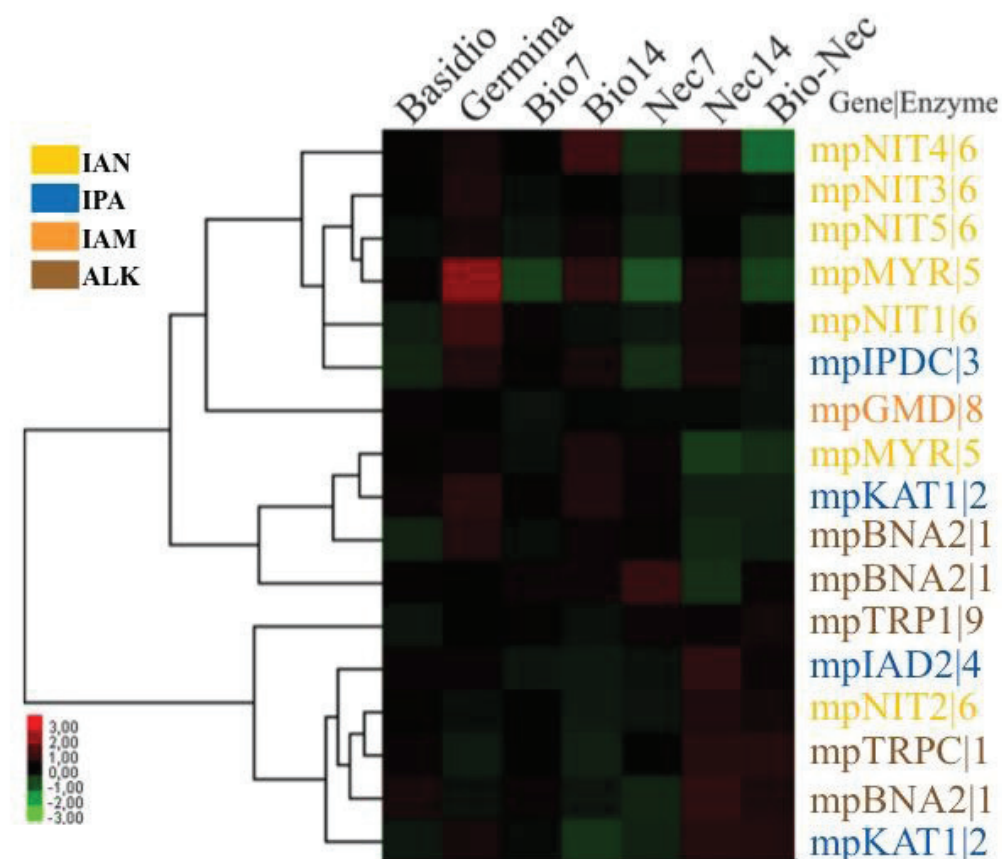


Figura 28. Perfil transcricional das enzimas putativas para a biossíntese do IAA em todo o ciclo de vida de *M. perniciosa* com base em dados de RNA-seq

Legenda: *Fold-change* foi calculado comparando os RPKMs (*reads* por kilo base por milhão) de cada gene contra cada condição de controle. Nas matrizes foram agrupados usando software CLUSTER 3. Basidio, basidiomas; Germina, germinação de esporos; Bio7, Micélio biotrófico aos 7 dias após a inoculação; Bio14, Micélio biotrófico aos 14 dias após a inoculação; Nec7, micélio necrotrófico aos 7 dias após a inoculação; Nec14, micélio necrotrófico aos 14 dias após a inoculação, e Bio-Nec, transição de fase de biotrófico a necrotrófico. As cores indicam enzimas pertencentes a vias para biossíntese do IAA. Números após nomes de genes referem-se às anotações na Tabela 3.

Sendo assim, podemos concluir que em *M. perniciosa* parece estarem funcionais nas diferentes fases de vida do fungo, as vias de síntese de auxina IPA e IAN. Contrariamente na via IAM só foi encontrada uma enzima putativa e esta não apresenta variação na expressão em nenhum estágio do fungo (figura 28; enzima 8 em laranja).

6. Análise filogenética na família das nitrilases

As nitrilases atuam na biossíntese de IAA em plantas (Bartling *et al.*, 1992). Estas enzimas atuam principalmente na detoxificação de compostos cianogênicos através da degradação de B-cianoalanina produzindo asparagina ou ácido aspártico mais amônia, até agora só em apenas algumas famílias das Angiospermas as nitrilases são capazes de converter indol-3-acetonitrila em indol-3-acetoácido (Piotrowski, 2008). O outro grupo de nitrilases é o das homólogas à NIT1 de *A. thaliana*, este muito mais reduzido se limita à família Brassicaceae e possuem atividade de produção de auxina e também atuam no metabolismo de compostos secundários (Piotrowski, 2008).

Na primeira versão do genoma de *M. pernicioso* (Mondego *et al.*, 2008) foram identificadas duas enzimas que podem no último passo para a biossíntese de IAA. Uma delas é uma nitrilase putativa, MpNIT1, a qual foi clonada e sequenciada, demonstrando alta similaridade com nitrilases de plantas de ambos os grupos, mas predominantemente com o grupo NIT4 (Resultados do trabalho de iniciação científica do aluno de biologia Marcos Enrique Morais).

Assim, seria interessante analisar a evolução desta família de proteínas em fungos do gênero *Moniliophthora*, já que a espécie *M. pernicioso* é a única que consegue infectar ramos e induzir as vassouras, entre tanto *M. roreri* só infecta frutos. Assim, as nitrilases poderiam ser chave para a formação de IAA por vias alternas a partir de aminoácidos induzidos durante a infecção.

Metodologia

Os dados do genoma de *M. roreri* (dados não publicados; <http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/oreri/>) foram utilizados para a identificação dos genes codificadores das nitrilases já caracterizados em *M. pernicioso*. Foi feito alinhamento da sequência de nucleotídeos da região codificadora (éxons) mais conservada de cada gene da nitrilase (figura 29; B). A abordagem filogenética foi inferida pelo método Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987). A árvore ideal é apresentada na figura 29 (A) com a soma do comprimento dos ramos = 3.3722. A árvore está desenhada à escala, com comprimentos dos ramos nas mesmas unidades como os das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson e estão dadas em unidades do número de substituições de aminoácidos por site. A análise envolveu 10 seqüências de aminoácidos. Todas as posições que contêm lacunas e dados faltantes foram eliminadas.

Houve um total de 144 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

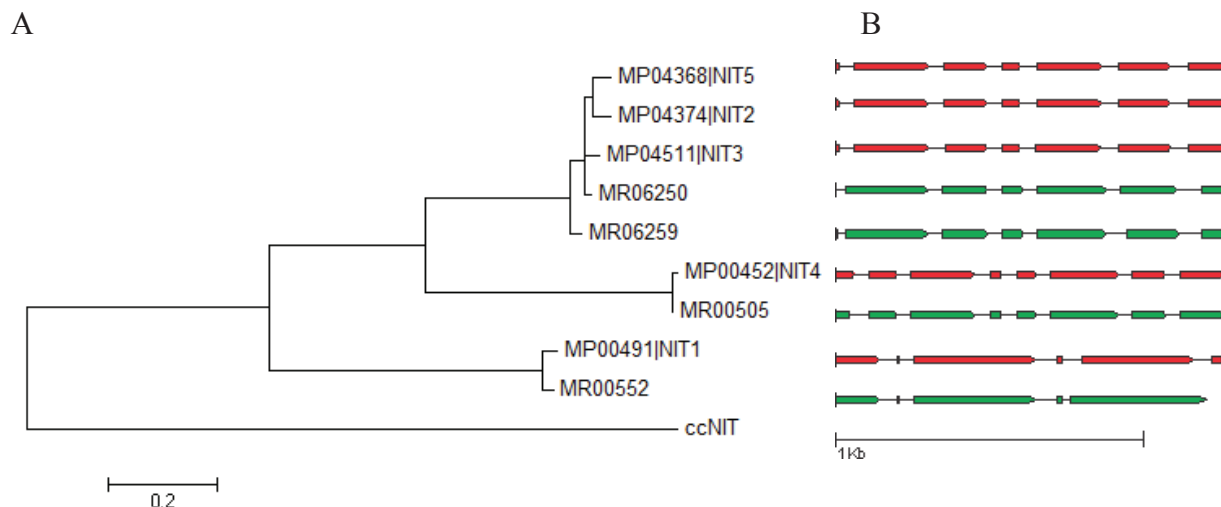


Figura 29. Relação filogenética dos genes das nitrilases nos genomas de *M. pernicioso* e *M. roreri*.

Legenda: A região mais conservada dos éxons dos genes das nitrilases foi usada para analisar a história evolutiva com o método de Neighbor-Joining. A, árvore filogenética. B, diagrama da estrutura gênica. Em vermelho, estrutura dos genes Nit de *M. pernicioso*. Em verde, estrutura dos genes Nit de *M. roreri*.

Esta abordagem mostrou que quase todos os genes da família das nitrilases identificada em *M. pernicioso* tem um ortólogo em *M. roreri*, com exceção da nitrilase 2 (mpNit2). Das análises filogenéticas pode-se inferir que o gene da nitrilase no genoma de *M. pernicioso* tem sofrido eventos consecutivos de duplicação já que os genes apresentam identidade entre eles de >90%. Além disso, os genes codificadores das nitrilases 2 e 5 (mpNit2 e mpNit5) estão localizados no mesmo locus genômico (contig sctg_0045_0001: região 112000-118000 pb), com uma distância entre eles de não mais do que 10 Kb. Interessantemente, flanqueando este *cluster* das nitrilases se encontram dois genes codificadores de proteínas hipotéticas com funções desconhecidas. A figura 29 (B) apresenta um diagrama com a estrutura de cada um dos genes das nitrilases identificados. Pode-se observar que existe conservação tanto no número de íntrons e éxons quanto na orientação dos genes MpNit2, MpNit3 e MpNit5 e estes genes formam um grupo evolutivo independente das outras nitrilases junto com o ortólogo da MpNit2 em *M. roreri* (MR06250). Estes dados sugerem que eventos de duplicação devem ter acontecido no ancestral destes dois organismos antes da diversificação das duas espécies. Assim, podemos hipotetizar que o gene da MpNit2 (MP04374), divergiu por duplicação num ancestral comum a estes dois

fungos. Existem relatos prévios de que eventos de duplicações nesta família gênica têm acontecido em plantas de milho e que estes genes têm adquirindo perfis de expressão diferentes dependendo do tecido da planta (Park e Kriechbaumer, 2003). A especialização das nitrilases poderia ter um papel fundamental durante a infecção do fungo nos ramos de cacau; por exemplo, conferindo-lhe ao fungo maior capacidade de produção de IAA e causando suscetibilidade do tecido à infecção.

Discussão do Capítulo

Examinamos a via biossintética do IAA em culturas líquidas de *M. perniciosa* analisando produtos intermediários e realizando experimentos de indução do IAA. Provou-se que o triptofano é um indutor e um precursor da via do IAA em *M. perniciosa*, consistentes com relatos prévios que propõem que o triptofano estaria envolvido na biossíntese de IAA em muitas espécies, incluindo fungos (Normanly, 2010). De acordo com os nossos dados, *M. perniciosa* foi capaz de utilizar as vias IPA e IAN para sintetizar IAA, mas a via dominante foi o ácido indol-3-pirúvico (IPA), uma via típica em plantas com flores (L-triptofano → indol-3-pirúvico ácido → indol acetaldeído → IAA). Tanaka e colaboradores (2003) encontraram resultados semelhantes pesquisando a vassoura do bambu causada por *Aciculosporium take*. Vias biossintéticas do IAA dependentes de triptofano, também têm sido descritas em bactérias tais como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi* e *Rhizobium*, através das vias do indol-3-acetamida (IAM) e/ou indol-3-acetonitrila (IAN) (Yamada *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1995). Tem sido documentado que a existência de vias redundantes em organismos fitopatogênicos, pode estar contribuindo independentemente a diferentes aspectos do ciclo de vida como por a patogenicidade ou a maior adaptação epífita. Assim por exemplo, as vias da IPA e IAM estão adaptadas para estar mais ativas em superfícies das plantas e no apoplasto, respectivamente (Manulis *et al.*, 1998). Após estas consideração sugere-se que *M. perniciosa* teria a capacidade de utilizar preferencialmente diferentes vias metabólicas para sintetizar o IAA dependendo do tecido da planta que está sendo infectado.

Verificou-se, também que outros derivados de indol são produzidos e acumulados por *M. perniciosa* em culturas líquidas induzidas por triptofano, tais como o triptofol, antranilato e

isatina, estes últimos têm sido relacionados com atividade antifúngica (Yue *et al.*, 2000; Nidiry e Babu, 2005), podendo então desempenhar um papel na resistência a outros microrganismos. A virulência de muitas plantas e fungos patógenos de animais envolve a capacidade de sofrer transições morfológicas (Hogan, 2006). O triptofol e as baixas concentrações de nitrogênio no meio são usados por *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* como sinalizadores extracelulares para regular a filamentação e o *quorum-sensing*, permitindo responder à densidade celular e ao estado nutricional do ambiente (H., Chen e G., Fink, 2006). Assim, *M. pernicioso* poderia usar esta molécula extracelularmente para transmitir informações sobre a densidade populacional e como sensor das condições ambientais nas que se encontra. Curiosamente, outro importante metabolito acumulado foi o ácido indol-3-carboxílico (ICA). ICA pode ser conjugado a uma cisteína por uma enzima GH3.5 para formar indol-3-acil-cisteinato (ICA-Cis) que é um precursor das camalexinas (Wang *et al.*, 2012). Rogers e colaboradores (1996) relataram que a camalexina exibe citotoxicidade contra as bactérias gram-negativas e também é tóxica para as células de *Arabidopsis in-vitro*. No entanto, alguns fungos apresentam resistência à camalexina devido tanto à degradação ativa (Glawischnig, 2007) como a uma descodificação eficiente na célula. *Botrytis cinerea*, tem um mecanismo de resistência contra a camalexina usando transportadores ABC que funciona como ex-fluxo de compostos fungitóxicos, sendo, portanto, um fator de virulência durante a infecção em plantas (Stefanato *et al.*, 2009). Assim, *M. pernicioso* poderia estar promovendo a morte celular vegetal por um excesso de produção de camalexina ou ao mesmo tempo, resistir às altas concentrações do metabolito usando algum transporte multidroga de efluxo.

Encontramos no genoma de *M. pernicioso* algumas das principais enzimas putativas envolvidos nas vias de biossíntese da auxina e sua expressão gênica em nossas bibliotecas fúngicas de RNA-seq. Enzimas do via IPA são mais expressos durante a fase necrotrófica, enquanto as enzimas IAN apareceu mais ativo na fase inicial de crescimento. O fato de que fitopatógenos sejam capazes de produzir auxina através de diferentes vias de síntese lhes confere a vantagem de ativar aquelas rotas metabólicas que não são reguladas (ou estão fracamente reguladas) pela planta, possibilitando a acumulação de grande quantidade de IAA no local da infecção. Esta acumulação de IAA facilitaria a invasão e patogenicidade do fungo pela supressão das respostas de defesa da planta (Manulis *et al.*, 1998). Assim, *M. pernicioso* usaria diferentes

vias biossintéticas para produzir IAA, dependendo do microambiente e estádios de desenvolvimento do fungo.

Conclusões do Capítulo III

- *M. perniciosa* produz ácido indol-3-acético (IAA, a auxina natural) em meios suplementados com os precursores triptofano e indol 3-acetonitrila (IAN).
- O IAA produzido por *M. perniciosa* não é acumulado, é rapidamente convertido em metabolitos de outras vias indólicas.
- Foram propostas três vias (IPA, IAN, IAM) de biossínteses do IAA em *M. perniciosa* baseada em (i) identificação e quantificação de metabólitos produzidos pelo fungo em culturas suplementadas com precursores da síntese de auxina mediante GC-MS; e (ii) identificação no genoma de *M. perniciosa* de genes codificadores de enzimas envolvidas na síntese de IAA.
- Verificamos a produção pelo fungo de triptofol, indol-3-carbaldeído (ICA) e outros alcaloides de natureza indólica (antranilato e isatin). Sugerimos que estes compostos poderiam ser utilizados pelo fungo com fatores de virulência e no controle da mudança de fases do fungo da fase biotrófica para necrotrófica.
- As nitrilases em *M. perniciosa* confeririam ao fungo maior plasticidade para sintetizar IAA dependendo do ambiente e fase de desenvolvimento do fungo.

Capítulo IV

Objetivo IV: Análise dos efeitos *in planta* de um composto produzido por *M. pernicioso*, semelhante à auxina (*auxin-like*).

Para cumprir este objetivo, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

1. Identificação de metabolitos com potencial análogo à auxina (*auxin-like*).
2. Estudo dos efeitos do IAA em sementes de *A. thaliana* mediante utilização do sistema DR5::GUS

A seguir se apresenta uma descrição da metodologia, resultados e discussão associada ao desenvolvimento de cada uma destas etapas.

Como foi descrito no capítulo anterior, sugerimos que a auxina é sintetizada por *M. perniciosa* através de várias vias metabólicas redundantes. Estas vias têm sido descritas previamente na literatura fazendo parte do metabolismo de microrganismos produtores de auxina. Entretanto, a maior parte das enzimas envolvidas nestas vias não está bem caracterizada (Zhao, 2010). Ao contrário, inibidores da sinalização da auxina, sejam estes produzidos na natureza ou por via sintética, têm sido investigados mais exaustivamente (Rybel e Audenaert, 2009). É o caso das auxinas sintéticas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftaleno-acético (NAA-1), e picloram (Rybel e Audenaert, 2009). Estudos realizados mostram que estes compostos são análogos estruturais de auxina, mas desempenham uma atividade antagonista ao hormônio; critério que tem sido utilizado para denominá-las como anti-auxinas (Rybel e Audenaert, 2009). O ácido p-Chlorophenoxyisobutyric (PCIB), por exemplo, é uma auxina sintética que tem sido usado como uma anti-auxina. O alvo e o modo de ação de PCIB nas células da planta têm sido objeto de pesquisas prévias. (Oono *et al.*, 2003). Postula-se que o PCIB age como um inibidor competitivo já que concorre com o IAA pela ligação aos receptores da auxina bloqueando a sinalização desencadeada pelo hormônio (Hayashi *et al.*, 2012). No entanto, o PCIB não é capaz de gerar uma resposta totalmente antagônica às respostas da auxina. Este composto atua, apenas, como um antagonista parcial do IAA (Oono *et al.*, 2003).

Neste trabalho temos insistido no fato de que auxinas são produzidas por alguns patógenos e desempenham um papel importante na interação microorganismo – planta (Mathesius *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2003). Entretanto, existem poucos relatos de antagonistas de auxina produzidos por fungos em interações com células da planta. O primeiro trabalho a respeito foi desenvolvido por F., a Ditengou e Lapeyrie (2000). Estes autores mostraram que a hypaphorine, composto indólico produzido pelo fungo ectomicorriza *Pisolithus tinctorius* neutraliza a atividade do IAA nas raízes de *Eucalyptus globulus* sugerindo que a hypophorine – em determinadas concentrações comporta-se como um antagonista da auxina.

Compostos de origem natural ou sintéticos com capacidade de inibir a sinalização da auxina nas células da planta têm ganhado especial atenção nos últimos anos (Hayashi *et al.*, 2003; Yamazoe *et al.*, 2005); fundamentalmente no que diz respeito à compreensão do mecanismo de ligação aos receptores de auxina TIR1/AFB. Assim, um potente antagonista da auxina chamado

auxinole foi desenhado como ferramenta para o estudo de possíveis inibidores da sinalização da auxina (Hayashi *et al.*, 2012).

Nos capítulos anteriores mostramos que (i) *M. pernicioso* produz e secreta um composto com as mesmas características ácidas, composição dos átomos e peso molecular que o descrito para o ácido indol 3- acético (IAA), e (ii) sugerimos baseados em análises do transcriptoma da interação fungo-cacau que este composto pode ter um papel importante na fase inicial da doença vassoura de bruxa. Estes resultados confirmam a nossa hipótese de que o fungo *M. pernicioso* está produzindo este hormônio durante a colonização dos tecidos da planta. Entretanto, sementes de *Arabidopsis* tratadas com sobrenadantes do fungo –de onde foi identificada a IAA- não reproduziram exatamente a morfologia das raízes de *Arabidopsis* observada quando tratadas com IAA exógena (figura 19; F e B, respectivamente). Estas observações conduzem à hipótese de que no extrato de sobrenadante de cultura de *M. pernicioso* poderia(m) existir outro(s) composto(s) capaz(es) de interferir na sinalização da auxina na planta.

Assim sendo, foram desenhados experimentos para (i) identificação e caracterização molecular de metabólitos produzidos pelo fungo, e (ii) ensaios *in-planta* para a validação de uma possível função de auxina dos metabólitos identificados.

1. Identificação de metabolitos com potencial análogo à auxina (*auxin-like*).

Metodologia

Experimentos de detecção por GC-MS foram desenvolvidos no laboratório de espectrometria de massas do Instituto de Química da UNICAMP. Tanto o procedimento empregado para a obtenção dos extratos de sobrenadantes do fungo quanto à metodologia para a preparação das amostras e medições no GC-MS utilizados nestes experimentos, foram as mesmas descritas no Capítulo III (seções 1, 2 e 3, respectivamente). Simplificadamente, *M. pernicioso* na fase necrotrófica foi crescido em meios de cultura suplementados com triptofano ou IAN isoladamente. Os sobrenadantes do meio de cultura do fungo foram extraídos para a recuperação e concentração dos compostos ácidos presentes. Estas amostras foram utilizadas tanto nos experimentos de detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas como nos ensaios *in planta*. Nesta seção analisamos os extratos de sobrenadante de fungo necrotrófico suplementamos com os precursores IAN (amostras 2 e 13A) ou triptofano (amostra 7). O controle

negativo foi obtido a partir do sobrenadante de cultura do fungo necrotrófico crescido em meio não suplementado com precursores da síntese de auxina (amostra 10).

Resultados e discussão

A figura 30 apresenta o cromatograma iônico obtido quando analisada uma amostra de sobrenadante do fungo necrotrófico crescido durante 20 dias em meio suplementado com IAN; tempo suficiente para induzir a produção de IAA e dos derivados indólicos. Pode-se observar que na amostra se destacam três picos com alta concentração: (i) pico com t_R de 11.37 min correspondendo com o t_R do precursor de auxina IAN; (ii) pico com t_R de 11.98 min, o mesmo t_R do IAA; e um terceiro pico (iii) com t_R de 12.19 min.

A figura 30 (quadrante superior) apresenta o espectro de massas do composto com t_R de 12.19 min. Na tentativa de identificar este composto, o seu espectro de massas foi comparado com espectros de massas disponíveis na biblioteca do equipamento NIST (98), através da comparação com os padrões de referências do equipamento disponíveis comercialmente. A comparação dos espectros pode ser observada na figura 30 (quadrante superior). O espectro inferior corresponde à biblioteca referência e o espectro de massas da parte superior é relativo ao espectro de massas gerado pelo composto com t_R de 12.19 min. Interessantemente, a estrutura obtida a partir do espectro de massas deste composto tem uma identidade de 93.9% com o ácido 1H-indol 1-acético (IAA).

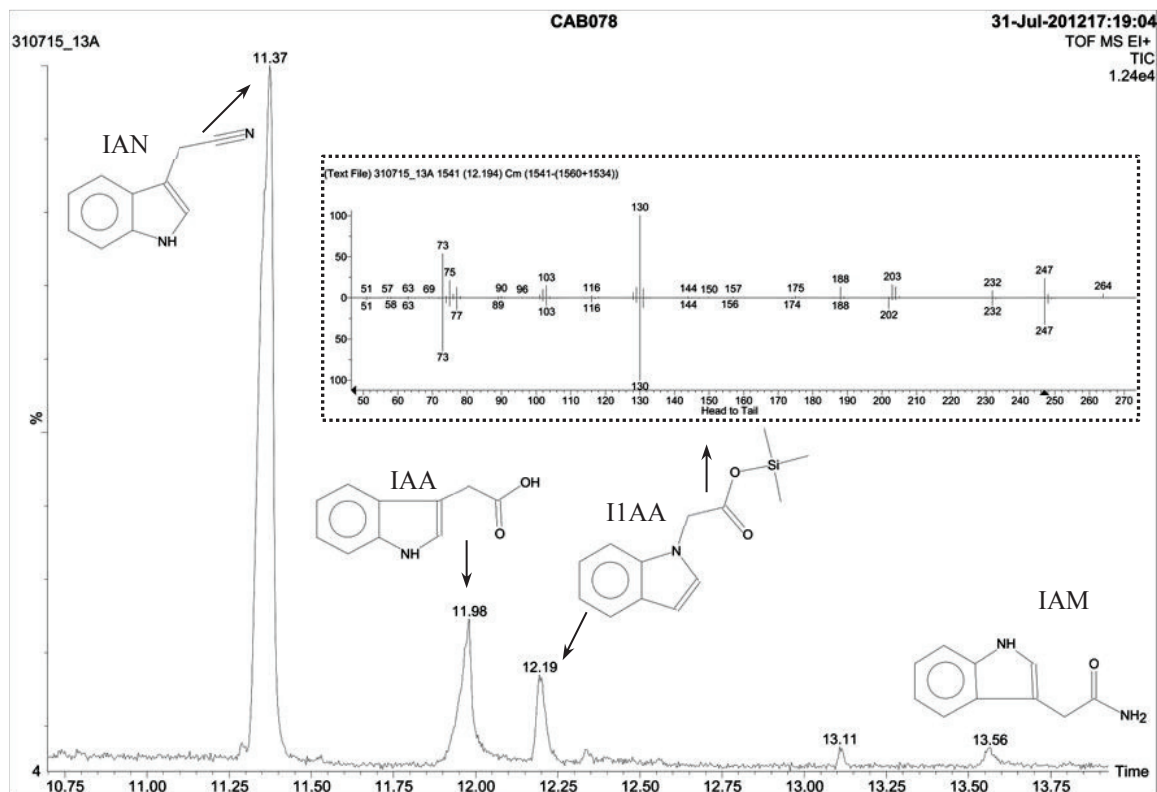


Figura 30. Detecção por GC-MS de compostos indólicos derivados da cultura de *M. pernicioso* necrotrófico suplementado com IAN depois de 20 dias de inoculação.

Legenda: Os t_R dos picos apresentam identidade significativa com: IAN (11.37 min); precursor adicionado na cultura, IAA (11.98 min); auxina natural gerada pela via do IAN, I1AA (ácido 1H-Indol 1-acético, 12.19 min), nova *auxin-like*. No quadrante pontado se apresenta a comparação dos espectros do I1AA referencia do equipamento e o espectro da *auxin-like* com uma identidade >90%.

A figura 31 apresenta os cromatogramas iônicos obtidos quando aplicadas as amostras referentes à: sobrenadantes do fungo necrotrófico crescido em meio de cultura suplementado com triptofano (cromatogramas 1 e 3 da figura 31); e sobrenadante do fungo crescido em meio de cultura NÃO suplementado com triptofano (cromatograma 2). Pode-se observar que o pico que provavelmente corresponde ao I1AA com t_R de 12.16 min (neste experimento) não aparece na amostra controle; entretanto está presente nas amostras dos tratamentos com triptofano. Estes resultados sugerem que o triptofano e o IAN são precursores na síntese de I1AA. Hipotetizamos então que, *M. pernicioso* produz I1AA como derivado da via de síntese de IAA.

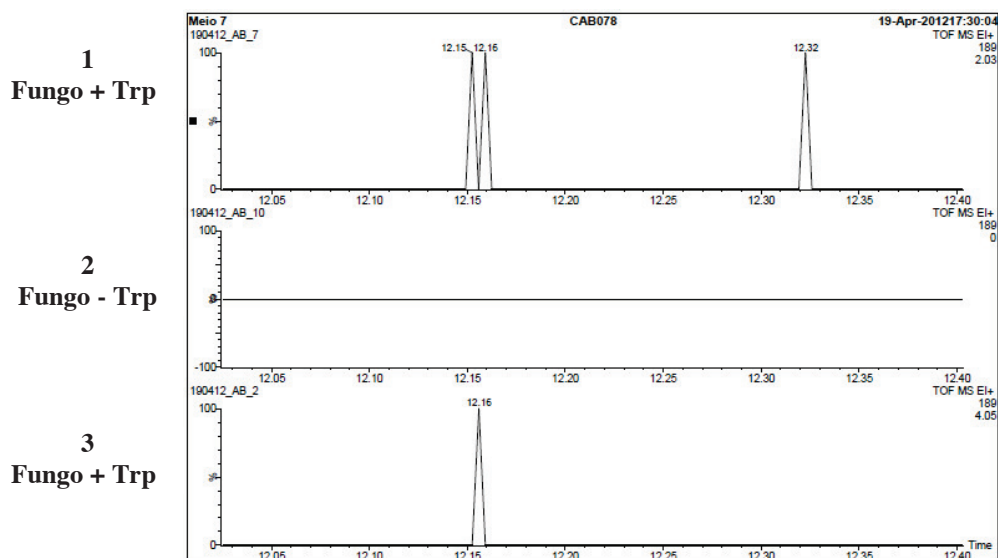


Figura 31. Cromatogramas com o tempo de retenção do composto novo procurado por íon molecular 189 [m/z]⁺.

Legenda: Cromatograma (1), sobrenadante do fungo necrotrófico crescido em meio de cultura suplementado com triptofano; Cromatograma (2) sobrenadante do fungo crescido em meio de cultura NÃO suplementado com triptofano; Cromatograma (3), replica biológica da amostra usada para a obtenção do cromatograma 1.

Não existem dados na literatura mostrando que IIAA seja produzido de forma natural. Este composto é sintetizado artificialmente por derivação do indol com um grupo carboxila. Os relatos na literatura referentes a este composto são escassos dificultando uma discussão mais detalhada. O IIAA tem sido utilizado como base para a obtenção de moléculas sintéticas tais como os ácidos indol-3-tio-, 3-sulfonil-, e 3-oxi-aril-1- acéticos, Estas substâncias têm sido empregadas como antagonistas CRTh2, receptores das prostaglandinas presentes nos linfócitos T. A ativação destes receptores desencadeia reações de quimiotaxia e liberação de mediadores envolvidos na asma e outras reações alérgicas (Luker *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2013).

Devido à analogia estrutural do IIAA com o IAA e às propriedades de ligação a receptores celulares atribuídas aos derivados deste composto, uma pergunta surge obrigatoriamente: Será que o IIAA aparentemente sintetizado por *M. perniciosus* se liga aos receptores de auxina TIR/AFB afetando - potencializando (agonista) ou bloqueando (antagonista) – a sinalização do hormônio? Na tentativa de responder esta pergunta, analisamos a atividade do gene repórter sob controle de promotor de gene responsivo à auxina DR5::GUS em sementes de *A. thaliana* tratadas com amostras do fungo onde foi identificado o composto IIAA.

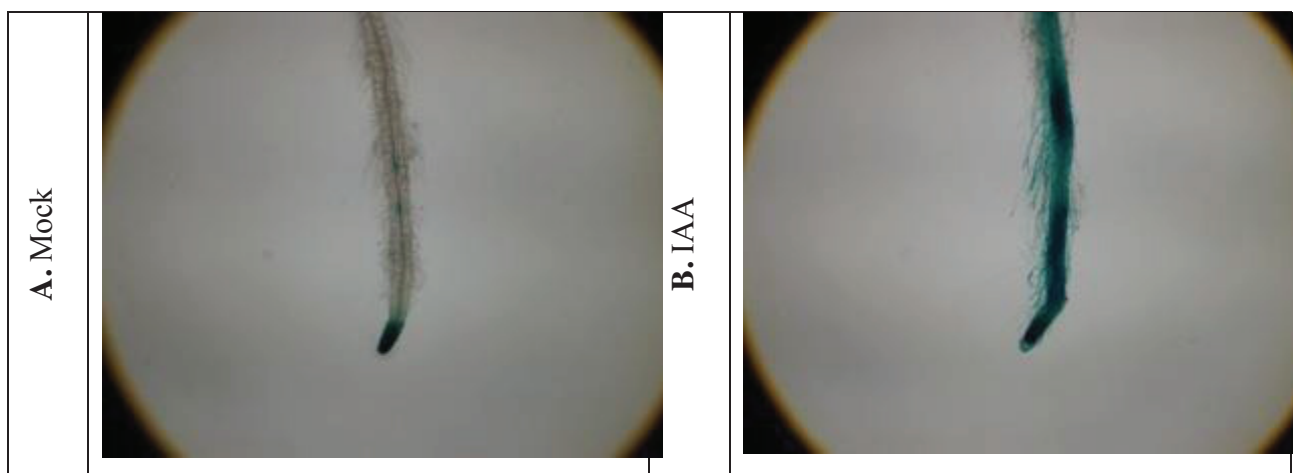
2. Estudo dos efeitos do I1AA em sementes de *A. thaliana* mediante utilização do sistema DR5::GUS.

Metodologia

As amostras do fungo utilizadas nestes experimentos foram as mesmas da seção anterior do presente capítulo, onde se identificou o composto I1AA. Como controle positivo, foi adquirido o composto I1AA (ácido 1H-indol 1-acético, cas: 24297-59-4) da companhia Capot Chemical Co (San Diego, CA, USA), apresentando 96% de pureza e estrutura garantida segundo perfil obtido por NMR. Foram preparados os seguintes meios de cultura para sementes de *A. thaliana* (MS): suplementado com IAA (20 μ M); suplementado com I1AA (20 μ M); extrato de sobrenadante de fungo necrotrófico suplementado com IAN (1% v/v); sem suplementação - controle negativo (mock). Esses meios foram utilizados para o crescimento de sementes de *A. thaliana* DR5::GUS durante 7 dias. Posteriormente foi feita coloração histoquímica semelhante à descrita no capítulo II (seção 3). Os resultados foram documentados mediante fotografia.

Resultados e discussão

A figura 32 apresenta as fotos mostrando a expressão do gene responsivo à auxina DR5::GUS em raízes de *A. thaliana* após o crescimento por 7 dias em meios de cultura suplementados com os diversos tratamentos.



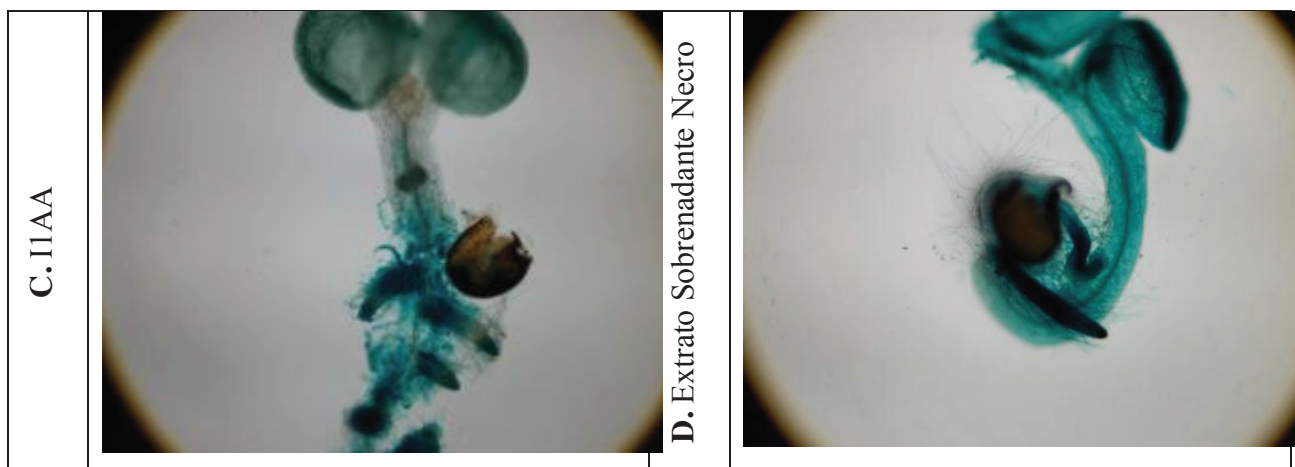


Figura 32. Resposta de sementes de *Arabidopsis thaliana* DR5::GUS ao tratamento com estratos de fungos e IIAA.

Legenda: (A), controle de plantas crescidas em meio MS, sem tratamento. (B), plantas crescidas por 7 dias em meio MS suplementado com IAA 20. (C), plantas crescidas por 7 dias em meio MS suplementado com IIAA. (D), plantas crescidas por 7 dias em meio MS suplementado com extrato do sobrenadante do fungo necrotrófico suplementado com IAN. Os experimentos foram feitos em triplicata, 5 sementes por placa.

Observa-se que no caso das sementes colocadas para crescimento das plantas em meio de cultura sem suplementação (controle negativo) a expressão do gene permaneceu confinada aos lugares de síntese endógena do hormônio na planta e o transporte de auxina permanece normal pelo tecido da raiz (figura 32; A). No caso das sementes crescidas em presença de IAA, observa-se indução do sinal GUS devido ao incremento da concentração de auxina e ao aumento do transporte deste hormônio pela raiz (figura 32; B). A figura 32 (C) mostra o efeito do IIAA sobre a morfologia das raízes de *A. thaliana*. Pode-se observar que este tratamento induz marcadamente o brotamento das raízes laterais e produz um forte sinal do gene repórter GUS.

Estes resultados sugerem que o composto IIAA ativa genes relacionados com a auxina e causa uma forte acumulação no ápice da raiz induzindo o surgimento das raízes laterais. Este fenótipo é comparável com o observado em sementes de *A. thaliana* crescidas em meio MS suplementado com sobrenadante de cultura do fungo necrotrófico crescido em meio contendo IAN (figura 32; D). Estes resultados sugerem que o IIAA aparentemente produzido por *M. perniciosus* tem função análoga à auxina. Entretanto, não existe na literatura descrição de enzimas capazes de catalisar as reações necessárias para a síntese deste composto. Propomos que uma plausível via de síntese deste composto seria por derivação química a partir do indol, sem intervenção enzimática provavelmente favorecida pelo ambiente oxidativo presente nas culturas do fungo *M. perniciosus* (de Oliveira *et al.*, 2012). Pfeiffer e Hoftberger (2001) mostraram que

auxinas podem induzir *burst* oxidativo causado pelo aumento drástico na geração de espécies reativas de oxigênio em células em suspensão de culturas de *Chenopodium rubrum*. Não está claro se existe uma enzima peroxidase responsável por catalisar a oxidação do IAA produzindo O₂ para o início do *burst* oxidativo (Kawano *et al.*, 2001).

Qual seria o papel de um composto com função *auxin-like* no contexto da patogênese do fungo *M. pernicioso*? Aumento da sinalização da auxina em sistemas de patogenicidade fungo-planta tem sido associado ao incremento dos sintomas de doenças causadas por fungos hemibiotróficos produtores de auxina, tal como *Magnaporthe grisea* - patógeno do arroz (Fu *et al.*, 2011). Esta acumulação parece estar relacionada com a modulação do transporte da auxina mediante duas vias fundamentais: (i) via proteínas transportadores de ex-fluxo do tipo PIN2, e (ii) via proteínas importadoras no retículo endoplasmático do tipo PIN5. Estas proteínas PIN2 e PIN5 estão bem caracterizadas em *A. thaliana* (Felten *et al.*, 2009). Existem exemplos na literatura mostrando que alguns patógenos são capazes de modular a expressão das proteínas PIN para favorecer a infecção como é o caso do nematoide *Heterodera schachtii* (Grunewald, Cannoot, *et al.*, 2009). Assim, a reação susceptível de cacau a *M. pernicioso*, poderia estar associada à modulação destas proteínas e a um rápido aumento e acumulação tanto de IAA como de I1AA, produzidos e secretados pelo fungo.

Qual seria o mecanismo de ação do I1AA para exercer a sua função *auxin-like*? Está descrito a auxina natural (IAA) e a auxina sintética 1-NAA induzem a expressão de GUS. Entretanto, a indução pelo IAA é mais forte quando comparado ao 1-NAA (Wang *et al.*, 2007). Foi sugerido que o anel do naptaleno na estrutura da 1-NAA, em vez do anel de indol do IAA, é o responsável pela redução da expressão do DR5::GUS (Chapman e Estelle, 2009). Isto foi também consistente com dados que mostram que o IAA se liga mais fortemente a TIR1 que a 1-NAA devido à ligação do átomo de hidrogênio entre o grupo amino do indol e o grupo amida da leucina da posição 439 (Leu439) desta proteína (Tan *et al.*, 2007). Estes estudos indicam que a afinidade das auxinas pelo receptor TIR é um mecanismo chave para determinar a intensidade das respostas de sinalização do complexo. Sendo assim, no caso do I1AA aparentemente produzido por *M. pernicioso*, nos hipotetizamos que este composto poderia ter uma grande afinidade pelo receptor TIR induzindo os altos níveis de expressão do gene GUS observados.

Este é o primeiro relato de um composto produzido por um microrganismo com ação de auxina natural, capaz de alterar a morfologia das raízes da planta. No entanto, outros trabalhos devem ser desenvolvidos no intuito de validar ou não se o IIAA poderia exercer uma função *auxin-like* e se este teria que ver com a patogenicidade do fungo.

Conclusões do capítulo IV

1. Foi identificado no sobrenadante do fungo *M. pernicioso* na fase necrotrófica um composto análogo estruturalmente à auxina, o I1AA. É o primeiro relato de existência deste composto sintetizado naturalmente por microrganismos.
2. Foi mostrado que o I1AA tem função análoga à auxina.

Considerações Gerais do Trabalho

Consideramos que a principal conquista da nossa pesquisa foi identificar uma auxina de natureza fúngica ativa. A síntese deste composto é induzida por triptofano e acontece através de vias biossintéticas diferentes e redundantes. Este trabalho provou que *M. pernicioso* é produtor de IAA e que este hormônio altera a sinalização normal da auxina na planta promovendo a acumulação transiente de IAA no local da infecção. Esta auxina fúngica altera os genes GH3 das plantas e pode ter um importante papel na suscetibilidade do cacau a este patógeno, diminuindo a regulação da resposta por AS. Mostramos que a auxina sintetizada pelo fungo é “degradada” gerando ampla gama de derivados indólicos com possível função na patogenicidade do fungo como é o caso da camalexina. Foi também identificado um metabólito secretado pelo fungo, com uma estrutura indólica próxima à auxina da planta, o qual estaria causando as malformações observadas nas raízes de *Arabidopsis* e inibição no transporte da auxina vegetal, efeito semelhante ao acontecido com a suplementação exógena do composto artificial. A relevância desta descoberta estaria no fato que este tipo de composto nunca foi descrito na literatura como sendo produzido por microrganismos patogênicos de plantas. Além de que o efeito que este composto causaria no hospedeiro, seria relevante para direcionar uma suscetibilidade da planta ao patógeno, devido a que poderia causar um desbalanço nas outras vias hormonais.

Os resultados obtidos sustentam a nossa hipótese inicial, na qual compostos de natureza proteica e/ou metabólica causariam supressão na defesa basal da planta por modulação nas vias hormonais. Assim, durante o desenvolvimento do projeto foram aportados valiosos conhecimentos à genética e a biologia da interação de *M. pernicioso* – cacau, mas também para a área da fitopatologia em geral. Aprofundamos no entendimento dos mecanismos hormonais que levam ao sucesso do patógeno no seu estabelecimento na planta conseguindo evadir as reações de defesa basal e específica para finalmente causar a doença. Acreditamos ainda que os resultados obtidos neste trabalho poderiam servir de base para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o controle da doença vassoura de bruxa.

Estes resultados foram objeto de um artigo científico submetido para publicação na revista *Molecular Plant – Microbe Interaction* (MPMI), umas das principais revistas nesta área de conhecimento (Anexo 6).

Conclusões do trabalho

1. Foi analisada a expressão de genes relacionados com a resposta à auxina em cacaueiro durante uma interação compatível inicial com *M. perniciosa*. Encontramos que na fase inicial da interação cacau – *M. perniciosa*, a planta apresenta um perfil de expressão gênica que sugere a presença de altos níveis de auxina que estariam modulando a suscetibilidade da planta ao patógeno. Entretanto, análises de expressão gênica realizados nas mesmas bibliotecas de interação indicam que a planta não estaria sintetizando auxina *de novo*.
2. Foi determinado o efeito *in-planta* de compostos secretados pelo fungo usando sementes de *A. thaliana*. Assim, o fungo afetaria a formação das raízes de *Arabidopsis* pela ação de um composto secretado que estaria relacionado com desbalanço das concentrações de auxina na planta causando inibição do transporte deste hormônio em raízes de *Arabidopsis*.
3. Foram identificados e quantificados os metabólitos relacionados com a auxina produzidos por *M. perniciosa*. Especificamente o ácido indol-3-acético (IAA, a auxina natural) em meios suplementados com os precursores triptofano e indol 3-acetonitrilo (IAN).
4. Considerando (i) os metabólitos indólicos produzidos pelo fungo, e (ii) análises das enzimas envolvidas na via de síntese de auxina no genoma e transcriptoma do fungo, foram propostas três vias de biossínteses do IAA utilizadas por *M. perniciosa* (IPA, IAN, IAM) dependendo do tecido infectado.
5. Foi descoberto que *M. perniciosa* sintetiza um composto com função semelhante à auxina (ácido 1H-indol 1-acético) que poderia ter um papel importante na patogenicidade do fungo.

Referências

- Agrios, G.N.** (2005) *Plant pathology* 4th ed., San Diego: Academic Press.
- Aime, M. and 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. Available at: <http://www.citeulike.org/user/gvb2/article/8117912> [Accessed December 5, 2010].
- Albuquerque, P.S.B. and Figueira, A.** (2004) Genetic mapping and identification of genomic regions associated with witches' broom resistance, derived from alternative sources from the Brazilian Amazon (CAB genotypes). *INGENIC Newsletter*, **9**, 39–42.
- Anders, S. and Huber, W.** (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, **11**, R106. Available at: <http://genomebiology.com/2010/11/10/R106> [Accessed February 28, 2013].
- Argout, X., Salse, J., Aury, J., et al.** (2011) The genome of *Theobroma cacao*. *Nature genetics*, **43**, 101–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21186351> [Accessed December 27, 2010].
- Bartley, B.G.D.** (2005) *The Genetic Diversity of Cacao and its Utilization*, CABI Publishing.
- Bartling, D., Seedorf, M., Mithofer, A. and Weiler, E.** (1992) Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *European Journal of Biochemistry*, **205**, 417–424.
- Bashandy, T., Guillemot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., Meyer, Y. and Reichheld, J.-P.** (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *The Plant cell*, **22**, 376–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2845418&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 16, 2011].
- Basse, C.W., Lottspeich, F., Steglich, W. and Kahmann, R.** (1996) Two Potential Indole-3-Acetaldehyde Dehydrogenases in the Phytopathogenic Fungus *Ustilago maydis*. *European Journal of Biochemistry*, **242**, 648–656. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1996.0648r.x> [Accessed December 11, 2010].
- Batista, L.** (2009) Guía técnica: el cultivo de cacao en la República Dominicana. Available at: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CEDAF.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008112> [Accessed February 6, 2011].
- Blomster, T., Salojärvi, J., Sipari, N., Brosche, M., Ahlfors, R., Keinänen, M., Overmyer, K. and Kangasjärvi, J.** (2011) Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis*.

Plant Physiology. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.181883> [Accessed October 18, 2011].

- Bohlmann, J., Lins, T., Martin, W. and Eilert, U.** (1996) Anthranilate Synthase from *Ruta graveolens*. *Plant Physiology*, **111**, 507–514.
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D. and Glawischnig, E.** (2009) The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, **21**, 1830–1845. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2714930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 5, 2013].
- Brandl, M.T. and Lindow, S.E.** (1998) Contribution of Indole-3-Acetic Acid Production to the Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl. Envir. Microbiol.*, **64**, 3256–3263. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/64/9/3256> [Accessed December 11, 2010].
- Brown, H.M. and Purves, W.K.** (1980) Indoleacetaldehyde Reductase of *Cucumis sativus* L: KINETIC PROPERTIES AND ROLE IN AUXIN BIOSYNTHESIS. *Plant physiology*, **65**, 107–113. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=440276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 6, 2013].
- Casimiro, I., Marchant, a, Bhalerao, R.P., et al.** (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant cell*, **13**, 843–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ceita, G. deOliveira, Macedo, J., Santos, T., et al.** (2007) Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Science*, **173**, 106–117. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945207001288>.
- Chapman, E.J. and Estelle, M.** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual review of genetics*, **43**, 265–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686081> [Accessed February 28, 2013].
- Chaves, F.C. and Gianfagna, T.J.** (2006) Necrotrophic phase of *Moniliophthora perniciosa* causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **69**, 104–108. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576507000227>.
- Chen, H. and Fink, G.** (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & development*, **20**, 1150–1161. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/20/9/1150.short> [Accessed April 30, 2013].
- Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J. and Kunkel, B.N.** (2007) *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *PNAS*, **104**, 20131–6. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/104/50/20131> [Accessed December 11, 2010].

- Dabydeen, S.** (1989) Occurrence, Anatomy, and Morphology of “Blisters” on Cocoa Seedlings Inoculated with *Crinipellis perniciosa*. *Plant Dis*, **73**, 481–484.
- Delgado, J.C. and Cook, A.A.** (1976) Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius pernicius*. *Canadian Journal of Botany*, **54**, 66–72. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b76-009?journalCode=cjbl#>.UXMpJr98hr4 [Accessed April 20, 2013].
- Ditengou, F. a and Lapeyrie, F.** (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **13**, 151–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10659705>.
- Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucially-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J. and Benková, E.** (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *PNAS*, **105**, 8790–8794. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2438385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Evans, H.C.** (1980) Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches’ broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, **74**, 515–523. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80051-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80051-9) [Accessed December 11, 2010].
- Faleiro, F.G., Queiroz, V.T., Lopes, U.V., et al.** (2006) Mapping QTLs for Witches’ Broom (*Crinipellis Perniciosa*) Resistance in Cacao (*Theobroma Cacao* L.). *Euphytica*, **149**, 227–235. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10681-005-9070-7> [Accessed March 29, 2013].
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., et al.** (2005) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *PNAS*, **102**, 11064–9. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/102/31/11064> [Accessed December 11, 2010].
- Felten, J. and Ditengou, F.A.** (2010) Lateral root stimulation in the early interaction between. *Plant Signaling & Behavior*, **5**, 864–867.
- Felten, J., Kohler, A., Morin, E., Bhalerao, R.P., Palme, K., Martin, F., Ditengou, F.A. and Legue, V.** (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiology*, **151**, 1991–2005. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/pp.109.147231v1>.
- Feys, B.J. and Parker, J.E.** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in genetics : TIG*, **16**, 449–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050331> [Accessed May 20, 2013].
- Freund, J. and Kalbitzer, H.R.** (1995) Physiological buffers for NMR spectroscopy. *Journal of biomolecular NMR*, **5**, 321–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911504>.
- Fu, J., Liu, H., Li, Y., Yu, H., Li, X., Xiao, J. and Wang, S.** (2011) Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice.

- Plant physiology*, **155**, 589–602. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3075746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 16, 2012].
- Furukawa, T., Koga, J., Adachi, T., Kishi, K. and Syono, K.** (1996) Efficient Conversion of L-Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid and/or Tryptophol by Some Species of *Rhizoctonia*. , **37**, 899–905.
- Garcia, O., Macedo, J. a N., 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*. *Mycological research*, **111**, 443–455. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512713> [Accessed November 4, 2012].
- Gibbings, D. and Voinnet, O.** (2010) Control of RNA silencing and localization by endolysosomes. *Trends in cell biology*, **20**, 491–501. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630759> [Accessed August 3, 2011].
- Glawischnig, E.** (2007) Camalexin. *Phytochemistry*, **68**, 401–406. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217970> [Accessed March 11, 2013].
- González-Lamothe, R., Oirdi, M. El, Brisson, N. and Bouarab, K.** (2012) The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant cell*, **24**, 762–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22374398> [Accessed November 2, 2012].
- Grant, M.R. and Jones, J.D.** (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science*, **324**, 750–752. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19423816 .
- Grunewald, W., Cannoot, B., Friml, J. and Gheysen, G.** (2009) Parasitic nematodes modulate PIN-mediated auxin transport to facilitate infection. *PLoS pathogens*, **5**, e1000266. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2613529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 3, 2012].
- Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inzé, D., Gheysen, G. and Goossens, A.** (2009) Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO reports*, **10**, 923–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2726675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 19, 2011].
- Hayashi, K., Jones, A.M., Ogino, K., Yamazoe, A., Oono, Y., Inoguchi, M., Kondo, H. and Nozaki, H.** (2003) Yokonolide B, a novel inhibitor of auxin action, blocks degradation of AUX/IAA factors. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 23797–806. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690101> [Accessed April 23, 2013].
- Hayashi, K., Neve, J., Hirose, M., Kuboki, A., Shimada, Y., Kepinski, S. and Nozaki, H.** (2012) Rational Design of an Auxin Antagonist of the SCF. *ACS Chemical Biology*, **7**, 590 – 598.

- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C. and Rathjen, J.P.** (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *PNAS*, **104**, 12217–22. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/104/29/12217> [Accessed August 8, 2010].
- Hogan, D. a** (2006) Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Current biology*, **16**, R457–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782000> [Accessed March 4, 2013].
- Hoon, M.J.L. de, Imoto, S., Nolan, J. and Miyano, S.** (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **20**, 1453–1454. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871861> [Accessed January 29, 2013].
- Hora Junior, B.T. da, Poloni, J.D.F., Lopes, M.A., et al.** (2012) Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. *Molecular bioSystems*, **8**, 1507–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22373587> [Accessed March 12, 2012].
- Iglesias, M.J., Terrile, M.C., Bartoli, C.G., D'Ippólito, S. and Casalongué, C.A.** (2010) Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, **74**, 215–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20661628> [Accessed October 24, 2011].
- Iwaro, A., Singh, V., Barath, S. and Jugmohan, N.** (2001) Germplasm evaluation at the International Cocoa Genebank. Trinidad for resistance to Phytophthora pod rot. In *Annual Report 2000 of the Cocoa Research Unit*. Trinidad: University of the West Indies, pp. 34–40.
- Jameson, P.P.E.** (2000) *Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview*, Springer Netherlands. Available at: <http://www.springerlink.com/content/nq6012k4gh201r32/> [Accessed December 11, 2010].
- Jin, H.** (2008) Endogenous small RNAs and antibacterial immunity in plants. *FEBS letters*, **582**, 2679–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18619960> [Accessed July 20, 2011].
- Jolliffe, I.T.** (2002) *Principal Component Analysis*, New York: Springer-Verlag. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/b98835> [Accessed May 5, 2013].
- Kawano, T., Kawano, N., Hosoya, H. and Lapeyrie, F.** (2001) Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid-dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. *Biochemical and biophysical research communications*, **288**, 546–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11676477> [Accessed March 9, 2012].
- Kazan, K. and Manners, J.M.** (2009) Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science*, **14**, 373–382. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559643>.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., et al.** (2007) The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Current biology*, **17**, 1116–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.046> [Accessed December 11, 2010].

- Kidd, B.N., Kadoo, N.Y., Dombrecht, B., et al.** (2011) Auxin Signaling and Transport Promote Susceptibility to the Root Infecting Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* in Arabidopsis. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 1–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281113>.
- Kilaru, A., Bailey, B.A. and Hasenstein, K.H.** (2007) *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiology Letters*, **274**, 238–244. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17610511.
- Kilaru, A. and Hasenstein, K.H.** (2005) Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis perniciosa* on Interaction with Cacao Leaves. *Biochemistry and Cell Biology*, **95**, 101–107. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18943842.
- Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M. and Shimizu, S.** (1995) Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *PNAS*, **92**, 714–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kolattukudy, P. and Rogers, L.** (1995) Surface signaling in pathogenesis. *PNAS*, **92**, 4080–4087. Available at: <http://www.pnas.org/content/92/10/4080.short> [Accessed May 21, 2013].
- Kovtun, Y., Chiu, W., Tena, G. and Sheen, J.** (1999) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants.
- Kumavath, R.N., Ramana, C. V and Sasikala, C.** (2010) L-Tryptophan catabolism by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2 occurs through indole 3-pyruvic acid pathway. *Biodegradation*, **21**, 825–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20217460> [Accessed May 14, 2012].
- Kunkel, B.N. and Brooks, D.M.** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 325–331. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526602002753> [Accessed May 15, 2011].
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S.L.** (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, **10**, R25. Available at: <http://genomebiology.com/2009/10/3/R25> [Accessed February 28, 2013].
- Laskowski, M., Grieneisen, V. a, Hofhuis, H., Hove, C. a Ten, Hogeweg, P., Marée, A.F.M. and Scheres, B.** (2008) Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS biology*, **6**, e307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19090618>.
- Leal, Gaj., ALBUQUERQUE, P.S.B.S.B., FIGUEIRA, A. and JR, G.A.L.** (2007) Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 279–292. Available

at: [http://web.cena.usp.br/labs/mplantas/arquivos/Genes differentially expressed in Theobroma cacao.pdf](http://web.cena.usp.br/labs/mplantas/arquivos/Genes%20diferentially%20expressed%20in%20Theobroma%20cacao.pdf).

- Leveau, J.H.J. and Gerards, S.** (2008) Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. *FEMS microbiology ecology*, **65**, 238–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18205812> [Accessed April 12, 2013].
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T.** (2003) Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 1875–1883. Available at: <http://aem.asm.org> [Accessed December 11, 2010].
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **25**, 402–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> [Accessed July 12, 2010].
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., Jordá, L., Parker, J. and Molina, A.** (2008) Repression of the auxin response pathway increases Arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi. *Molecular plant*, **1**, 496–509. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19825556> [Accessed November 13, 2012].
- López, M.A., Bannenberg, G. and Castresana, C.** (2008) Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Current opinion in chemical biology*, **11**, 420–427. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VS4-4SVFHW9-2/2/ffbbf6e6813dfd594105b4efd7241cd8>.
- Luker, T., Bonnert, R., Brough, S., et al.** (2011) Substituted indole-1-acetic acids as potent and selective CRTh2 antagonists-discovery of AZD1981. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **21**, 6288–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944852> [Accessed May 2, 2012].
- Manulis, S., Haviv-Chesner, A., Brandl, M.T.M.T., Lindow, S.E. and Barash, I.** (1998) Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 634–642. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.1998.11.7.634>.
- Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H. and Sharon, A.** (2004) In Planta Production of Indole-3-Acetic Acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1852–1854. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/70/3/1852> [Accessed December 11, 2010].
- Maor, R. and Shirasu, K.** (2005) The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. *Current opinion in microbiology*, **8**, 399–404. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996507> [Accessed April 9, 2013].
- Marelli, J.-P., Maximova, S.N., Gramacho, K.P., Kang, S. and Gultinan, M.J.** (2009) Infection Biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and Alternate Solanaceous Hosts. *Tropical Plant Biology*, **2**, 149–160. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12042-009-9038-1>.

- Marita, J., Nienhuis, J., Pires, J. and Aitken, W.** (2001) Analysis of Genetic Diversity in *Theobroma cacao* with Emphasis on Witches' Broom Disease Resistance. *Crop Science*, **41**, 1305.
- Mathesius, U., Schlaman, H.R., Spaink, H.P., Of Sautter, C., Rolfe, B.G. and Djordjevic, M.** (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **14**, 23–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494052>.
- Meinhardt, L.W., Bellato, C.D.M., Rincones, J., Azevedo, R.A., Cascardo, J.C.M., Pereira, G.A.G. and Bellato Cde, M.** (2006) In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciososa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*, **52**, 191–196. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16502292 [Accessed November 4, 2012].
- Mondego, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G., et al.** (2008) A genome survey of *Moniliophthora perniciososa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics*, **9**, 548. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19019209.
- Morant, M., Ekstrøm, C., Ulvskov, P., et al.** (2010) Metabolomic, transcriptional, hormonal, and signaling cross-talk in superroot2. *Molecular plant*, **3**, 192–211. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2807926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 15, 2011].
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B.** (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*, **5**, 621–628. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516045> [Accessed March 6, 2013].
- Motamayor, J.** (2001) *Etude de la diversité génétique et de la domestication des cacaoyers du groupe Criollo (Theobroma cacao L.) à l'aide de marqueurs moléculaires*. Université Paris XI.
- Mujahid, M., Sasikala, C. and Ramana, C. V** (2011) Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from L-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. *Applied microbiology and biotechnology*, **89**, 1001–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20972782> [Accessed April 19, 2012].
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473–497. Available at: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x> [Accessed June 30, 2010].
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P. and Jones, J.D.G.** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, 650–655. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096098220800465X>.

- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. and Jones, J.D.G.** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, **312**, 436–439. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627744> [Accessed November 19, 2012].
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and Jones, J.D.G.** (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant physiology*, **135**, 1113–28. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/135/2/1113> [Accessed December 11, 2010].
- Nidiry, E.S.J. and Babu, C.S.B.** (2005) Antifungal activity of tuberose absolute and some of its constituents. *Phytotherapy research : PTR*, **19**, 447–449. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16106389>.
- Niyogi, K.K. and Fink, G.R.** (1992) Two anthranilate synthase genes in Arabidopsis: defense-related regulation of the tryptophan pathway. *The Plant cell*, **4**, 721–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=160168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 13, 2013].
- Normanly, J.** (2010) Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**, a001594. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2827909&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 29, 2012].
- Oliveira, B. V de, Teixeira, G.S., Reis, O., et al.** (2012) A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **49**, 922–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022488> [Accessed April 3, 2013].
- Oono, Y., Ooura, C., Rahman, A., Aspuria, E.T., Hayashi, K., Tanaka, A. and Uchimiya, H.** (2003) p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in Arabidopsis root. *Plant Physiology*, **133**, 1135–1147. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14526108.
- Pan, X., Welti, R. and Wang, X.** (2010) Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Nature protocols*, **5**, 986–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448544> [Accessed August 25, 2010].
- Park, W. and Kriechbaumer, V.** (2003) The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiology*, **133**, 794–802. Available at: <http://www.plantphysiology.org/content/133/2/794.short> [Accessed February 6, 2013].
- Penman, D., Britton, G., Hardwick, K., Collin, H.A. and Isaac, S.** (2000) Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, **104**, 671–675. Available at: <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756299001689> [Accessed March 25, 2013].

- Pfeiffer, W. and Hoftberger, M.** (2001) Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells: . Induction by auxin and osmotic changes. *Physiologia Plantarum*, **111**, 144–150. Available at: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034/j.1399-3054.2001.1110203.x> [Accessed May 20, 2013].
- Piotrowski, M.** (2008) Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry*, **69**, 2655–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18842274> [Accessed April 23, 2013].
- Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y. and Jansen, M. a K.** (2009) Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, cell & environment*, **32**, 158–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19021890> [Accessed September 22, 2011].
- Prusty, R., Grisafi, P. and Fink, G.R.** (2004) The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, **101**, 4153–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=384710&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Purdy, L.H. and Schmidt, R. a** (1996) STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. *Annual review of phytopathology*, **34**, 573–594. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012557>.
- Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R. and Basse, C.W.** (2008) Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Molecular plant pathology*, **9**, 339–355. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2008.00470.x/pdf> [Accessed June 26, 2011].
- Remans, R., Spaepen, S. and Vanderleyden, J.** (2006) Auxin signaling in plant defense. *Science (New York, N.Y.)*, **313**, 171. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840680> [Accessed December 11, 2010].
- Rincones, J., Scarpari, L.M., Carazzolle, M.F., et al.** (2008) Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *MPMI*, **21**, 891–908. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18533830 .
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. and Jones, J.D.G.** (2010) Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual review of phytopathology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21663438> [Accessed August 1, 2011].
- Robert-Seilaniantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y. and Jones, J.D.G.** (2011) The microRNA miR393 redirects secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **3000**, 218–231. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21457368> [Accessed June 17, 2011].

- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R. and Jones, J.D.G.** (2007) Pathological hormone imbalances. *Current opinion in plant biology*, **10**, 372–379. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136952660700074X>.
- Robinette, D. and Matthysse, A.G.** (1990) Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of bacteriology*, **172**, 5742–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=526890&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 11, 2010].
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. and Smyth, G.K.** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **26**, 139–140. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2796818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 3, 2013].
- Rogers, E.E., Glazebrook, J. and Ausubel, F.M.** (1996) Mode of action of the Arabidopsis thaliana phytoalexin camalexin and its role in Arabidopsis-pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions*, **9**, 748–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8870273> [Accessed February 6, 2013].
- Rohde, B., Hans, J., Martens, S., Baumert, A., Hunziker, P. and Matern, U.** (2008) Anthranilate N-methyltransferase, a branch-point enzyme of acridone biosynthesis. *The Plant journal*, **53**, 541–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17988223> [Accessed May 13, 2013].
- Rybel, B. De and Audenaert, D.** (2009) The Past, Present, and Future of Chemical Biology in Auxin Research. *ACS Chemical Biology*, **4**, 987–998. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cb9001624> [Accessed May 17, 2013].
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., et al.** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, **99**, 463–472. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10589675>.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, **4**, 406–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3447015> [Accessed March 11, 2013].
- Saldanha, A.J.** (2004) Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **20**, 3246–8. Available at: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/20/17/3246.abstract?keytype=ref&ijkey=31ed76d5EFKWk> [Accessed January 29, 2013].
- Scarpari, L.M., Meinhardt, L.W., Mazzafera, P., Pomella, a W. V, Schiavinato, M.A., Cascardo, J.C.M. and Pereira, G.A.G.** (2005) Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 865–877. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15642708.

- Schmidt, J.A., Bell, F.M., Akam, E., Marshall, C., Dainty, I.A., Heinemann, A., Dougall, I.G., Bonnert, R. V and Sargent, C.A.** (2013) Biochemical and pharmacological characterization of AZD1981, an orally available selective DP2 antagonist in clinical development for asthma. *British journal of pharmacology*, **168**, 1626–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23146091> [Accessed May 17, 2013].
- Sequeira, L. and Kelman, A.** (1969) The accumulation of growth substances in plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, **52**, 439–448.
- Serenó, M.L., Albuquerque, P.S.B., Vencovsky, R. and Figueira, A.** (2006) Genetic Diversity and Natural Population Structure of Cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon Evaluated by Microsatellite Markers. *Conservation Genetics*, **7**, 13–24. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10592-005-7568-0> [Accessed March 29, 2013].
- Silva, S., Luz, E. and Matsuoka, K.** (1998) Seleção de variáveis na avaliação de progênies de cacaueiro (*Theobroma cacao*) quanto a resistência a *Crinipellis pernicioso*. *Agrotrópica*, **10**, 87–94.
- Silva, S.D.V.M. and Matsuoka, K.** (1999) Histologia da Interação *Crinipellis pernicioso* em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura- de-Bruxa. *Fitopatologia Brasileira*, **24**, 54–59.
- Singer, R.** (1942) A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa*, **8**, 441–513.
- Smet, I. De, Vanneste, S., Inzé, D. and Beeckman, T.** (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant molecular biology*, **60**, 871–887. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724258> [Accessed June 11, 2011].
- Sounigo, O., Lachenaud, P., Bastide, P., Cilas, C., N’Goran, J. and Lanaud, C.** (2003) Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. *Journal of applied genetics*, **44**, 339–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12923308> [Accessed April 20, 2013].
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J.** (2010) Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084388> [Accessed January 4, 2011].
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R.** (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, **31**, 425–448. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509086> [Accessed November 11, 2012].
- Sreenivasan, T.N.D..** (1989) Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease*, **73**, 478–481.
- Stahel, G.** (1915) *Marasmius perniciosus* nov. spec. *Bulletin Depart- ment van den Landbouw in Suriname*, **33**, 1–25.
- Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C. and Suza, W.** (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant cell*, **17**, 616–627. Available at: <http://www.plantcell.org/content/17/2/616.abstract> [Accessed March 12, 2013].

- Stefanato, F.L., Abou-Mansour, E., Buchala, A., Kretschmer, M., Mosbach, A., Hahn, M., Bochet, C.G., Métraux, J.-P. and Schoonbeek, H.** (2009) The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **58**, 499–510. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19154205> [Accessed February 6, 2013].
- Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., et al.** (2010) *Arabidopsis* auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant & cell physiology*, **51**, 164–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007966> [Accessed August 19, 2011].
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S.** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, **28**, 2731–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3203626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 29, 2013].
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I. a, Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V, Estelle, M. and Zheng, N.** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 640–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17410169> [Accessed March 9, 2012].
- Tanaka, E.** (2010) Mechanisms of bamboo witches' broom symptom development caused by endophytic/epiphytic fungi. *Plant Signaling & Behavior*, **5**, 415. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2958593/> [Accessed June 26, 2011].
- Tanaka, E., Koga, H. and Mori, M.M.** (2011) Auxin Production by the Rice Blast Fungus and its Localization in Host Tissue. *Journal of Phytopathology*, **159**, 522–530. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0434.2011.01799.x> [Accessed May 17, 2011].
- Tanaka, E., Tanaka, C., Ishihara, A., Kuwahara, Y. and Tsuda, M.** (2003) Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Aciculosporium take*, a causal agent of witches' broom of bamboo. *Journal of General Plant Pathology*, **69**, 1–6. Available at: <http://www.springerlink.com/content/9nhvguhy61hlwu6k/> [Accessed December 11, 2010].
- Teixeira, P.J.P.L., Costa, G.G.L., Fiorin, G.L., Pereira, G.A.G. and Costa Mondego, J.M.** (2013) Novel receptor-like kinases in cacao contain PR-1 extracellular domains. *Molecular Plant Pathology*, n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/mpp.12028> [Accessed April 10, 2013].
- Teixeira, P.J.P.L., Thomazella, D.P.T., Vidal, R.O., et al.** (2012) The Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa* Has Genes Similar to Plant PR-1 That Are Highly Expressed during Its Interaction with Cacao D. A. Carter, ed. *PLoS ONE*, **7**, e45929. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045929> [Accessed September 21, 2012].
- Truman, W.M., Bennett, M.H., Turnbull, C.G.N. and Grant, M.R.** (2010) *Arabidopsis* auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant physiology*, **152**, 1562–73. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2832264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. and Guilfoyle, T.** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell Online*, **9**, 1963. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/9/11/1963>.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J.** (1997) Creation of a Highly Active Synthetic AuxRE. , **9**, 1963–1971.
- Valls, M., Genin, S. and Boucher, C.** (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. J. Dangl, ed. *PLoS pathogens*, **2**, e82. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0020082> [Accessed December 11, 2010].
- Vandeputte, O., Oden, S., Mol, A., Vereecke, D., Goethals, K., Jaziri, M. El and Prinsen, E.** (2005) Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. *Applied and environmental microbiology*, **71**, 1169–77. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/71/3/1169> [Accessed December 11, 2010].
- Volodarsky, D., Leviatan, N., Otcheretianski, A. and Fluhr, R.** (2009) HORMONOMETER: a tool for discerning transcript signatures of hormone action in the Arabidopsis transcriptome. *Plant physiology*, **150**, 1796–805. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535475>.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H. and Dong, X.** (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, **17**, 1784–1790. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982207019847>.
- Wang, M.-Y., Liu, X.-T., Chen, Y., Xu, X.-J., Yu, B., Zhang, S.-Q., Li, Q. and He, Z.-H.** (2012) Arabidopsis acetyl-amido synthetase GH3.5 involvement in camalexin biosynthesis through conjugation of indole-3-carboxylic acid and cysteine and upregulation of camalexin biosynthesis genes. *Journal of integrative plant biology*, **54**, 471–485. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22624950> [Accessed January 30, 2013].
- Wheeler, B.E.J. and Mepsted, R.** (1988) Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicios*a from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology*, **37**, 475–488. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02105.x> [Accessed April 20, 2013].
- Woodward, A.W. and Bartel, B.** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, **95**, 707–735. Available at: <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/95/5/707>.
- Yamada, T., Palm, C.J., Brooks, B. and Kosuge, T.** (1985) Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. *PNAS*, **82**, 6522–6526. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=390749&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

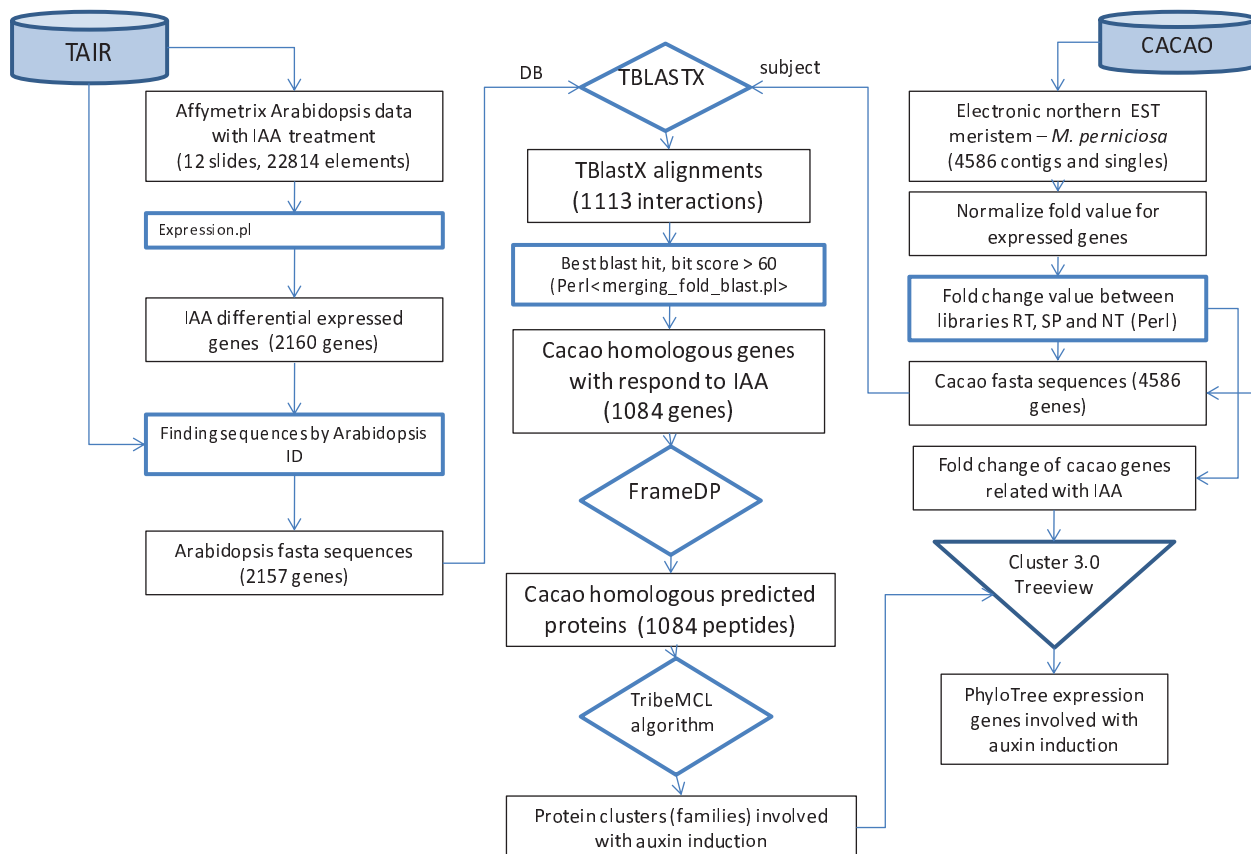
- Yamazoe, A., Hayashi, K., Kepinski, S., Leyser, O. and Nozaki, H.** (2005) Characterization of terfestatin A, a new specific inhibitor for auxin signaling. *Plant*, **139**, 779–789. Available at: <http://www.plantphysiol.org/content/139/2/779.short> [Accessed June 14, 2012].
- Yang, S., Zhang, Q., Guo, J., Charkowski, A.O., Glick, B.R., Ibekwe, A.M., Cooksey, D.A. and Yang, C.-H.** (2007) Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Applied and environmental microbiology*, **73**, 1079–88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1828641&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 27, 2010].
- Yue, Q., Miller, C.J., White, J.F. and Richardson, M.D.** (2000) Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **48**, 4687 – 4692. Available at: http://www.researchgate.net/publication/12273398_Isolation_and_characterization_of_fungal_inhibitors_from_Epichlo_festucae [Accessed February 5, 2013].
- Zaparoli, G., Cabrera, O.G., Medrano, F.J., Tiburcio, R., Lacerda, G. and Pereira, G.G.** (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. *Mycological research*, **113**, 61–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18796332>.
- Zhang, F.J., Jin, Y.J., Xu, X.Y., Lu, R.C. and Chen, H.J.** (2008) Study on the extraction, purification and quantification of jasmonic acid, abscisic acid and indole-3-acetic acid in plants. *Phytochem Anal*, **19**, 560–567. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18618474.
- Zhao, Y.** (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, **61**, 49–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192736>.
- Zhao, Y.** (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular plant*, **5**, 334–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155950> [Accessed May 13, 2012].

ANEXOS

Anexo 1

A

Pipeline: Análise *in-silico* da expressão de genes de resposta à auxina durante interação compatível e incompatível com *M. pernicioso* em meristemas de cacau.



B.

CorID	Family_name	RT	SP	XeRT	XeSP
1	oxygenase	4	0	1,3249	-2,8375
2	copper-binding	1	0	-2,0000	-3,0000
3	cytochrome	4	2	3,3540	0,6460
4	Kinase	5	5	2,7357	2,3679
5	plasmembrane	0	2	-2,0470	-0,0617
6	calcium-binding	1	1	-1,6676	-0,1573

7	peroxidase	1	0	0,5110	0,0619
8	nitrate reductase	1	2	0,037915	0,540727
9	ubiquitin carrier	1	2	0,034036	0,037111
10	leucine-rich repeat	1	2	-3	-2
11	cinnamoyl-CoA reductase	1	2	-1	0
12	pathogenesis-related	0	2	0	2
13	heat shock	1	2	-1	0
14	pectinesterase	2	0	1	0
15	mitochondrial sorting	1	1	0	0
16	DNA-binding	5	1	5	1
17	Auxin-related	3	5	-2	1,4346
18	hormone-related	3	3	1,9581	1,8692

CorID	NAME	eRT	eSP
1	AOP2 (ALKENYL HYDROXYALKYL PRODUCING 2)	-1	-1
1	EFE (ETHYLENE-FORMING ENZYME)	1	0
1	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	1	0
1	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	1	0
1	F3H (FLAVANONE 3-HYDROXYLASE)	-0,68	-0,84
1	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	1	0
1	FLS5 (FLAVONOL SYNTHASE 5)	-1	-1
2	heavy-metal-associated domain-containing protein	1	0
2	copper-binding family protein	-1	-1
2	heavy-metal-associated domain-containing protein / copper chaperone (CCH)-related	-1	-1
2	ATFP3	-1	-1
3	CYP72C1 (CYTOCHROME P450 72C1)	1	0
3	CYP86A2 (CYTOCHROME P450 86 A2)	1	0
3	CYP71A16	0,68	0,32
3	CYP705A5	0,68	0,32

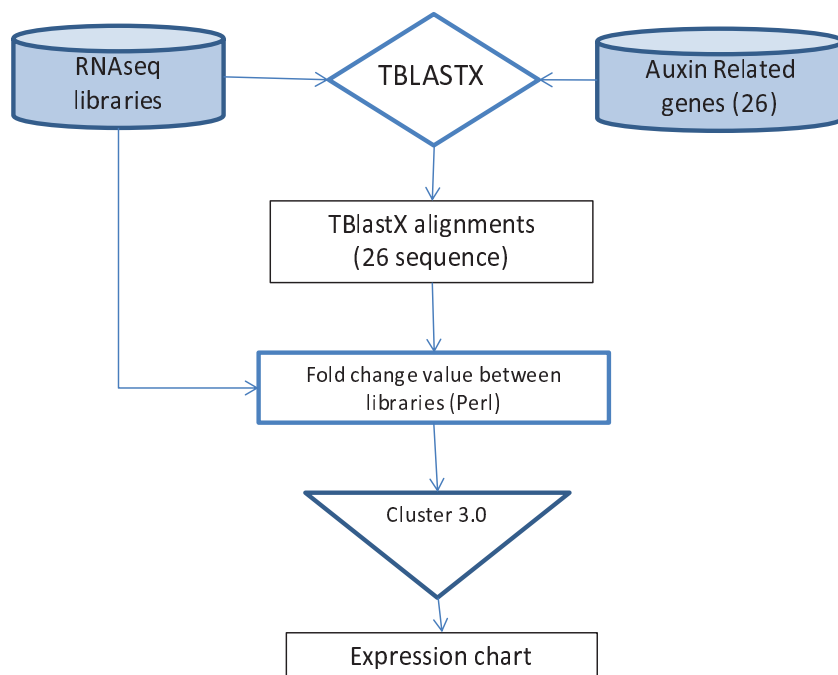
4	CLAVATA1 receptor kinase (CLV1)	0	1
4	protein kinase, putative	-1	-1
4	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	0	1
4	protein kinase, putative	1	0
4	protein kinase family protein	-0,26	-0,63
4	RBK1 (Rop Binding protein Kinases 1)	1	0
4	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	0	1
4	IBS1 (IMPAIRED IN BABA-INDUCED STERILITY 1)	-1	-1
4	protein kinase, putative	0	1
4	protein kinase family protein	1	0
4	CIPK15 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 15)	0	1
4	CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1)	1	0
4	THE1 (THESEUS1)	1	0
5	NLM1	-1	-1
5	TIP4	0	1
5	PIP1A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1A)	-1	-1
5	TIP2	0	1
5	PIP2	-0,05	-0,06
6	calcium-binding EF hand family protein	-1	-1
6	TCH3 (TOUCH 3)	-0,3	-0,08
6	calcium ion binding	0	1
6	SOS3 (SALT OVERLY SENSITIVE 3)	-1	-1
6	TCH2 (TOUCH 2)	-0,33	-0,08
6	TCH4 (Touch 4)	1	0
7	peroxidase, putative	-0,55	-0,77
7	peroxidase, putative	1	0
7	RCI3 (RARE COLD INDUCIBLE GENE 3)	0,06	-0,16
7	peroxidase 27 (PER27) (P27) (PRXR7)	0	1
8	NIA1 (NITRATE REDUCTASE 1)	0,51	0,49
8	CB5-C (CYTOCHROME B5 ISOFORM C)	-0,47	0,05
9	SCE1 (SUMO CONJUGATION ENZYME 1)	0	1

9	UBC7 (UBIQUITIN CARRIER PROTEIN 7)	-0,64	-0,28
9	UBC6 (ubiquitin-conjugating enzyme 6)	0,67	0,32
10	other RNA	-1	-1
10	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-1	-1
10	RLK (Receptor-like kinase)	-1	-1
10	LRX2 (LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN 2)	0,61	0,38
10	AtRLP27 (Receptor Like Protein 27)	0	1
11	cinnamoyl-CoA reductase family	-1	-1
11	BEN1	0,51	0,49
11	cinnamoyl-CoA reductase-related	0	1
12	pathogenesis-related protein, putative	0	1
12	PR-1-LIKE (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN-1-LIKE)	0	1
13	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	-1	-1
13	J8	0	1
13	DNAJ heat shock protein, putative	0,68	0,32
14	pectinesterase family protein	0,08	-0,46
14	PMEPCRA (METHYLESTERASE PCR A)	1	0
15	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX, putative	-1	-1
15	CIP111 (CAM INTERACTING PROTEIN 111)	1	0
15	MSP1 protein, putative / intramitochondrial sorting protein, putative	0	1
16	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	0	1
16	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	1	0
16	WRKY33	1	0
16	WRKY70	1	0
17	SHY2 (SHORT HYPOCOTYL 2)	0	1
17	AXR1 (AUXIN RESISTANT 1)	0	1
18	GA3OX1 (GIBBERELLIN 3-OXIDASE 1)	-0,68	-0,84
17	IAA5 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 5)	-1	-1
17	GH3.1	0	1
17	auxin-responsive family protein	1	0
17	IAA1 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE)	0	1

17	auxin-responsive protein, putative / small auxin up RNA (SAUR_C)	1	0
17	auxin-responsive family protein	-1	-1
17	F-box family protein	1	0
18	ERF5 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 5)	0,68	0,32
17	NIT3 (NITRILASE 3)	-1	-1
18	JAZ1 (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1)	-1	-1
18	GAI (GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE)	1	0
12	pathogenesis-related thaumatin family protein	-0,26	-0,63
17	PID (PINOID)	0	1
19	XTH18 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 18)	1	0
18	APM1 (AMINOPEPTIDASE M1)	0	1
19	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative	1	0
18	CRF2 (CYTOKININ RESPONSE FACTOR 2)	0,68	0,32
19	ADF9 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 9)	0,51	0,49
17	ABC transporter family protein	-1	-1
17	ABC transporter family protein	-1	-1
16	WRKY22	1	0
16	WRKY53	1	0

Anexo 2

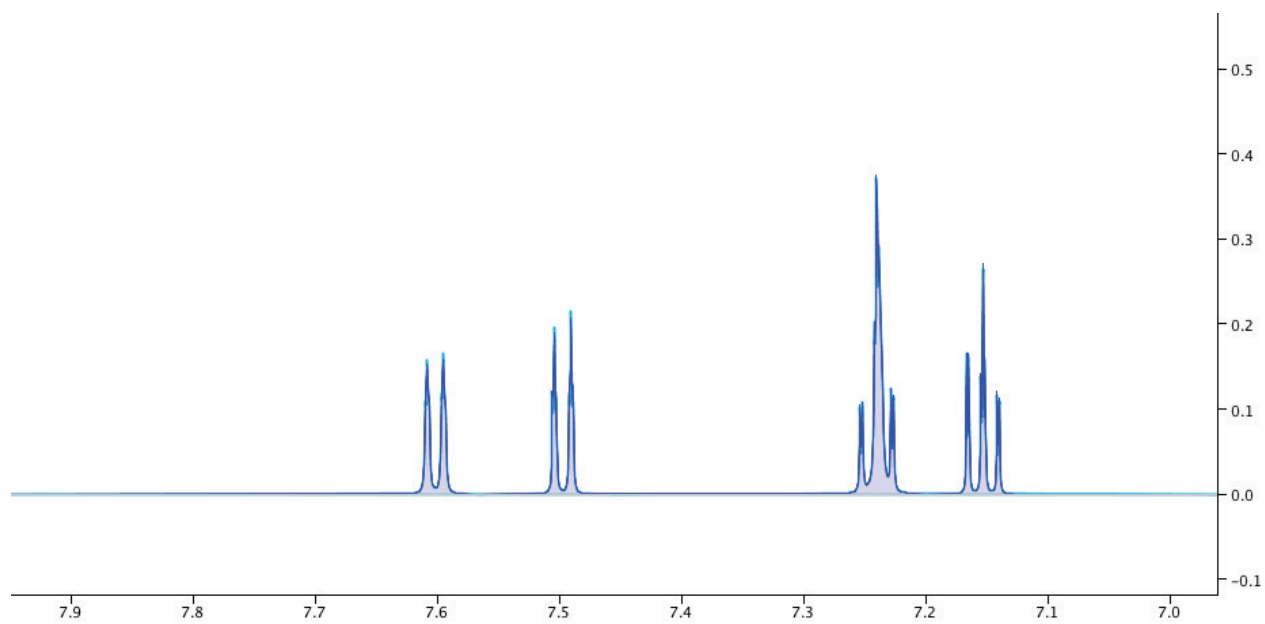
Pipeline 2: Análise *in-silico* da expressão de genes de resposta à hormônios durante a progressão da doença vassoura de bruxa



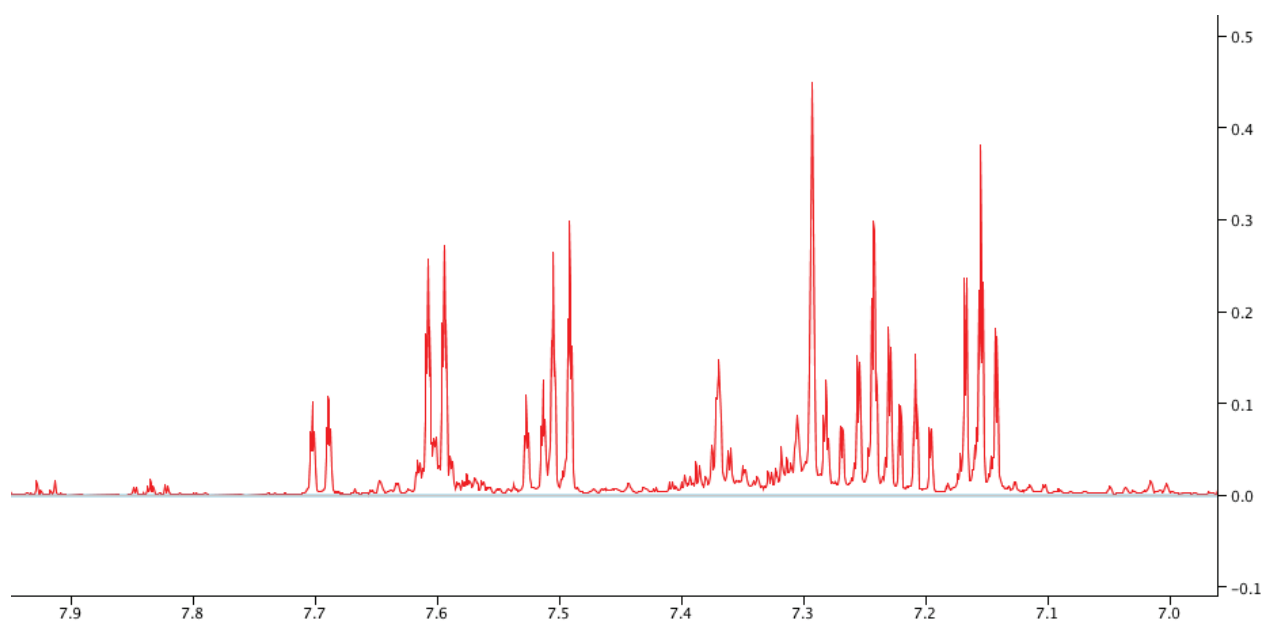
Anexo 3

Espectros NMR

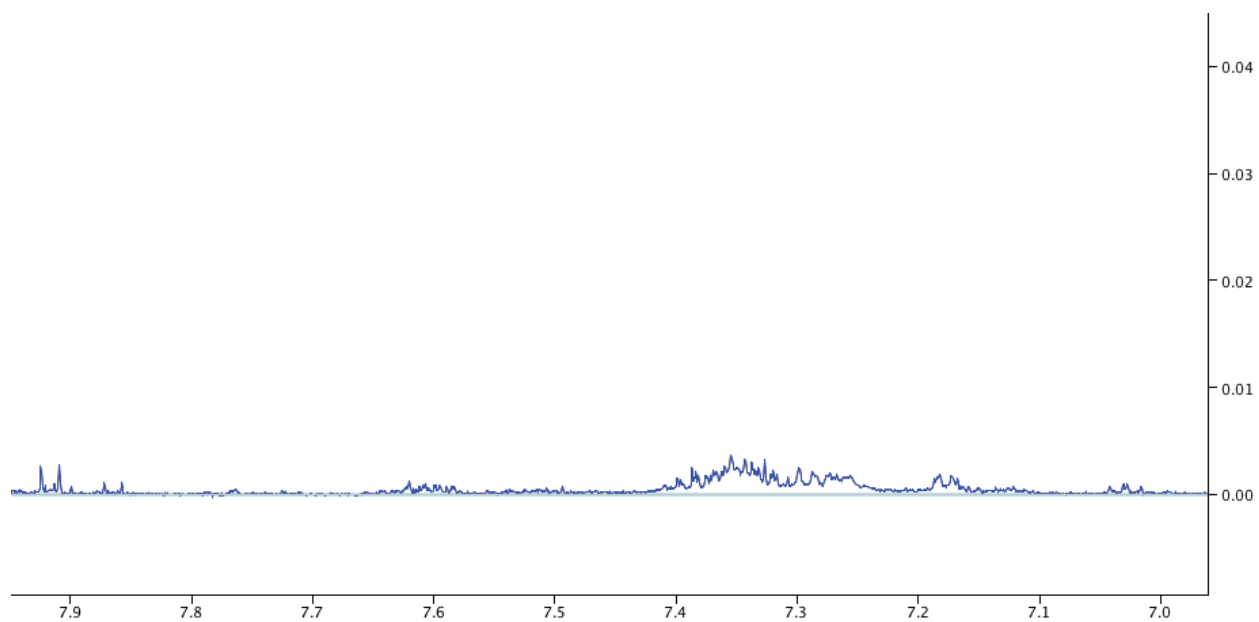
Indole-3-aceto acido



Amostra de sobrenadante do fungo na fase necrotrofica induzida com IAN -13B

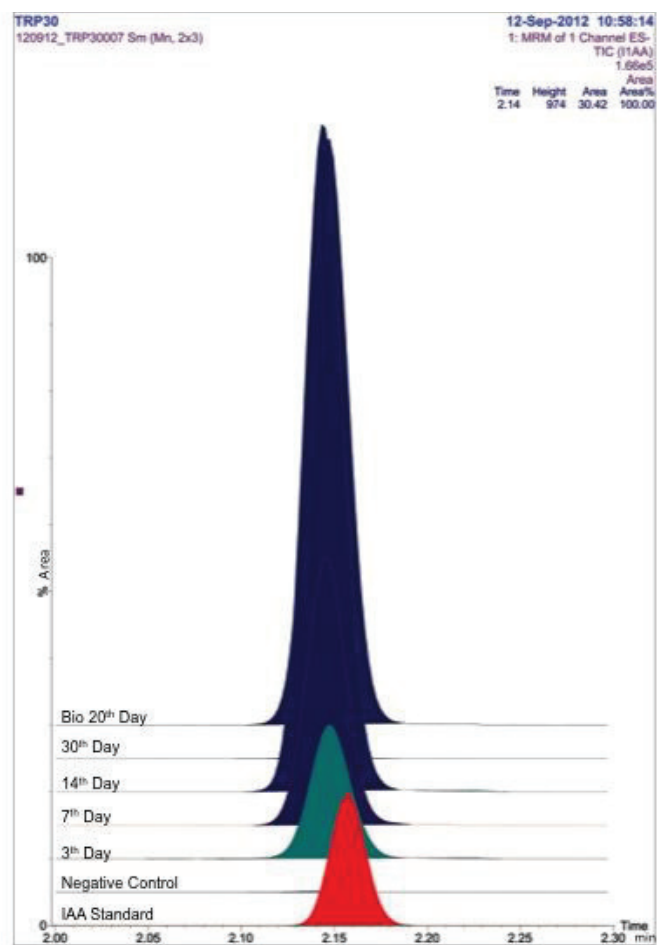


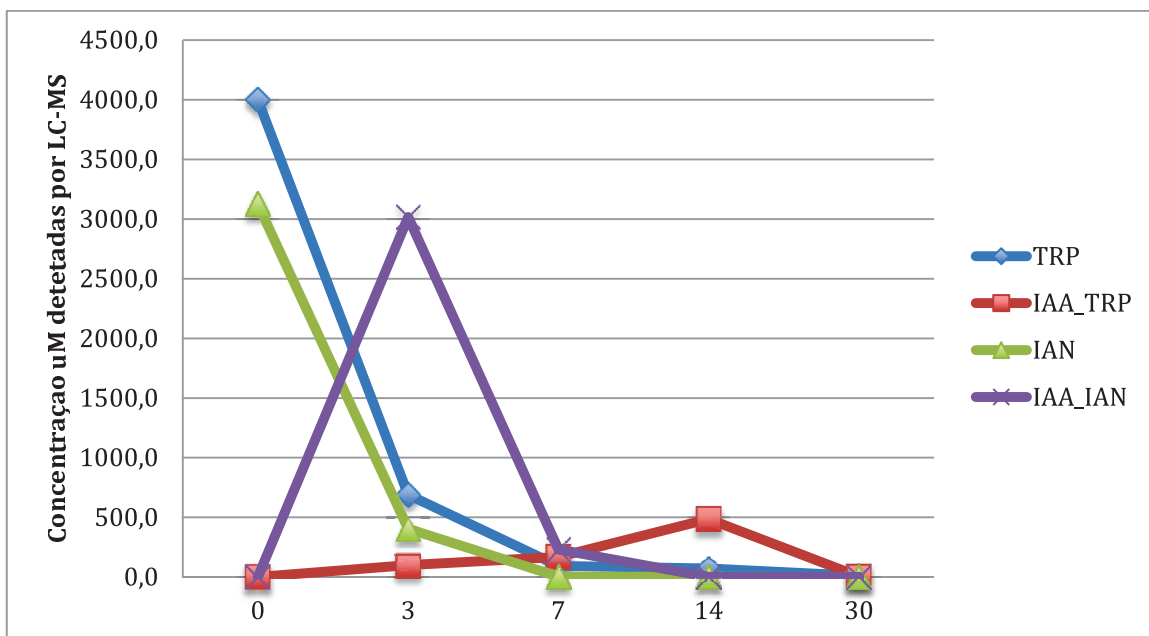
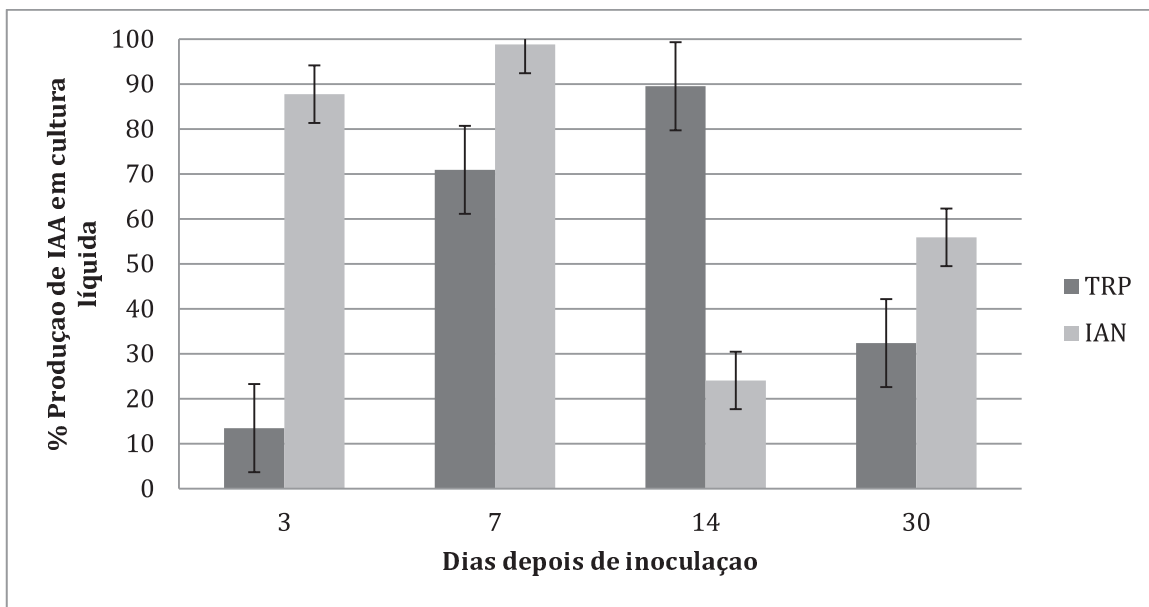
Amostra controle 10



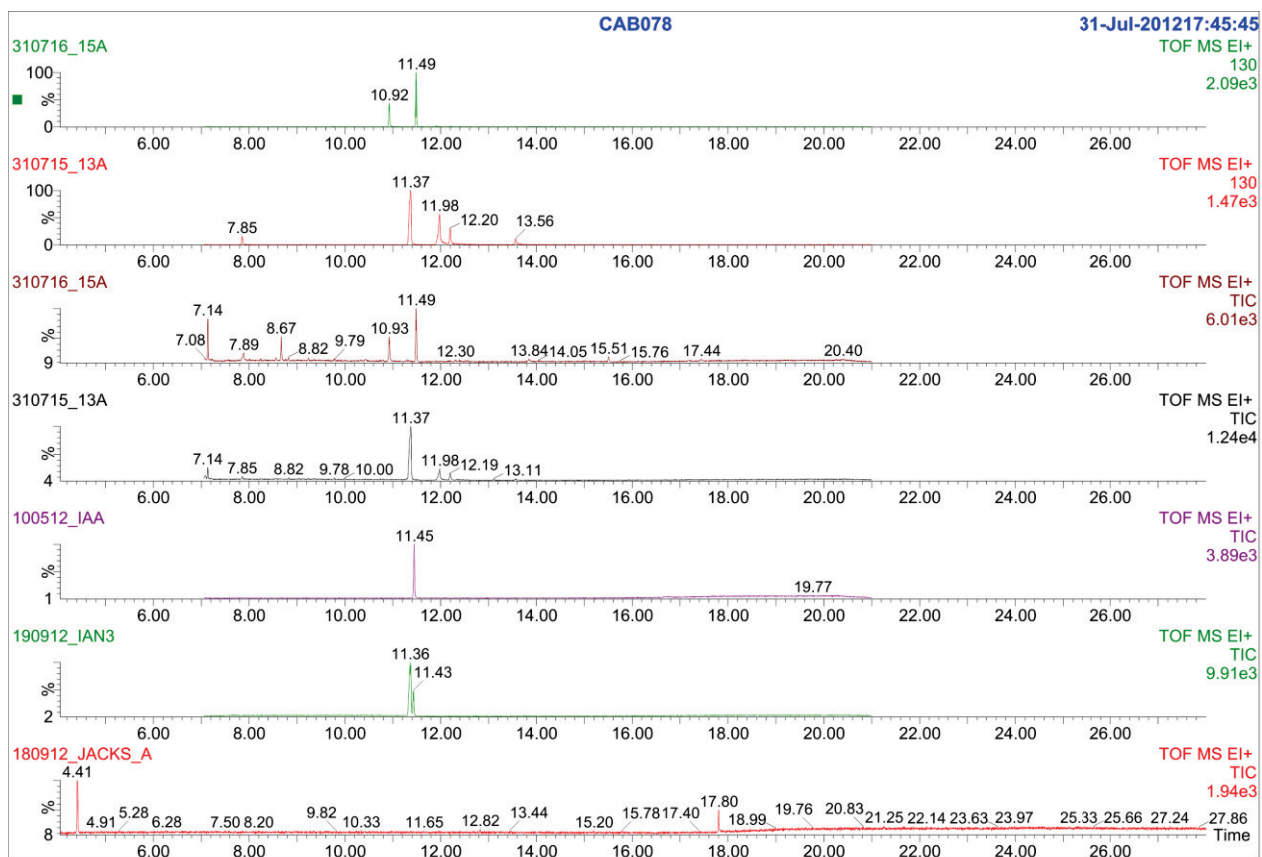
Anexo 4.

Time course da produção de IAA no transcurso do tempo.





Anexo 5.



Anexo 6

Moniliophthora perniciosa produces Auxin-like and Indole Derivatives that Alter Auxin Transport and Signaling During Early Fungal Infection in Cacao Meristems

Journal:	<i>Molecular Plant-Microbe Interactions</i>
Manuscript ID:	MPMI-04-13-0123-R
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	30-Apr-2013
Complete List of Authors:	Alvarez, Javier; UNICAMP, DGE Ambrossio, Alinne; UNICAMP, DGE Teixeira, Gleidson; UNICAMP, DGE de Moraes, Marcos; UNICAMP, DGE Teixeira, Paulo José; UNICAMP, Departamento de Genética e Evolução/IB Mieczkowski, Piotr; University of North Carolina at Chapel Hill, Department of Genetics Garcia, Odalys; UNICAMP, DGE Pereira, Gonçalo Amarante Guimaraes; UNICAMP, DGE
Area That Best Describes Your Manuscript:	Fungus–plant interactions, Genomics, mechanisms of pathogenicity < Fungus–plant interactions, hormones < Plant responses to pathogens, Plant responses to pathogens, ethylene, jasmonic acid, or salicylic acid < Plant responses to pathogens

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 *Moniliophthora perniciosa* produces Auxin-like and Indole Derivatives that
2 Alter Auxin Transport and Signaling During Early Fungal Infection in Cacao
3 Meristems

4
5 Javier C. Alvarez,¹ Alinne B. Ambrossio,¹ Gleidson Silva Teixeira ,¹ Marcos H.
6 de Moraes, Paulo JPL Teixeira¹, Piotr Mieczkowski,² Odalys Garcia¹, Gonçalo
7 A.G. Pereira¹

8
9 ¹Laborat3rio de Gen3mica e Express3o, Departamento de gen3tica e evolu3o
10 Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, SP, Brazil.

11 ²Department of Genetics, School of Medicine, University of North Carolina at
12 Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America.

13
14
15 *Corresponding author: Gonçalo. A. P. Pereira; Telephone: +55 19 35216650; Fax:
16 +55 19 35216235. E-mail: goncalo@unicamp.br

Abstract

Auxin is probably the best-characterized phytohormone, with important roles in plant growth and development. An increasing number of microorganisms appear to synthesize plant hormones that interfere with the hormonal balance of the host, altering the plant's metabolism and defense response to favor symbiosis or pathogenesis. *Moniliophthora perniciosa* is a hemibiotrophic fungus that causes Witches' Broom Disease (WBD) in cacao. This disease is characterized by symptoms that are apparently hormonally induced, such as hypertrophy, hyperplasia, and loss of apical dominance. Here, an RNAseq global transcriptome analysis of the asymptomatic stage of WBD indicated that genes related to auxin signaling, such as GH3, are overexpressed in infected plants due to a high concentration of free auxin from a non-plant source. Furthermore, an active *M. perniciosa* auxin (indole-3-acetic acid), induced by both L-Trp and indole-3-acetonitrile, was identified through gas chromatography-nuclear magnetic resonance analysis. This auxin-like molecule causes morphological alterations and promotes the overexpression of the DR5::GUS auxin-responsive reporter gene in *Arabidopsis* roots, indicating that it modulates plant hormone signaling. We propose that *M. perniciosa* produces auxin early in the infection process, and that this brings about hormonal disharmony in the infected cacao plants and thereby promotes disease progression.

INTRODUCTION

The cacao tree (*Theobroma cacao* L., Malvaceae), a native plant of the Amazonian basin, is considered to be one of the most important crops in the world. For many years, Brazil was the biggest producer and exporter of cacao seeds. However, this changed in 1989 with the emergence of Witches' Broom Disease (WBD) in the principal producing region of Brazil, in the south of Bahia state (Pereira et al., 1996). WBD is caused by a hemibiotrophic basidiomycete fungus named *Moniliophthora perniciosa* and it represents one of the most pressing phytopathological problems in South America (Meinhardt et al., 2008).

During the asymptomatic stage, *M. perniciosa* infects young meristematic tissues and colonizes the apoplastic space as monokaryotic hyphae (biotrophic). Then, it induces distinctive structures, termed 'green brooms' (Scarpari et al., 2005), which are characterized by hypertrophy, hyperplasia, loss of apical dominance, and axillar shoot proliferation (Frias et al., 1991; Purdy and Schmidt, 1996), and appear to be hormonally induced (Chaves and Gianfagna, 2006). The biotrophic stage lasts for 1–2 months in infected tissue (Meinhardt et al., 2008). Although only a few fungal cells are detected in this stage of WBD, it causes drastic changes in the morphology of plant stem tissue (Penman et al., 2000). It is well known that plant hyperplasias are also caused by pathogens that induce a hormonal imbalance in the host, mainly by producing hormones such as auxin (indole-3-acetic acid, IAA) and/or cytokinins (CK) or by altering the phytohormone metabolism of the host (Jameson, 2000; Tanaka et al., 2003). The second and final stage of WBD, termed 'dry broom', occurs only during the final stages of infection due to the growth of necrotrophic dikaryotic hyphae, which form clamp connections

for nuclear transfer and rapidly colonize the dead host cells (Meinhardt et al., 2008).

Many phytopathogenic fungi, including *M. pernicioso*, are proposed to produce IAA in enriched axenic cultures (Tsavkelova et al., 2006; Kilaru et al., 2007). However, few studies have examined in detail the biosynthetic pathways underlying auxin production by phytopathogenic fungi in infected host tissue (Reineke et al., 2008; Tanaka et al., 2011; Tsavkelova et al., 2011), partly because it is difficult to modify the auxin biosynthetic genes in fungi and partly due to the low amount of auxin secreted during fungal growth (Felten and Ditengou, 2010). With the release of the entire *M. pernicioso* genome sequence (Mondego et al., 2008), it became possible to infer which pathway is involved in auxin biosynthesis in this pathogen. Genes that encode enzymes involved in the conversion of Trp to auxin precursors were identified, including one Trp decarboxylase, one amine oxidase, and one tryptamine oxydase. These enzymes may be part of the TAM (tryptamine) and IPA (indole-3-pyruvate) pathways, which lead to the synthesis of two direct auxin precursors, IAD (indole-3-acetaldehyde) and IAN (indole-3-acetonitrile). Furthermore, other genes capable of metabolizing the last step of auxin synthesis using these precursors were identified, i.e., an IAD dehydrogenase and four nitrilases, enzymes thought to convert IAN to IAA and ammonium (Alvarez et al., 2012).

Auxin and/or its signaling pathway modulate plant disease resistance both directly, by interfering with the plant defense circuitry, and indirectly, by altering plant development to change the progression of the interaction (Kazan and Manners, 2009). An example of direct alteration is the ability of some plant

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

97 pathogens to alter the expression of auxin biosynthetic genes and down-regulate
98 the plant defense pathways via cross-talk with other hormone signaling pathways,
99 such as those involving salicylic acid (SA), ethylene (ET), and jasmonic acid (JA)
100 (López et al., 2008). Arteca and Arteca (2008) concluded that ET production is
101 enhanced by auxin, because IAA directly stimulates the activity of a 1-
102 aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase gene, which encodes a key
103 enzyme in ET biosynthesis. In a complementary fashion, ET has a feedback action
104 on auxin biosynthesis (Woltering et al. 2005). Similarly, JA and auxin signaling
105 share many commonalities and interact positively. In contrast, JA signaling is
106 generally antagonistic to SA signaling (Kazan and Manners, 2009) and SA and
107 auxin signaling seem to be mutually antagonistic, because auxin suppresses SA-
108 dependent defenses, such as PR1 expression (Wang et al., 2007).

109
110 In plants, IAA can influence important physiological processes, including cell
111 enlargement and division, tissue differentiation, and responses to light and gravity
112 (Woodward and Bartel, 2005). Also, it is the main trigger regulating different steps
113 of lateral root (LR) formation (Laskowski et al., 2008), including the LR emergence
114 caused by local auxin accumulation in lateral root founder cells (Dubrovsky et al.,
115 2008). LR development and the molecular regulation of this process have been
116 well described in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Casimiro et al., 2001; De
117 Smet et al., 2006). Felten and Ditengou (2010) detected changes in the auxin
118 response and transport in poplar and *Arabidopsis thaliana* roots during contact with
119 the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*, demonstrating that this fungus
120 enhances the auxin response and alters auxin distribution in the root apex.

1
2
3 121 However, the exogenous application of a similar concentration of IAA as released
4
5 122 by *L. bicolor* (i.e., ~10 nM) did not stimulate lateral root formation in *Arabidopsis*
6
7 123 *thaliana* (Felten et al., 2009).

8
9
10 124 DR5::GUS is a marker used to monitor the distribution of endogenous free
11
12 125 IAA (Sabatini et al., 1999). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the
13
14 126 DR5::GUS (β -glucuronidase) reporter have been widely used in auxin induction
15
16 127 and transport studies. Previous studies shown that pathogen-derived IAA
17
18 128 stimulated GUS activity in the infected vascular tissues of transgenic tomato and
19
20 129 rive plants harboring DR5::GUS (Marelli et al., 2009; Tanaka et al., 2011). DR5
21
22 130 consists of seven-copy tandem direct repeats of an 11-bp sequence that includes
23
24 131 the auxin-responsive TGTCTC element found in the *GH3* family. Several members
25
26 132 of the *GH3* family encode IAA-conjugating enzymes and are regulated by auxin
27
28 133 response factors (ARFs) (Park et al., 2007). Interestingly, plants expressing some
29
30 134 of these genes show activated defense responses, and overexpression of some
31
32 135 *GH3* genes results in reduced levels of free auxin and in increased disease
33
34 136 resistance to biotrophic pathogens (Domingo and Andrés, 2009; Fu et al., 2011).

35
36
37 137 In the present work, we inspected RNA-seq data of cacao plantlets infected
38
39 138 with *M. perniciosa* during the initial asymptomatic stage and identified auxin-related
40
41 139 gene expression, probably induced by the fungus, during WBD infection. Then, we
42
43 140 investigated the mechanism by which auxin could be produced by *M. perniciosa*
44
45 141 and tested whether fungal auxin could trigger or modulate the susceptibility of
46
47 142 cacao to this hemitrophic pathogen.

48
49
50 143

51 144 **RESULTS**

Recently, Teixeira et al. (2013) revealed that members of the three families of auxin-responsive genes (SAUR, AUX/IAA, and GH3) are over-expressed in the green broom stems characteristic of the symptomatic infection stage in cacao. To determine the timing of the induction of these genes and to establish whether plant or fungal auxin synthesis was responsible for altering the gene expression, we evaluated the expression of these genes during in the early stages of WBD. To do so, we inspected illumina RNAseq libraries from the initial asymptomatic stage of WBD. To globally assess gene expression after challenge by *M. perniciosa*, a bioinformatics pipeline was constructed (see Materials and Methods).

We performed an enrichment analysis to identify Gene Ontology (GO) terms that are overrepresented in genes that exhibited significant differential expression during the early interaction, and found that three hormone-related GO descriptions were enriched using InterPro terms. All three of the dormancy/auxin-associated proteins in cacao were differentially expressed, five of the twenty-six (19%) GH3 auxin-responsive proteins were differentially expressed (19% of representation), and two of the three late embryogenesis abundant proteins were differentially overexpressed. We obtained the annotations of these genes from the Cacao Genome Project database and determined the significant values of expression (FDR <0.05). In addition, we searched for differentially expressed genes related to the auxin-signaling pathway, from synthesis to response. No one gene related to auxin synthesis was identified as being differentially expressed during early infection. The fold-change and annotation of auxin-related genes altered during the

first contact with the pathogen, such as GH3, SAUR, and, interestingly, PILS, an auxin efflux carrier, are presented in Table 1.

***M. pernicios*a extracellular media alters root development and inhibits polar auxin transport**

To investigate if a possible phytohormone-like molecule produced by *M. pernicios*a would alter plant growth and development, we examined whether extract supernatants of the necrotrophic stage of *M. pernicios*a supplemented with IAN (labeled "Supernatant" in Figure 1) or Trp 15 days after inoculation, could change normal root formation in wild-type Arabidopsis seedlings and, moreover, whether they could mimic the LR stimulation induced by exogenous IAA-auxin or, contrarily, an auxin antagonist (p-chlorophenoxyisobutyric acid, PCIB). We detected and measured changes in the morphology of the roots of 9-day-old seedlings grown in Petri dishes containing different treatments. A negative control was included that consisted of medium that lacked vitamins and contained 1% ethanol (the solvent of IAA; Fig. 1). A second negative control, named "Mock" and consisting of medium that lacked vitamins and 1% (v/v) of medium extract that had not been inoculated with fungus, was included to test if the components of the medium influenced root growth. We found that treatment with the fungal supernatant extract drastically decreased the length of the primary root and influenced LR development compared with the controls (Fig. 1, Supplementary Fig. S2). Similarly, LR formation and primary root growth were reduced by applying a high concentration (20 μ M) of IAA or PCIB, an inhibitor of auxin action (Oono et al.

1
2
3 192 2003). We also supplemented growth media with necrotrophic mycelium and spore
4
5 193 extracts. Then, we measured the root lengths of seedlings subjected to each
6
7 194 treatment and performed a Fisher LSD statistical test to compare the mean values
8
9 195 for different treatments. The supernatant fungal extract treatments grouped
10
11 196 together with treatments supplemented with exogenous auxin and PCIB. On the
12
13 197 other hand, treatments supplemented with mycelium and spore extracts grouped
14
15 198 with the negative controls and did not alter root formation of wild-type Arabidopsis
16
17 199 (Fig. 1, Supplementary Fig. S2).

20
21 200
22
23
24 201 We analyzed the auxin response in transgenic Arabidopsis roots expressing
25
26 202 DR5::GUS during contact with the fungal extracts. We found that the presence of
27
28 203 fungal supernatant caused GUS signal to accumulate in the basal meristem of 7-
29
30 204 day-old seedlings (Fig. 1). IAA treatment expanded the GUS signal throughout the
31
32 205 root of all plants. Conversely, PCIB treatment resulted in a low signal in the
33
34 206 provascular tissue that was only localized to the root tip. Similarly to auxin
35
36 207 treatment, roots subjected to the mock treatment showed an intense GUS signal
37
38 208 (Fig. 1). This suggests that the fungal growth medium contains some components
39
40 209 that increase endogenous auxin production.

41
42 210
43
44
45
46
47
48 211 **Detection of IAA and related indoles produced by *M. perniciosa* in liquid**
49
50 212 **cultures**

51
52
53 213 In view of the possibility that *M. perniciosa* produces IAA and/or other
54
55 214 indole-related components capable of altering auxin signaling, we searched for
56
57 215 secreted indole metabolites in *M. perniciosa* liquid cultures. Supernatant cultures

1
2
3 216 were extracted and analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR), liquid
4
5 217 chromatography-mass spectrometry (LC/MS), and gas chromatography/tandem
6
7 218 mass spectrometry (GC-MS/MS). IAA was detected 15 days after inoculation in the
8
9 219 supernatant extract of necrotrophic cultures supplemented with L-Trp or IAN
10
11 220 (samples named 15A and 13A, respectively). The spectra of these samples were
12
13 221 identical to those in the local Chenomx NMR reference library and to standard
14
15 222 spectra, whereas IAA spectra were absent in all of the medium controls (samples
16
17 223 10B and 14B, respectively). Figure 2 is a superposition of NMR spectra derived
18
19 224 from the IAN-induced necrotrophic supernatant extract (13B), the medium control
20
21 225 (10B), and IAA standard samples. The IAN-induced sample had an equivalent
22
23 226 spectrum to IAA that was not present in the control sample.

24
25
26
27
28
29 227 To quantify IAA production in liquid culture, we performed a time-course
30
31 228 analysis of the supernatant culture of necrotrophic fungus externally supplemented
32
33 229 with 4 mM of Trp or 3 mM of IAN using LC-MS/MS analysis. IAA and IAN were
34
35 230 identified based on their daughter ions at 130.5 $[M/Z]^+$ and 26.3 $[M/Z]^+$,
36
37 231 respectively, and quantified according to standards. The retention time peaks of
38
39 232 the standards were at 2.16 min for IAA and 2.74 min for IAN. We found a high
40
41 233 concentration of IAA in the necrotrophic sample supplemented with IAN (13A) and
42
43 234 no signal for the IAN precursor, showing that the IAN pathway could efficiently
44
45 235 convert the precursor to auxin, probably by means of a nitrilase enzyme
46
47 236 (Supplementary Fig. S3).

48
49
50
51
52 237 The quantity of IAA produced by the necrotrophic fungus in one month is
53
54 238 shown in Table 2. IAA production was detected even in the absence of Trp or IAN
55
56 239 (0.52 μM) using LC-MS/MS. However, externally supplemented Trp increased IAA
57
58
59
60

Biosynthetic pathway of IAA in *M. perniciosus*

11

dominant IAA biosynthetic pathway when Trp is added to the medium. Further, tryptophol also accumulated in the Trp-supplemented media (Fig. 3). This compound has been proposed to serve as a reservoir for IAA and to maintain IAAld levels in equilibrium in plants (Brown and Purves, 1980). In the other experiment with media supplemented with IAN, IAN was rapidly converted into IAA, then to IALD, and subsequently to ICA. IALD and ICA were found to accumulate in other IAN feeding experiments in plants, and both are used as substrates of the camalexin biosynthesis pathway (Böttcher et al., 2009).

We conducted a literature survey to identify the main enzymes that catalyze IAA pathways in microorganisms (Spaepen et al., 2007; Spaepen and Vanderleyden, 2010), including those previously predicted to be present in the *M. perniciosa* genome, using Blastp and the latest version of the *M. perniciosa* genome (Thomazella et. al., manuscript in preparation). Candidate *M. perniciosa* genes of the IAA biosynthesis pathway, with significant levels of identity (E-value <0.005 and identity >30%), are shown in Table 3. Curiously, three putative members of the IPA pathway are located in a 6336-bp cluster.

Expression of genes involved in the auxin pathway

A co-expression analysis using RNA-seq data from cultures of fungi at various development stages was performed to test whether the candidate genes of the IAA biosynthetic pathway found in the *M. perniciosa* genome were co-regulated (Fig. 4). Genes encoding enzymes 5 and 6 (see Table 3 and Table S1) from the IAN pathway (Fig. 4, in yellow) were co-regulated and had higher expression during basidiospore germination and in the monokaryotic mycelium (biotrophic

DISCUSSION

Our first evidence that the distribution of auxin is altered in cacao infected by *M. perniciosa* was derived from an analysis of the global transcriptomic response of cacao during the asymptomatic stage of infection. We identified six GH3.1 genes that were up-regulated in the host plants during the first 48 h of infection. Proteins of the GH3 family catalyze the synthesis or hydrolysis of IAA–amino acid

conjugates. Specifically, GH3.17 is an amino synthetase that promotes the conjugation of auxin with the amino acids Glu or Asp, leading to the degradation of the auxin (Staswick et al., 2005). Thus, the plant may use these enzymes to reduce the concentration of free auxin in the cell. Additionally, the expression of an auxin efflux carrier protein is increased during early infection, and this could represent a plant defense mechanism aimed at controlling the amount of hormone. Some pathogens that secrete IAA may efficiently induce GH3 expression upon pathogen infection (Fu et al., 2011). For instance, infection of *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* leads to transcriptional activation of auxin-conjugating GH3.2 and consequently to the accumulation of IAA-Asp in Arabidopsis (González-Lamothe et al., 2012), showing that this auxin conjugation promotes plant disease development. Based on these data, we infer that the fungus causes auxin-responsive gene expression fluctuation during the early stages of WBD, and that such modulation of gene expression could be due to a fungal auxin-like molecule that interferes with the expression of plant auxin-responsive genes.

Does *M. Perniciosa* impair auxin signaling in plants? We approached this question by testing which fungal compounds are secreted and by examining whether they could induce an auxin-dependent response in the lateral roots of Arabidopsis seedlings by stocking an auxin. Consistent with the model for lateral root initiation in Arabidopsis (Casimiro et al., 2001), primary root elongation was reduced and lateral root formation was promoted in Arabidopsis roots supplemented with induced fungal extract, probably due to the inhibition of auxin transport. Thus, *M. perniciosa* enhances the auxin response and changes its distribution in the root apex of Arabidopsis. Molecular and functional analyses

DR5::GUS has been used as a marker of free-auxin concentrations in the shoots and roots of transgenic Arabidopsis plants (Ulmasov et al., 1997), providing a convenient means of monitoring changes in auxin responses during plant defense (Kazan and Manners, 2009). We observed a clear activation of the GUS reporter gene in root tips when the fungus supernatant was included in the growth medium of DR5::GUS Arabidopsis. Two hypothetical scenarios could explain this auxin accumulation. First, an auxin-like molecule secreted by the fungus may be taken up into the root and accumulate in the tip. Second, endogenous auxin biosynthesis may be activated in the root apex by another fungal molecule, such as ET (Stepanova et al., 2008). Although we cannot exclude the second possibility, we have verified that *M. perniciosa* is able to produce auxin under *in vitro* conditions, and this would explain the increased auxin response in Arabidopsis roots after treatment with fungal cultures.

15

1
2
3 359 treatments did not appear to repress the GUS signal, and no SA-like molecules
4
5 360 were produced by the fungus in the supernatant extract. Therefore, we believe that
6
7
8 361 no hormone antagonist to auxin is present, at least not in the Trp-induced liquid
9
10 362 cultures. All of the above findings support our first hypothesis that polar auxin
11
12 363 transport and signaling are impaired by an auxin-like substance, which causes a
13
14
15 364 hormonal imbalance in the plant and subsequently increases susceptibility during
16
17 365 the early phase of the fungal-plant interaction.

18
19
20 366 How could an auxin-like molecule be produced by the fungus? We
21
22 367 examined the biosynthetic pathway of IAA in liquid cultures of *M. perniciosa* by
23
24 368 analyzing intermediate products and by performing various feeding experiments.
25
26
27 369 Based on the finding that Trp is involved in the biosynthesis of IAA in many
28
29 370 species, including fungi (Normanly, 2010), we tested whether Trp is an inducer and
30
31 371 precursor of this pathway in *M. perniciosa*. According to our data, *M. perniciosa* is
32
33 372 capable of utilizing IPA and IAN pathways to synthesize IAA, but the dominant
34
35 373 pathway is IPA, the typical pathway detected in higher plants (L-Trp → indole-3-
36
37 374 pyruvic acid → indole acetaldehyde → IAA). Tanaka et al. (2003) reported similar
38
39 375 results for witches' broom of bamboo, which is caused by *Aciculisporium takei*.
40
41
42 376 Trp-dependent IAA biosynthetic pathways have also been described in bacteria
43
44 377 such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, and *Rhizobium*;
45
46 378 however, these organisms synthesize IAA via the indole-3-acetamide (IAM) and/or
47
48 379 indole-3-acetonitrile (IAN) (Yamada et al., 1985; Kobayashi et al., 1995) pathways.
49
50
51 380 Redundant pathways in phytopathogenic organisms could separately contribute to
52
53 381 different aspects of the fungal lifecycle (e.g., pathogenicity or epiphytic fitness). IPA
54
55
56
57
58
59
60

We also detected other indole derivatives, such as tryptophol, anthranilate, and isatin, which have antifungal activities, in Trp-induced liquid cultures. These compounds accumulated in *M. pernicioso* beyond 14 days after inoculation and may play a role in disease resistance (Yue et al., 2000; Nidiry and Babu, 2005). The virulence of many plant and animal fungal pathogens involves the ability to undergo morphological transitions between a single cell and filamentous forms (Hogan, 2006). Tryptophol and low nitrogen conditions are used by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* as extracellular signals to govern filamentation and then Quorum-sensing, which facilitate the response to both cell density and the nutritional status of the environment (Chen and Fink, 2006). Thus, *M. pernicioso* could use this extracellular molecule to transmit information about population density and environmental conditions. Interestingly, another important metabolite that accumulated in *M. pernicioso* supernatant cultures was indole-3-carboxylic acid (ICA). ICA can be conjugated with Cys by a GH3.5 enzyme to form indole-3-acyl-cysteinate (ICA(Cys)), which is a precursor of camalexin (Wang et al., 2012). Rogers et al. (1996) reported that camalexin exhibits cytotoxicity against Gram-negative bacterial pathogens, but is also toxic to Arabidopsis cells growing in tissue culture. However, some fungi show resistance to camalexin due to both active degradation (Glawischnig, 2007) and efficient exportation. *Botrytis cinerea* has a mechanism of resistance against camalexin that involves ABC transporters that function in the efflux of fungitoxic compounds (Stefanato et al. (2009). Thus,

1
2
3 406 *M. pernicioso* could promote plant cell death by camalexin over-production and
4
5 407 resist high concentrations of this compound by means of an efflux multi-drug
6
7
8 408 transporter.
9

10 409 We detected some of the main genes encoding putative enzymes involved
11
12 410 in the auxin biosynthetic pathways in the *M. pernicioso* RNA-seq libraries. IPA
13
14 411 enzymes were upregulated during the necrotrophic phase, whereas IAN enzymes
15
16 412 appeared to be more active during the initial stages of growth. An advantage of
17
18 413 pathogens being able to produce IAA by different pathways is that they can
19
20 414 selectively use pathways that are not, or are only weakly, regulated by the plant.
21
22 415 Such pathogens can accumulate a large amount of IAA, and thereby facilitate
23
24 416 invasion and pathogenicity by suppressing the plant defense response (Manulis et
25
26 417 al., 1998). This notion is consistent with the hypothesis that *M. pernicioso* uses
27
28 418 different IAA biosynthetic pathways depending on the microenvironment and
29
30 419 developmental stage.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

420
421 In conclusion, the main achievement of our study was to identify an active
422 fungal auxin induced by Trp and produced via different biosynthetic pathways
423 depending on environmental conditions. We propose that *M. pernicioso* produces
424 IAA, which impairs auxin signaling in the host plant and promotes IAA
425 accumulation at the infection site. Fungal auxin alters GH3 expression in plants
426 and this could alter the susceptibility of cacao to *M. pernicioso*, down-regulate the
427 SA response, and promote camalexin production from ICA.
428
429

MATERIALS AND METHODS

Plant infection

Infection was performed in a greenhouse at a temperature of 26±4°C, a photoperiod of 12 h, and a humidity of >80% using *Theobroma cacao* L. variety ‘comum’ (Catongo type). Active apical meristems were inoculated with 20 µl of a basidiospore suspension (10⁵ spores ml⁻¹) or suspension buffers as a control, followed by incubation in a humid chamber for 24 h (Frias et al., 1991). A time-course of total RNA was isolated for the early plant–fungus interaction (6, 12, 24, and 48 h after inoculation) using an RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer’s instructions. RNA was treated with DNase I AmpGrade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and its concentration was determined using an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). The total RNA at all time points was extracted in triplicate and then sequenced at the High-Throughput Sequencing Facility at the University of North Carolina at Chapel Hill, USA.

RNA sequencing and analysis

Libraries were constructed from mRNA isolated from the meristems of infected cacao plants and their respective controls using TruSeq RNA Sample Preparation Kits v.2 (Illumina, San Diego, CA, USA) and sequenced using Illumina RNAseq technology (Hiseq2000, SEx50 at UNC-HTSF – USA). The sequenced data from infected plants at 12, 24, and 48 hours after infection were pooled, and each point

was treated as a replicate. Infection of the samples was validated; first, before sequencing, by qPCR amplification of both fungal housekeeping genes β -Actin (ACTF; 5'-CCCTTCTATCGTCGGTCGT-3', ACTR; 5'-AGGATACCACGCTTGGATTG-3') and α -Tubulin (TUAF; 5'-TGTCAACCTGGTTCCTTTCC-3', TUAR; 5'-GACAGCACGGTACTGTTGG-3') and, second, after sequencing, by quantifying the expression of fungal reads in each library dataset. Then, reads were aligned against the cacao and *M. perniciosa* transcriptome using gene models from the Cacao Genome Project (Argout et al., 2011) and the last version of the Witch's Broom Project (Mondego et al., 2008). Read Counts and RPKMs (reads per kilo base per million) were calculated for each gene relative to the corresponding control values using homemade Perl scripts (Mortazavi et al., 2008). In addition, the edgeR package (Robinson et al., 2010) was used to calculate the Biological Coefficient of Variation (McCarthy et al., 2012) of the libraries and the fold-changes of differentially expressed genes.

GO term enrichment analysis

The frequency of the GO term was calculated from the differentially expressed (DE) genes and determined statistically with a False Discovery Rate correlation (FDR) $\leq 5\%$ when infected and controls libraries were compared. The annotations of the DE genes were compared with the whole cacao gene annotation as reference set using the InterPro database as Curator and a level of significance selected as 0.05. Genes that were up- and down-regulated were analyzed separately and a hypergeometric test was run using the Benjamini and Hochberg's

Arabidopsis and Fungal Material and Growth Condition Experiments

Wild-type and transgenic Arabidopsis plants containing the auxin-responsive promoter DR5::GUS construct were obtained from an ABRC stock (CS16715, TAIR; www.arabidopsis.org). *A. thaliana* seeds were surface-sterilized first with 75% ethanol, 6% sodium hypochlorite (100% commercial laundry bleach) and then washed four times with sterile distilled water. The seeds were spread in a row on vitamin-free MS medium (Murashige and Skoog, 1962) with 0.8% plant agar and 1% (w/v) sucrose. The plates were maintained at 4°C for two days to enhance germination. Then, the plants were grown vertically at 22°C under continuous white light (20-40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 7-9 days.

Four spherical pieces (5-mm diameter) from necrotrophic *M. perniciosa* fungal isolate CP02 (Mondego et al., 2008) were cultured in 125-ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of biotrophic-like growth medium (Meinhardt et al. 2006) without the addition of IAA, but supplemented (or not) with 0.08% L-Trp (Sigma, cat: 51145) or 3 mM indole acetonitrile (Sigma, Cat. 129453) at 28°C, 200 rpm in the dark. Extracts were prepared by collecting liquid media using filter paper. In time-course experiments, cultures were harvested at 3, 7, 14, and 30 days after inoculation and stored at -20°C until the extraction procedure.

Extraction and purification of compounds

All samples were acidified to pH 2.5 with HCl. One hundred milliliters of ethyl acetate was added to the samples and each mixture was vortexed for at least 5 min and then pipetted into a separatory funnel. Then, 80 ml of the ethyl acetate

1
2
3 525 layer was transferred to a new tube. This procedure was repeated three times for
4
5 526 each sample and approximately 250 ml of extract was collected per sample. The
6
7
8 527 ethyl acetate phase was reduced under vacuum using a rotary evaporator with a
9
10 528 water bath temperature of 50°C and 73 mm Hg. Extracts were dissolved in 2 mL of
11
12 529 ethyl acetate and each final volume was evenly divided into five tubes. One tube
13
14
15 530 was used for GC-MS experiments and one was stored at 4°C. The remaining three
16
17 531 extracts were totally dried using a SpeedVac, and one of these was stored at 4°C
18
19 532 and the others were suspended in 1 ml of 10% ethanol and 1 ml of water for plant
20
21 533 experiments and LC-MS/MS, respectively.
22
23

24 534

25
26
27 535 **Observation of root development**

28
29 536 Vitamin-free MS media were supplemented with 1% EtOH as a control, 1% (v/v) of
30
31 537 a medium extracted without fungal inoculation as a mock, 20 µM IAA (Sigma-
32
33 538 Aldrich, cat: I3750), 20 µM PCIB (Sigma-Aldrich, cat: 197777), or 1% (v/v) of a Trp-
34
35 539 or IAN-induced fungal extract. For the GUS assay and root length observations,
36
37 540 seven to ten DR5::GUS or wild-type Arabidopsis plants were seeded per Petri dish
38
39 541 and root morphology was observed 7 and 9 days after germination, respectively.
40
41 542 Photomicrographs were acquired using an Olympus BX51 microscope (Olympus,
42
43 543 Germany). The root length of seedlings subjected to the following treatments was
44
45 544 also measured: 20 µM IAA (IAA), 1% necrotrophic supernatant extract (EN), 1%
46
47 545 necrotrophic supernatant (SN), 2% sonicated spore solution (SSS), 20 µM PCIB
48
49 546 (PCIB), 1% biotrophic supernatant (SB), 1% necrotrophic medium (MN), 1%
50
51 547 extracted necrotrophic medium (EMN), 1% mycelium necrotrophic extract (EMiN),
52
53 548 water (Mock), 1% spore extract (SE) and 1% sonicated spore extract (SSE; 1 ml of
54
55
56
57
58
59
60

solution with *M. pernicioso* spores was sonicated using an ultrasonic cell disrupter [UNIQUE, SP, Brazil] by two 25-s pulses of 20 kHz and then extracted). The experiments were prepared in triplicate and repeated twice with similar results.

GUS activity assays

For histochemical analysis of GUS activity, DR5::GUS plants treated with the different extracts were submerged in GUS staining buffer (X-Gluc) containing 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -glucuronidase, 10 mM sodium phosphate (pH7.5), 0.5 mM potassium ferrocyanide, 10 mM EDTA, and 0.1% Triton X-100. Seedlings were vacuum-infiltrated with the staining solution for 3 min, incubated at 37°C in the dark for 12 h, and then cleared with 70% ethanol.

Metabolomics Analysis

IAA detection by NMR

Nuclear magnetic resonance (NMR) was performed on three lyophilized samples (13B, 10B, and the IAA standard) at the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Campinas, SP – Brazil. The hydrogen spectra were acquired using an Agilent Inova NMR Spectrometer operating at 600 MHz. Two-hundred-and-fifty-six scans were accumulated with 32k points at 25°C using a water suppression pulse sequence and then analyzed using Chenomx NMR Suite V.7.5.

GC-MS analyses

Samples immersed in a volume excess of ethyl acetate were reduced under a stream of dry, oxygen-free nitrogen gas. Fifty microliters of N,O-bis(trimethylsilyl)-

acetamide (Sigma-Aldrich, cat: 15238) or methane gas was used as derivatizing reagent prior to GC-MS analysis. Analyses were performed using a GCT-Premier Waters gas chromatographer, equipped with an Agilent column HP-5 MS using helium as carrier gas with a flow rate of 1 mL min⁻¹. The oven temperature was set at 60°C, increased to 200°C at 15°C min⁻¹, and then increased to 280°C at 10°C min⁻¹ and held for 2 min. Spectral data were obtained with an ionization energy of 70 eV and mass scan range from 50 to 700 amu (atomic mass units). The MS source temperature was set to 250°C. The injection volume was 1 µL and the experiment was run three times. The scan range was 29–540 [M/Z]⁺. Compounds were identified by comparison with commercially available standards or the equipment's library (NIST 98) with an identity of at least 70% for spectrum-structure consistency and also by comparison with the retention index (minutes) of methylated IAA and IAN.

IAA detection by LC-MS/MS analysis

IAA (Sigma-Aldrich, cat: I3750) and indole acetonitrile (Sigma-Aldrich, Cat. 129453) were analyzed as standards. Furthermore, media supplemented with a known concentration of IAA or IAN was included as positive controls. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) was performed using a Waters Acquity UPLC/TQD with a photodiode array (UV) and triple quadrupole mass spectrometer (MS/MS) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The column used was an Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1x 50 mm. Mobile phase A was water and mobile phase B was acetonitrile; both contained 0.15% formic acid. The gradient elution was performed at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ as follows: 0-3.5

min, 1-30% B and 3.6-4 min, 1% B. The mass spectra were obtained in the range 100-400 $[M/Z]^+$ in the negative mode. Data mass spectrometry (MS/MS) experiments were controlled by the software Masslynx V4.1. The experiment was repeated three times with similar results.

Supplementary Data

The following materials are available in the online version (e-Xtras) of this article.

Fig. S1. Cacao plant infection with spores from *M. perniciosa* under controlled greenhouse conditions.

Fig. S2. Average root lengths of 7-day-old Arabidopsis seedlings subjected to *M. perniciosa* and control treatments. Fisher least significant difference (LSD) tests were used to compare the treatments and 95% confidence intervals are shown.

Fig. S3. LC-MS/MS analysis of IAA and IAN derived from supernatant extracts of *M. perniciosa* cultured in IAN-supplemented liquid 15-days after inoculation. Purple line: chromatogram of the IAN standard with a retention time of 2.75 min. Green line: chromatogram of the supernatant extract of necrotrophic fungus (sample 13A) in IAN-supplemented culture. The peak at 2.15 min has the same retention time as the IAA standard (in line red) and the mass spectrum was similar to that of indole-3-acetic acid.

Fig. S5. GC-MS detection of IAA and indole derivatives produced by *M. perniciosus* in supplemented liquid cultures. Supernatant cultures from necrotrophic cultures supplemented with 3 mM IAN (sample 13A, in red) or 0.8% of L-Trp (sample 15A, in brown) were extracted, derivatized, and analyzed by GC-MS. The green and red chromatograms are the peaks identified based on the daughter ions at $[M/Z]^+ 130$ for the indole ion mass in 15A and 13A samples, respectively. IAA (purple) and IAN (green) standards were included.

27

seedling and used as an internal control. All procedures were carried out using the same relative proportions.

Fig. S7. Production of indole-3-acetic acid (IAA) and accumulation of indole-3-carboxylic acid and other derivatives in *M. pernicioso* cultures. GC-MS chromatograms obtained from the extracts of IAN-supplemented liquid cultures 3, 7, 14, and 30 days after seeding. IAN (11.36 min) was rapidly converted into IAA (11.43 min) and indole 3-carboxylic acid (11.70 min) accumulated for up to 30 days after inoculation.

Supplementary Table S1. Nitrilase gene families in *M. pernicioso* and *M. roreri*. The identities were determined by Blastp and Gene Ontology analyses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Jorge Mondego at the Instituto Agronômico de Campinas (IAC) for critical reading of the manuscript, Dr. Ana Carolina M. Zeri of the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio) for conducting the nuclear magnetic resonance analysis, Igor Oliveira Silva for technical assistance with the LC-MS/MS analysis, Dr. Rita Souza at Laboratório de Espectrometria de Massas (IQ, UNICAMP) for technical assistance with the GC-MS, and Leandro Costa Nascimento for assistance with bioinformatics. This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2009/50119-9 and 2009/52808-6).

LITERATURE CITED

Alvarez J, De Moraes M, Garcia O, Pereira G, Mondego J (2012) The Roles of Auxin during Plant Microbe Interactions. *In* A Keller H, MD Fallon, eds, Auxins: Structure, Biosynthesis and Functions. Nova Science Publishers Inc, New York, pp 31–51

Argout X, Salse J, Aury J, Guiltinan MJ, Droc G, Gouzy J, Allegre M, Chaparro C, Legavre T, Maximova SN, et al (2011) The genome of Theobroma cacao. *Nature genetics* **43**: 101–8

Arteca RN, Arteca JM (2008) Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in Arabidopsis thaliana plants. *Journal of experimental botany* **59**: 3019–26

Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57**: 289–300

Böttcher C, Westphal L, Schmotz C, Prade E, Scheel D, Glawischnig E (2009) The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of Arabidopsis thaliana. *The Plant cell* **21**: 1830–1845

Brown HM, Purves WK (1980) Indoleacetaldehyde Reductase of Cucumis sativus L: KINETIC PROPERTIES AND ROLE IN AUXIN BIOSYNTHESIS. *Plant physiology* **65**: 107–113

Casimiro I, Marchant a, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, et al (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant cell* **13**: 843–52

Chaves FC, Gianfagna TJ (2006) Necrotrophic phase of Moniliophthora perniciosa causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **69**: 104–108

Chen H, Fink G (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & development* **20**: 1150–1161

Domingo C, Andrés F (2009) Constitutive expression of OsGH3. 1 reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 201–210

- 700 **Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J,**
 701 **Shishkova S, Celenza J, Benková E** (2008) Auxin acts as a local
 702 morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *PNAS* **105**: 8790–
 703 8794
- 704 **Felten J, Ditengou FA** (2010) Lateral root stimulation in the early interaction
 705 between. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 864–867
- 706 **Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA,**
 707 **Legue V** (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral
 708 root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling.
 709 *Plant Physiology* **151**: 1991–2005
- 710 **Frias G, Purdy L, Schmidt R** (1991) Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on
 711 vegetative flushes of cacao. *Plant disease* **75**: 552–556
- 712 **Fu J, Liu H, Li Y, Yu H, Li X, Xiao J, Wang S** (2011) Manipulating broad-
 713 spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin
 714 accumulation in rice. *Plant physiology* **155**: 589–602
- 715 **Glawischnig E** (2007) Camalexin. *Phytochemistry* **68**: 401–406
- 716 **Hogan D a** (2006) Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Current biology*
 717 **16**: R457–8
- 718 **De Hoon MJL, Imoto S, Nolan J, Miyano S** (2004) Open source clustering
 719 software. *Bioinformatics (Oxford, England)* **20**: 1453–1454
- 720 **Jameson PPE** (2000) Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An
 721 overview. *Plant Growth Regulation* **32**: 369–380
- 722 **Kazan K, Manners JM** (2009) Linking development to defense: auxin in plant-
 723 pathogen interactions. *Trends in plant science* **14**: 373–382
- 724 **Kilaru A, Bailey BA, Hasenstein KH** (2007) *Moniliophthora perniciosa* produces
 725 hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa
 726 leaves. *FEMS Microbiology Letters* **274**: 238–244
- 727 **Kobayashi M, Suzuki T, Fujita T, Masuda M, Shimizu S** (1995) Occurrence of
 728 enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-
 729 acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *PNAS*
 730 **92**: 714–8
- 731 **Laskowski M, Grieneisen V a, Hofhuis H, Hove C a Ten, Hogeweg P, Marée**
 732 **AFM, Scheres B** (2008) Root system architecture from coupling cell shape to
 733 auxin transport. *PLoS biology* **6**: e307

1
2
3 734 **López MA, Bannenberg G, Castresana C** (2008) Controlling hormone signaling is
4 735 a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Current opinion in*
5 736 *chemical biology* **11**: 420–427
6
7
8 737 **Maere S, Heymans K, Kuiper M** (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess
9 738 overrepresentation of gene ontology categories in biological networks.
10 739 *Bioinformatics* (Oxford, England) **21**: 3448–3449
11
12 740 **Manulis S, Haviv-Chesner A, Brandl MT, Lindow SE, Barash I** (1998)
13 741 Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in
14 742 pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*.
15 743 *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 634–642
16
17
18 744 **Marelli J-P, Maximova SN, Gramacho KP, Kang S, Gultinan MJ** (2009)
19 745 Infection Biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and
20 746 Alternate Solanaceous Hosts. *Tropical Plant Biology* **2**: 149–160
21
22
23 747 **McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK** (2012) Differential expression analysis of
24 748 multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic*
25 749 *acids research* **40**: 4288–4297
26
27
28 750 **Meinhardt LW, Bellato Cde M, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo JC, Pereira**
29 751 **GA** (2006) In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis*
30 752 *perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*.
31 753 *Current Microbiology* **52**: 191–196
32
33
34 754 **Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, Aime MC, Griffith GW, Zhang D,**
35 755 **PEREIRA GAG** (2008) *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches'
36 756 broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular plant*
37 757 *pathology* **9**: 577–588
38
39
40 758 **Mondego JM, Carazzolle MF, Costa GG, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones**
41 759 **J, Cotomacci C, Carraro DM, Cunha AF, Carrer H, et al** (2008) A genome
42 760 survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom
43 761 Disease of cacao. *BMC Genomics* **9**: 548
44
45
46 762 **Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B** (2008) Mapping and
47 763 quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* **5**: 621–
48 764 628
49
50
51 765 **Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio
52 766 Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497
53
54 767 **Nidiry ESJ, Babu CSB** (2005) Antifungal activity of tuberose absolute and some of
55 768 its constituents. *Phytotherapy research* □: PTR **19**: 447–449
56
57
58
59
60

- 769 **Normanly J** (2010) Approaching cellular and molecular resolution of auxin
770 biosynthesis and metabolism. Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**:
771 a001594
- 772 **Oono Y, Ooura C, Rahman A, Aspuria ET, Hayashi K, Tanaka A, Uchimiya H**
773 (2003) p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in Arabidopsis
774 root. Plant Physiol **133**: 1135–1147
- 775 **Park J-YJ-E, Kim Y-S, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim S-Y, Kim J, Lee Y-H,**
776 **Park C-M** (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation
777 with stress adaptation response in Arabidopsis. The Journal of biological
778 chemistry **282**: 10036–10046
- 779 **Penman D, Britton G, Hardwick K, Collin HA, Isaac S** (2000) Chitin as a
780 measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom
781 disease of *Theobroma cacao*. Mycological Research **104**: 671–675
- 782 **Pereira J, Almeida L De, Santos S** (1996) Witches' broom disease of cocoa in
783 Bahia: Attempts at eradication and containment. Crop Protection **11**: 743–752
- 784 **Purdy LH, Schmidt R a** (1996) STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM:
785 biology, epidemiology, and management. Annual review of phytopathology **34**:
786 573–594
- 787 **Reineke G, Heinze B, Schirawski J, Buettner H, Kahmann R, Basse CW** (2008)
788 Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and
789 its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour
790 formation. Molecular plant pathology **9**: 339–355
- 791 **Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK** (2010) edgeR: a Bioconductor package
792 for differential expression analysis of digital gene expression data.
793 Bioinformatics (Oxford, England) **26**: 139–140
- 794 **Rogers EE, Glazebrook J, Ausubel FM** (1996) Mode of action of the Arabidopsis
795 thaliana phytoalexin camalexin and its role in Arabidopsis-pathogen
796 interactions. Molecular plant-microbe interactions **9**: 748–57
- 797 **Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P,**
798 **Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, et al** (1999) An auxin-dependent distal
799 organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. Cell **99**: 463–472
- 800 **Saldanha AJ** (2004) Java Treeview--extensible visualization of microarray data.
801 Bioinformatics (Oxford, England) **20**: 3246–8
- 802 **Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella a W V, Schiavinato MA,**
803 **Cascardo JCM, Pereira GAG** (2005) Biochemical changes during the

- 804 development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil
805 caused by *Crinipellis pernicios*. *Journal of Experimental Botany* **56**: 865–877
- 806 **De Smet I, Vanneste S, Inzé D, Beeckman T** (2006) Lateral root initiation or the
807 birth of a new meristem. *Plant molecular biology* **60**: 871–887
- 808 **Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T** (2011) Cytoscape 2.8:
809 new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*
810 (Oxford, England) **27**: 431–432
- 811 **Spaepen S, Vanderleyden J** (2010) Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold*
812 *Spring Harbor perspectives in biology* 1–13
- 813 **Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R** (2007) Indole-3-acetic acid in microbial
814 and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews* **31**: 425–448
- 815 **Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiriyaki I, Maldonado MT, Maldonado MC,**
816 **Suza W** (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that
817 conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant cell* **17**: 616–627
- 818 **Stefanato FL, Abou-Mansour E, Buchala A, Kretschmer M, Mosbach A, Hahn**
819 **M, Bochet CG, Métraux J-P, Schoonbeek H** (2009) The ABC transporter
820 BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on
821 *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* □: for cell and molecular biology **58**:
822 499–510
- 823 **Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie D-Y, Dolezal K,**
824 **Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM** (2008) TAA1-Mediated Auxin
825 Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development. *Cell*
826 **133**: 177–191
- 827 **Tanaka E, Koga H, Mori MM** (2011) Auxin Production by the Rice Blast Fungus
828 and its Localization in Host Tissue. *Journal of Phytopathology* **159**: 522–530
- 829 **Tanaka E, Tanaka C, Ishihara A, Kuwahara Y, Tsuda M** (2003) Indole-3-acetic
830 acid biosynthesis in *Aciculosporium take*, a causal agent of witches' broom of
831 bamboo. *Journal of General Plant Pathology* **69**: 1–6
- 832 **Teixeira PJPL, Costa GGL, Fiorin GL, Pereira GAG, Costa Mondego JM** (2013)
833 Novel receptor-like kinases in cacao contain PR-1 extracellular domains.
834 *Molecular Plant Pathology* n/a–n/a
- 835 **Tsavkelova E a., Klimova SY, Cherdyntseva T a., Netrusov a. I** (2006) Microbial
836 producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied*
837 *Biochemistry and Microbiology* **42**: 117–126

- 838 **Tsavkelova E, Oeser B, Oren-Young L, Israeli MM, Sasson Y, Tudzynski B,**
839 **Sharon A** (2011) Identification and functional characterization of indole-3-
840 acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species.
841 *Fungal genetics and biology* **49**: 48–57
- 842 **Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle T** (1997) Aux/IAA proteins repress
843 expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic
844 auxin response elements. *The Plant Cell Online* **9**: 1963
- 845 **Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X** (2007) Salicylic acid inhibits
846 pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway.
847 *Current Biology* **17**: 1784–1790
- 848 **Wang M-Y, Liu X-T, Chen Y, Xu X-J, Yu B, Zhang S-Q, Li Q, He Z-H** (2012)
849 *Arabidopsis* acetyl-amido synthetase GH3.5 involvement in camalexin
850 biosynthesis through conjugation of indole-3-carboxylic acid and cysteine and
851 upregulation of camalexin biosynthesis genes. *Journal of integrative plant*
852 *biology* **54**: 471–485
- 853 **Woltering EJ, Balk P a, Nijenhuis-Devries M a, Faivre M, Ruys G, Somhorst D,**
854 **Philosoph-Hadas S, Friedman H** (2005) An auxin-responsive 1-
855 aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is responsible for differential
856 ethylene production in gravistimulated *Antirrhinum majus* L. flower stems.
857 *Planta* **220**: 403–13
- 858 **Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals*
859 *of Botany* **95**: 707–735
- 860 **Yamada T, Palm CJ, Brooks B, Kosuge T** (1985) Nucleotide sequences of the
861 *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with
862 *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. *PNAS* **82**: 6522–6526
- 863 **Yue Q, Miller CJ, White JF, Richardson MD** (2000) Isolation and characterization
864 of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *Journal of agricultural and food*
865 *chemistry* **48**: 4687 – 4692

1
2
3
4
5 867
6
7 868
8
9 869
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Table 1. Genes related to auxin response differentially expressed in meristems of cacao plants during early infection with *M. perniciosa*.

GENE	Putative function	Log fold-change ^a	FDR <0.05	P-Value
GH3				
CGD0026825	GH3.1 GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	2,034	0,000	7,1E-06
CGD0009775	GH3.1 GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	1,799	0,003	6,2E-05
CGD0003037	GH3.1 GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	1,707	0,002	4,8E-05
CGD0026788	GH3.1 GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	1,252	0,049	2,1E-03
CGD0026828	GH3.1 GH3.17; indole-3-acetic acid amido synthetase	1,341	0,037	1,5E-03
CGD0000544	GH3.4 GH3.4; indole-3-acetic acid amido synthetase	-1,310	0,039	1,6E-03
Dormancy				
CGD0025560	DYL1 dormancy/auxin associated protein-related	1,265	0,041	1,7E-03
CGD0022536	Dormancy/auxin associated protein-related	1,268	0,053	2,4E-03
CGD0026185	Dormancy/auxin associated protein-related	1,775	0,011	3,3E-04
SAUR				
CGD0004301	Indole-3-acetic acid-induced protein ARG7	1,522	0,014	4,3E-04

CGD0016638	Auxin-induced protein 10A5	1,233	0,034	1,3E-03
CGD0003025	Indole-3-acetic acid-induced protein ARG2	1,787	0,023	8,0E-04
CGD0020104	Indole-3-acetic acid-induced protein ARG2	1,654	0,030	1,1E-03
PILS				
CGD0000019	Auxin efflux carrier family protein	2,660	0,000	6,7E-10
AUX/IAA				
CGD0003885	IAA3 SHY2 (SHORT HYPOCOTYL 2)	-1,192	0,094	0,005

^a Data were based on RNA sequencing analyses using the edgeR package from Bioconductor.

Table 2. LC-MS/MS quantification of IAA and precursors of necrotrophic supplemented liquid cultures of *M. Perniciosa*.

Time (days)	Trp (4 mM) ^a		IAN (3 mM)	
	Trp (mean ± SD) μM ^b	IAA (mean ± SD) μM ^c	IAN (mean ± SD) μM	IAA (mean ± SD) μM
3	688.8 ± 74.0	99.0 ± 23.1	403.1 ± 39.8	3015.8 ± 111.2
7	92.1 ± 1.6	168.2 ± 76.2	3.3 ± 0.2	231.3 ± 46.9
14	71.8 ± 11.2	486.0 ± 86.6	1.3 ± 0.1	0.4 ± 0.0
30	9.1 ± 1.1	3.7 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0

^a Liquid cultures supplemented with either 4 mM Trp or 3 mM Indole-3-acetonitrile (IAM).

^b Amounts (μM) were calculated by comparing data with the integrated area curve of known IAA, IAN, and Trp concentrations.

^c Values are means of two replicates ± standard deviation (SD).

879 **Table 3.** Putative enzymes involved in IAA biosynthesis pathways in *M. pernicioso*.

Number	MP Gene	Gene Symbol	Enzyme name	EC number	% Blastp Identity ^a	Organism - Reference	Kegg Code
1	MP02299 MP05600	bnat	Indoleamine 2,3- dioxygenase	1.13.11.52	62	<i>Coprinopsis cinerea</i> gb EAU88739.2	K00463
1	MP05180	trpC	Indole-3-glycerol phosphate synthase	4.1.1.48	68	<i>Coprinopsis scobicola</i> gb CAC41002.1	K13501
2	MP08247 MP05598	kat1	Aromatic amino acid (trp) transferase	2.6.1.27	38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp P38840.3	K14265
3	MP01945	ipdC	Indole-3-pyruvate decarboxylase	4.1.1.43	70	<i>Punctularia strigosozonata</i> . EIN12769.1	K04103
4	MP11796	iad2	Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase	1.2.1.3	62	<i>Ustilago maydis</i> FB1 gi 1658175	K14085
5	MP09667 MP15654	myr	Myrosinase	3.2.1.147	45	<i>Verticillium dahlia</i> gi 346972977	K01237
7	?	nth	Nitrile hydratase	4.2.1.84	-	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	K01721
8	MP12757	gmdA	Amidase	3.5.1.4	54	<i>Laccaria bicolor</i> gb EDR04307.1	K01426
9	MP12307	trp1	bifunctional Trp synthase	4.2.1.20	81	<i>Laccaria bicolor</i> XP_001874776.1	K01694

880 ^a Identity was assumed blasting (>40%) known protein sequences from IAA producer microorganism against *M. pernicioso*
881 gene models.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

882 **Table S1.**

(6) Nitrilase	MP code	Locus	Size (bp)	MR code	Locus	Size (bp)
nit1	MP00491	sctg_0002_0001	951	MR00552	sctg_0002_0009	951
nit4	MP00452	sctg_0002_0001	1077	MR00505	sctg_0002_0009	1046
nit3	MP04511	sctg_0047_0001	993	MR06250	sctg_0057_0001	937
nit5	MP04368	sctg_0045_0001	993	MR06259	Sctg_0057_0003	930
nit2	MP04374	sctg_0045_0001	993	No HIT	No HIT	cc825

883

884

FIGUERE LEGENDS

Fig. 1. Altered root development and inhibition of polar auxin transport in *Arabidopsis* by indole-3-acetonitrile (IAN)-supplemented *M. perniciosus* supernatant culture. Top, 9-day-old roots of wild-type *Arabidopsis thaliana*. Bottom, histochemical root localization of GUS activity in 7-day-old transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing DR5::GUS. *Arabidopsis* was grown in vitamin-free MS media supplemented with 1% EtOH as a control, 1% (v/v) of a medium extracted without fungal inoculation as a mock, 20 μ M of indole-3-acetic acid (IAA), 20 μ M of p-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB), and 1% (v/v) of supernatant extract of necrotrophic culture induced with 3 mM IAN.

Fig. 2. Nuclear magnetic resonance (NMR) detection of IAA produced by *M. perniciosus* in IAN-supplemented liquid cultures. Supernatant from necrotrophic culture supplemented with 3 mM of IAN 15 days after inoculation (sample 13B, in red) was extracted and its spectrum compared with that of the mock (sample 10B, in blue) and the IAA standard from the Chenomx library (in purple).

Fig. 3. Trp-dependent IAA biosynthetic pathways of *M. perniciosus*. The proposed scheme for L-Trp catabolism is based on a time-course of intermediates detected by GC-MS and the evidence for some of the enzymes was obtained from the literature (Spaepen et al., 2007; Spaepen and Vanderleyden, 2010). Circles with numbers indicate the enzymes referred to in Table 3. Three IAA biosynthetic

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

pathways are proposed to exist in *M. pernicios*: IAN (indole-3-acetonitrile, in yellow), IAM (indole-3-aetamide, in orange), and IPA (indole-3-pyruvic acid, in blue). Enzymes from indole alkaloid pathways are in brown. TRP, L-Trp; lpyA, indole-3-pyruvic acid; IND, indole; IAA, indole-3-acetic acid; IAM, indole-3-aetamide; IAN, indole-3-acetonitrile; ICA, indole-3-carboxylic acid; IAAlD, indole-3-acetaldehyde; and IALD, indole-3-aldehyde.

Fig. 4. Transcriptional profile of putative IAA biosynthesis enzymes throughout the lifecycle of *M. pernicios* based on RNA-seq data. Fold-change was calculated by comparing the RPKMs (reads per kilo base per million) of each gene against each control condition. The arrays were clustered using CLUSTER 3 software. Basidio, basidiome; Germina, germinating spores; Bio7, mycelial biotrophic stage at 7 days after inoculation; Bio14, mycelial biotrophic stage at 14 days after inoculation; Nec7, mycelial necrotrophic stage at 7 days after inoculation; Nec14, mycelial necrotrophic stage at 14 days after inoculation; and Bio-Nec, biotrophic to necrotrophic stage transition. Colors indicate enzymes belonging to IAA pathways. Numbers after gene names refer to the annotations in Table 3.

926 **FIGURES**

927

For Peer Review

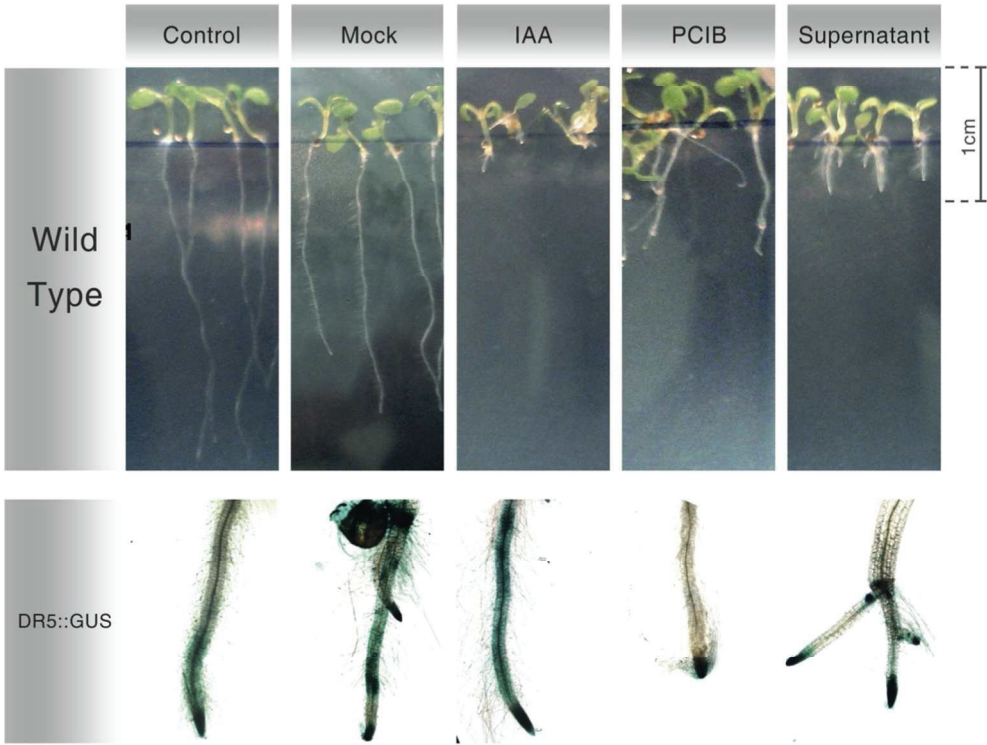


Figure 1. Altered root development and inhibition of polar auxin transport in Arabidopsis by indole-3-acetonitrile (IAN)-supplemented *M. perniciosus* supernatant culture. Top, 9-day-old roots of wild-type *Arabidopsis thaliana*. Bottom, histochemical root localization of GUS activity in 7-day-old transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing DR5::GUS. *Arabidopsis* was grown in vitamin-free MS media supplemented with 1% EtOH as a control, 1% (v/v) of a medium extracted without fungal inoculation as a mock, 20 μ M of indole-3-acetic acid (IAA), 20 μ M of p-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB), and 1% (v/v) of supernatant extract of necrotrophic culture induced with 3 mM IAN.

225x171mm (150 x 150 DPI)

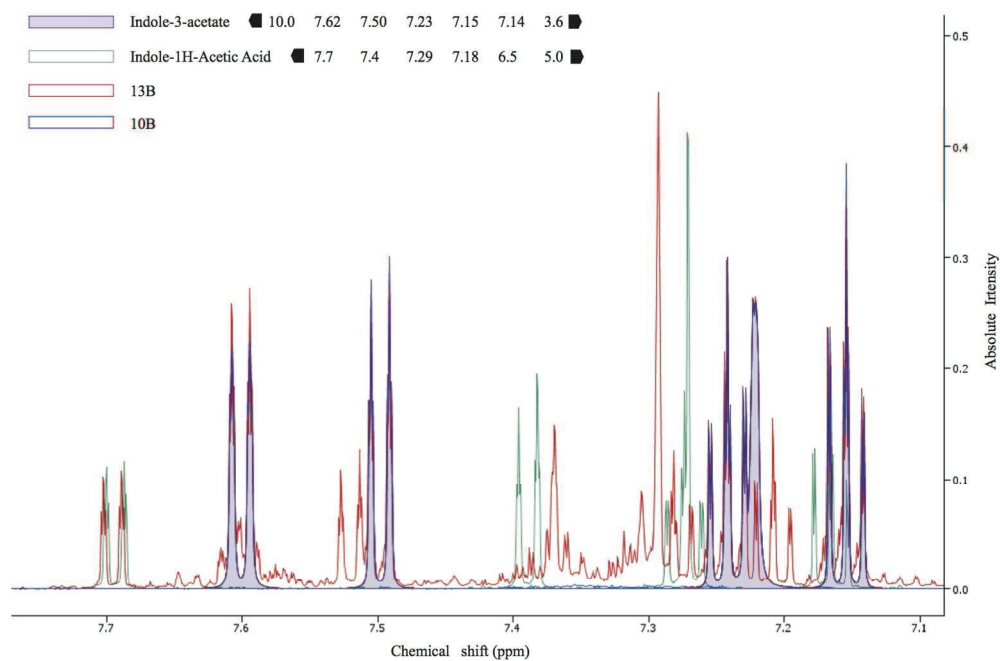


Figure 2. Nuclear magnetic resonance (NMR) detection of IAA produced by *M. perniciosus* in IAN-supplemented liquid cultures. Supernatant from necrotrophic culture supplemented with 3 mM of IAN 15 days after inoculation (sample 13B, in red) was extracted and its spectrum compared with that of the mock (sample 10B, in blue) and the IAA standard from the Chenomx library (in purple).

276x182mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

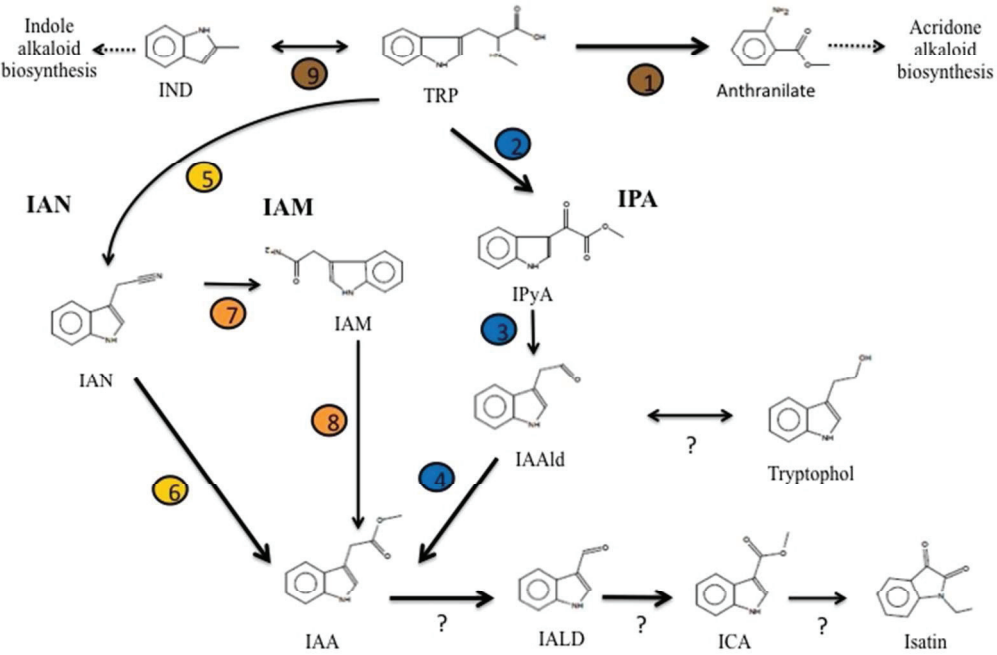


Figure 3. Trp-dependent IAA biosynthetic pathways of *M. perniciosus*. The proposed scheme for L-Trp catabolism is based on a time-course of intermediates detected by GC-MS and the evidence for some of the enzymes was obtained from the literature (Spaepen et al., 2007; Spaepen and Vanderleyden, 2010). Circles with numbers indicate the enzymes referred to in Table 3. Three IAA biosynthetic pathways are proposed to exist in *M. perniciosus*: IAN (indole-3-acetonitrile, in yellow), IAM (indole-3-aetamide, in orange), and IPA (indole-3-pyruvic acid, in blue). Enzymes from indole alkaloid pathways are in brown. TRP, L-Trp; IPyA, indole-3-pyruvic acid; IND, indole; IAA, indole-3-acetic acid; IAM, indole-3-aetamide; IAN, indole-3-acetonitrile; ICA, indole-3-carboxylic acid; IAAld, indole-3-acetaldehyde; and IALD, indole-3-aldehyde.

254x190mm (72 x 72 DPI)

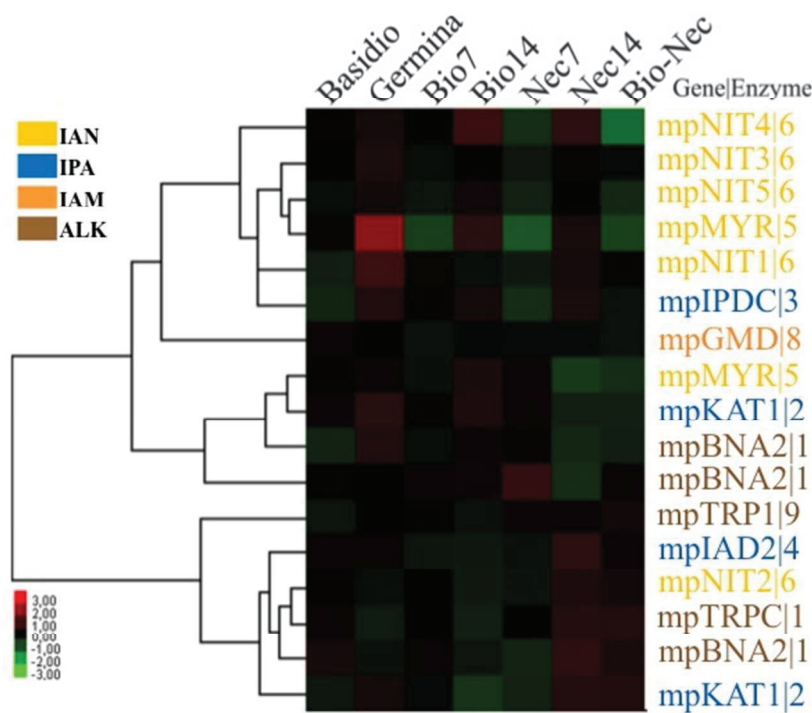


Figure 4. Transcriptional profile of putative IAA biosynthesis enzymes throughout the lifecycle of *M. perniciosus* based on RNA-seq data. Fold-change was calculated by comparing the RPKMs (reads per kilo base per million) of each gene against each control condition. The arrays were clustered using CLUSTER 3 software. Basidio, basidiome; Germina, germinating spores; Bio7, mycelial biotrophic stage at 7 days after inoculation; Bio14, mycelial biotrophic stage at 14 days after inoculation; Nec7, mycelial necrotrophic stage at 7 days after inoculation; Nec14, mycelial necrotrophic stage at 14 days after inoculation; and Bio-Nec, biotrophic to necrotrophic stage transition. Colors indicate enzymes belonging to IAA pathways. Numbers after gene names refer to the annotations in Table 3.

254x190mm (72 x 72 DPI)

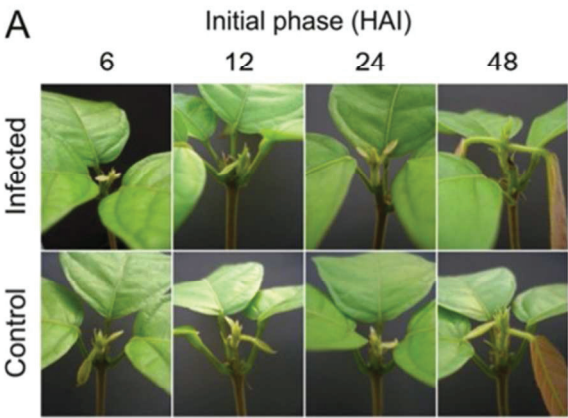


Figure S1. Cacao plant infection with spores from *M. perniciosa* under controlled greenhouse conditions.
254x190mm (72 x 72 DPI)

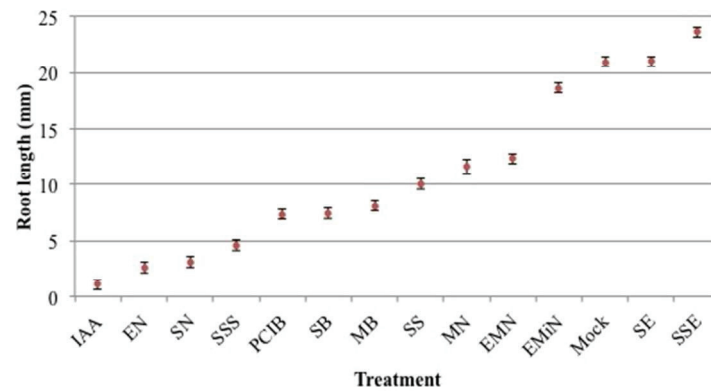


Figure S2. Average root lengths of 7-day-old *Arabidopsis* seedlings subjected to *M. perniciosus* and control treatments. Fisher least significant difference (LSD) tests were used to compare the treatments and 95% confidence intervals are shown.
254x190mm (72 x 72 DPI)

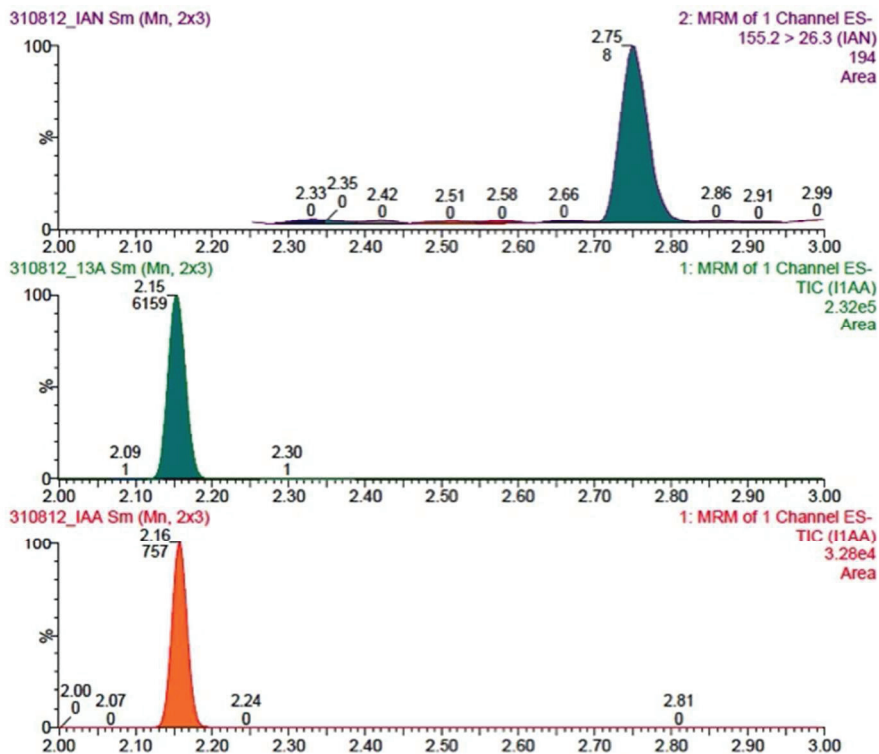


Figure S3. LC-MS/MS analysis of IAA and IAN derived from supernatant extracts of *M. perniciosus* cultured in IAN-supplemented liquid 15-days after inoculation. Purple line: chromatogram of the IAN standard with a retention time of 2.75 min. Green line: chromatogram of the supernatant extract of necrotrophic fungus (sample 13A) in IAN-supplemented culture. The peak at 2.15 min has the same retention time as the IAA standard (in line red) and the mass spectrum was similar to that of indole-3-acetic acid.

254x190mm (72 x 72 DPI)

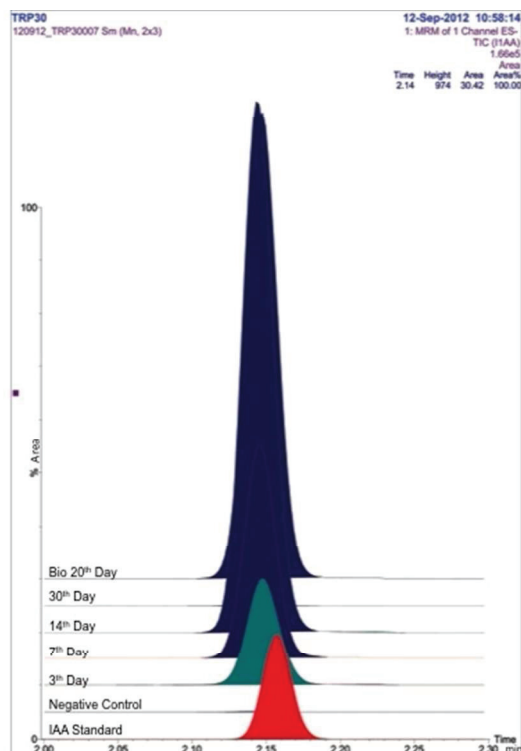


Figure S4. LC-MS/MS detection and quantification of IAA produced by *M. perniciosus* in L-Trp-supplemented liquid cultures. Supernatant cultures from necrotrophic cultures supplemented with 0.8% of L-Trp were extracted and subjected to a time-course analysis. Three pieces (5-mm diameter) of necrotrophic mycelia were collected at 3, 7, 14, and 30 days after inoculation. To quantify IAA production, an IAA standard of known concentration was included (in red). All procedures were carried out using the same proportions in dilutions and injections.

254x190mm (72 x 72 DPI)

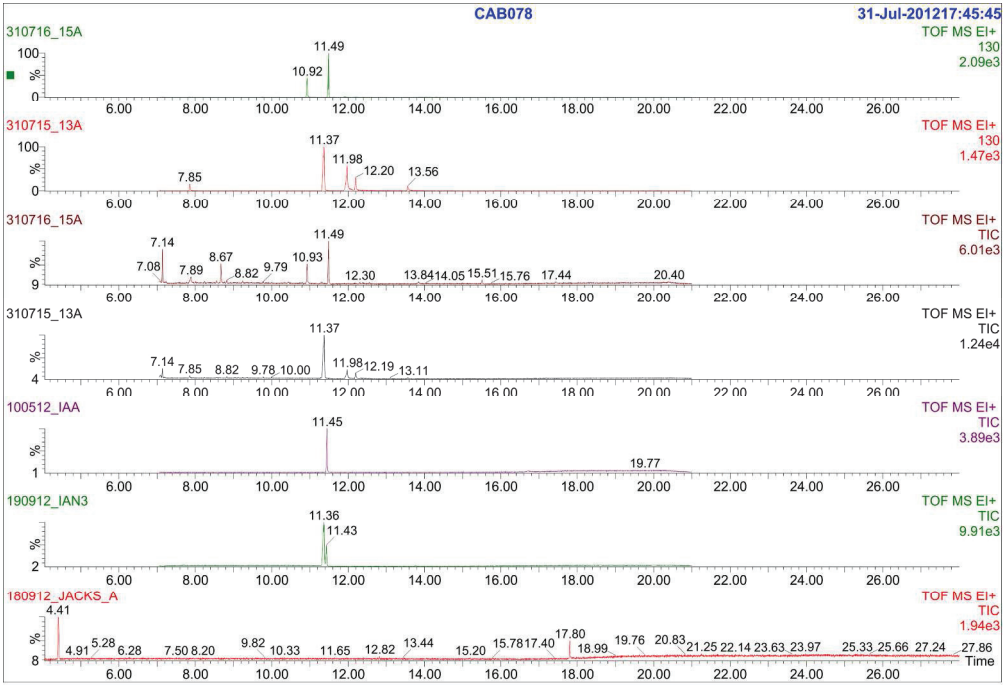


Figure S5. GC-MS detection of IAA and indole derivatives produced by *M. perniciosus* in supplemented liquid cultures. Supernatant cultures from necrotrophic cultures supplemented with 3 mM IAN (sample 13A, in red) or 0.8% of L-Trp (sample 15A, in brown) were extracted, derivatized, and analyzed by GC-MS. The green and red chromatograms are the peaks identified based on the daughter ions at $[M/Z]+130$ for the indole ion mass in 15A and 13A samples, respectively. IAA (purple) and IAN (green) standards were included.

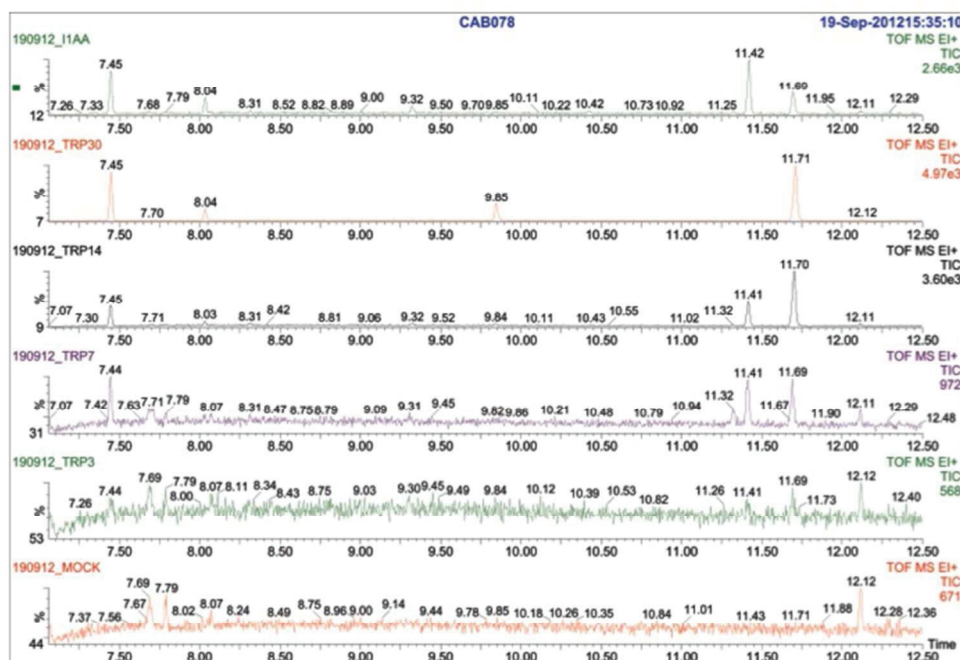


Figure S6. GC-MS detection and quantification of IAA and indole derivatives produced by *M. perniciosus* in Trp-supplemented liquid cultures. Supernatants of necrotrophic cultures supplemented with 0.8% L-Trp were extracted, derivatized, and analyzed by GC-MS/MS. Mock was a medium supplemented with Trp, but not inoculated with fungus. A time-course was collected at 3, 7, 14, and 30 days after seeding with three pieces of necrotrophic mycelium each. An IAA standard was added to medium supplemented with fungus and then extracted 30 days after seeding and used as an internal control. All procedures were carried out using the same relative proportions.

254x190mm (72 x 72 DPI)

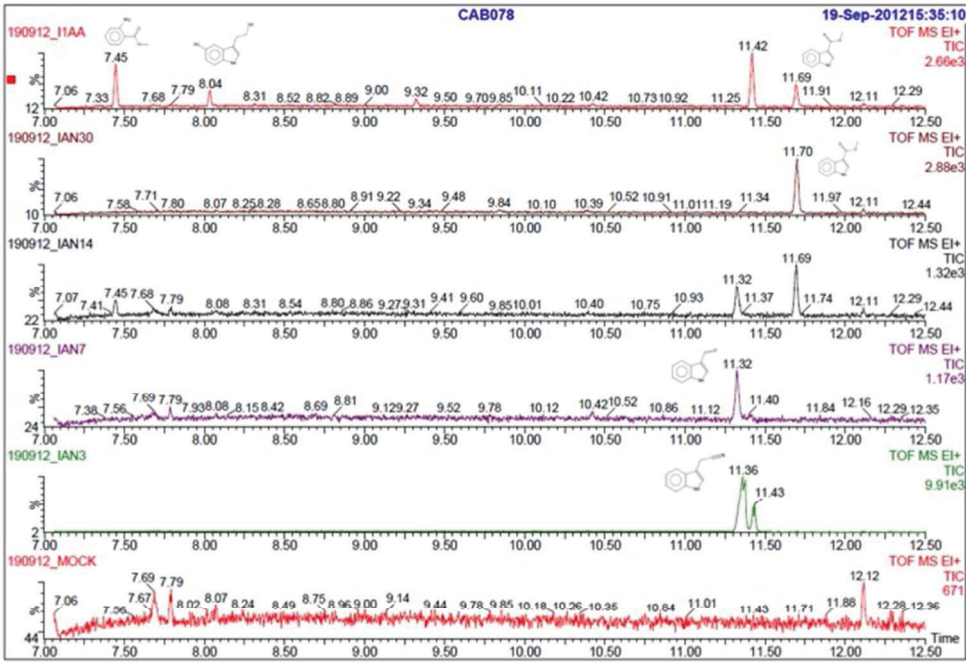


Figure S7. Production of indole-3-acetic acid (IAA) and accumulation of indole-3-carboxylic acid and other derivatives in *M. perniciosus* cultures. GC-MS chromatograms obtained from the extracts of IAN-supplemented liquid cultures 3, 7, 14, and 30 days after seeding. IAN (11.36 min) was rapidly converted into IAA (11.43 min) and indole 3-carboxylic acid (11.70 min) accumulated for up to 30 days after inoculation.

254x190mm (72 x 72 DPI)

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada **“Efeito do desequilíbrio hormonal na supressão das respostas de defesa do cacaueiro durante as etapas iniciais da infecção pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*”**:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

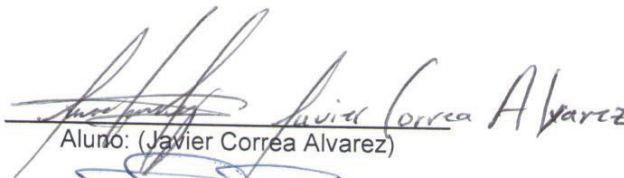
(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2011/03, Instituição:

IB/UNICAMP _____

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

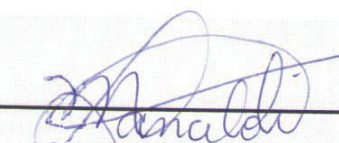

Aluno: (Javier Correa Alvarez)


Orientador: (Gonçalo Amarante Guimarães Pereira)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura