

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

**TESE**

ANÁLISE DO PROCESSO DA PENETRAÇÃO À COLONIZAÇÃO DE *Fusarium decemcellulare* EM  
GUARANAZEIRO E OBTENÇÃO DE MUTANTES PARA GENES RELACIONADOS À  
PATOGENICIDADE POR MEIO DE CRISPR/Cas9

**JOELMA DOS SANTOS FERNANDES**

Manaus – AM

2019

**JOELMA DOS SANTOS FERNANDES**

ANÁLISE DO PROCESSO DA PENETRAÇÃO À COLONIZAÇÃO DE *Fusarium decemcellulare* EM  
GUARANAZEIRO E OBTENÇÃO DE MUTANTES PARA GENES RELACIONADOS À  
PATOGENICIDADE POR MEIO DE CRISPR/Cas9

**Orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva**

Tese apresentada ao programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Amazonas,  
como requisito para obtenção do título  
de Doutora em Biotecnologia.

**Unidade executora**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

**Fonte financiadora**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F363a Fernandes, Joelma dos Santos  
Análise do processo da penetração à colonização de *Fusarium decemcellulare* em guaranazeiro e obtenção de mutantes para genes relacionados à patogenicidade por meio de CRISPR/Cas9 / Joelma dos Santos Fernandes . 2019  
93 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gilvan Ferreira da Silva  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Transformação genética. 2. Interação patógeno-hospedeiro. 3. Knockout gênico via CRISPR/Cas9. 4. Proteínas fluorescentes . 5. Guaranazeiro. I. Silva, Gilvan Ferreira da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedicatória,*

*A vitória desta conquista dedico, a minha família em especial aos meus pais, Maria de Fatima e João Benedito, ao meu companheiro João Batista, por terem permanecido ao meu lado me incentivando a percorrer este caminho, e ao meu orientador Gilvan Ferreira por toda paciência e incentivo dado ao longo de boa parte da minha vida acadêmica.*

*“Epígrafe”*

*“O homem não teria alcançado o possível, se inúmeras vezes não tivesse tentado atingir o impossível”.*

*(Max Weber)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** primeiramente, pela vida e por ter me abençoado com a obtenção dos resultados deste trabalho “**Fruto da Fé**”, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

A **CAPES** pelo auxílio financeiro.

**Ao Programa de Pós-Graduação** em Biotecnologia - UFAM, pela oportunidade, pela atenção e apoio, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A **Embrapa Amazônia Ocidental** pelo apoio a pesquisa.

Ao meu **orientador Dr. Gilvan Ferreira** por toda a paciência, por todo ensinamento e compreensão. Orientador e profissional difícil de encontrar, pela enorme competência e dedicação a pesquisa. **MUITO OBRIGADA.**

**À minha família:** A minha **Mãe** e ao meu **Pai** pelo apoio, ao meu **companheiro João Batista** por toda a ajuda nos momentos difíceis, ao meu **sobrinho Bruno** e ao meu **irmão Kledison** por toda motivação nessa caminhada.

**Aos técnicos** do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental: **Jeferson Cruz**, pela generosidade, profissionalismo e boa vontade em me auxiliar, em todos os momentos, a **Karina Bichara**, que contribuiu imensamente com meu trabalho, sempre em momentos que mais precisamos de ajuda, muito obrigada.

**Aos amigos** do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado, a ajuda e paciência de todos foi essencial para esse trabalho.

**As amigas Aricléia, Sandra e Cláudia** que estiveram ao meu lado durante toda essa caminhada. A Aricléia amiga tão especial que fez tanto pelo meu trabalho, que posso considerá-la minha co-orientadora diante de tantas contribuições dadas. Muito obrigada!

Agradeço a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. **Serei eternamente grata a todos.**

## RESUMO

Diante da necessidade de entender os mecanismos de interação entre *Fusarium decemcellulare* e o guaranazeiro, bem como analisar genes que possam ter papel importante na patogenicidade e/ou na virulência, este trabalho teve como objetivo analisar o processo de interação patógeno-hospedeiro, por meio: 1- do estabelecimento de condições eficientes para transformação genética de *F. decemcellulare* (*Fdc*) e a obtenção de linhagens transformantes expressando as proteínas GFP (*Green fluorescent protein*) e RFP (*Red fluorescent protein*) para aplicação na análise da penetração e colonização; 2- da identificação da forma de colonização do *Fdc* em guaranazeiro para auxiliar no estabelecimento de métodos de controle da doença; e 3- da obtenção de linhagens de *Fdc* com *knockout* para genes relacionados à produção de auxina pelo patógeno. Nos resultados evidenciamos que, o método de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) não possibilitou a obtenção de transformantes de *Fdc*, enquanto a transformação via polietileno glicol (PEG) apresentou eficiência média de três transformantes por µg de DNA expressando as proteínas fluorescentes GFP ou RFP. Estes transformantes foram então utilizados nos estudos sobre a colonização do patógeno na planta, analisada por meio de microscopia confocal e de varredura. As análises mostraram que o *Fdc* apresenta colonização do tipo sistêmica, tanto em tomateiro quanto em guaranazeiro, sendo isolado a montante e a jusante do ponto de inoculação com 30 a 120 dias em ambas as plantas, porém necessita de ferimentos para ter sucesso no processo de penetração. Apresenta ainda, alta associação aos tricomas intactos e rompidos em guaranazeiro, não sendo observada preferência por invasão, como por exemplo, através de aberturas naturais (estômatos). Neste trabalho, além dos relatos sobre complexo superbrotamento estamos relatando pela primeira vez em guaranazeiro sintomas que se assemelham aos da doença de Dieback causada pelo *F. decemcellulare*. O método de transformação aqui estabelecido também foi útil como primeiro passo para etapa do processo de edição do genoma por meio do sistema CRISPR/Cas9 em *Fdc*, o qual foi avaliado quanto à obtenção de *knockout* único ou triplo. Foram obtidos 23 transformantes, destes nenhum apresentou duplo ou triplo *knockout*, e para deleção de um único gene foram obtidos oito transformantes, sendo três com *knockout* para o gene *aldh* localizado no cromossomo 9, quatro *knockout* para o gene *aldh* no cromossomo 2 e um para o gene *yucca*.

**Palavras chave:** Transformação genética, Interação patógeno-hospedeiro, *knockout* gênico via CRISPR/Cas9, proteínas fluorescentes, guaranazeiro

## ABSTRACT

Given the need to understand the mechanisms of interaction between *Fusarium decemcellulare* and the guarana plant, as well as to analyze genes that may play an important role in pathogenicity and/or virulence, this work aimed to analyze the pathogen-host interaction process through: 1- the establishment of efficient conditions for genetic transformation of *F. decemcellulare* (*Fdc*) and obtaining transformed strains expressing Green Fluorescent Protein (GFP) and Red Fluorescent Protein (RFP) for use in the analysis of penetration and colonization; 2- identification of the form of colonization of *Fdc* in guarana plants to assist in the establishment of disease control methods; and 3- obtaining *Fdc* strains with knockouts for genes related to auxin production by the pathogen. In the results, it was shown that the genetic transformation method mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) did not allow the obtaining of *Fdc* transformants, while transformation via polyethylene glycol (PEG) had an average efficiency of three transformants per  $\mu\text{g}$  of DNA expressing fluorescent proteins GFP or RFP. These transformed strains were then used in studies on pathogen colonization in the plant, analyzed through confocal and scanning microscopy. The analyses showed that *Fdc* presents systemic colonization, both in tomato and guaraná plants, being isolated upstream and downstream of the inoculation point with 30 to 120 days in both plants, but requires injuries to succeed in the penetration process. It also has a high association with intact and ruptured trichomes in guaraná plants, with no preference for invasion through natural openings (such as stomata), for example. In this work, in addition to reports on the oversprouting complex, we are reporting for the first time in guarana plants symptoms that resemble those of the Dieback disease caused by *F. decemcellulare*. The established transformation method was also useful as a first step in the genome editing process using the CRISPR/Cas9 system in *Fdc*, which was evaluated for obtaining single or triple knockouts. 23 transformants were obtained, none of which showed double or triple knockouts, and for deletion of a single gene, eight transformants were obtained, three of which had a knockout for the *aldh* gene located on chromosome 9, four knockouts for the *aldh* gene on chromosome 2, and one for the *yucca* gene.

**Keywords:** Genetic transformation, Pathogen-host interaction, CRISPR / Cas9 gene knockout, Fluorescent Protein, guarana plants.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Figura 1: Imagens dos sintomas complexo superbrotamento.....21

### METODOLOGIA

#### Capítulo I:

Figura 1: Esquema representando os cassetes amplificados dos vetores pSC001 e pSC002 para integração no genoma de *Fusarium decemcellulare*.....36

#### Capítulo III:

Figura 1: Duas prováveis vias de síntese de auxina identificadas no genoma de *Fusarium decemcellulare*.....44

Figura 2: Representação esquemática da montagem do cassete para recombinação homóloga, contendo três sequências utilizadas para ligação no vetor pGEM-T.....44

Figura 3: Visão geral esquemática da estratégia de substituição de genes.....46

Figura 4: Mapa do vetor pFDC-U6-CRISPR/Cas9.....47

### RESULTADO E DISCUSSÃO

#### Capítulo I:

Figura 1: Imagem das colônias das linhagens transformantes e selvagens (controle) de *Fusarium decemcellulare*.....55

Figura 2: Caracterização molecular dos transformantes de *Fusarium decemcellulare* para análise da integração dos genes *gfp*, *rfp* e *hph*.....56

Figura 3: Imagens de micélios e esporos de linhagens transformantes de *Fusarium decemcellulare* expressando proteínas fluorescentes GFP e RFP.....57

Figura 4: Germinação de esporos de linhagem transformante e selvagem visualizadas via microscopia confocal.....58

Figura 5: Sintomas e colonização dos tecidos internos em mudas de tomateiro.....60

Figura 6: Sintomas externos em mudas de tomate.....62

#### Capítulo II:

Figura 1: Microscopia de varredura em folíolos de guaranazeiro.....62

Figura 2: Microscopia de varredura, microscopia de luz e eletrônica confocal em tecidos de guaranazeiro.....64

Figura 3: Sintoma da doença de dieback em mudas de guaranazeiro.....66

Figura 4. *Fusarium decemcellulare* cultivado in vitro e em tecidos sintomáticos de plantas de guaraná.....68

### **Capítulo III:**

Figura 1: Caracterização molecular dos transformantes de *Fusarium decemcellulare* para análise de knockout e confirmação da integração do gene *hph* no genoma, na estratégia para obtenção separadamente de *knockout* gênico.....77

Figura 2: Caracterização molecular dos quatorze transformantes de *Fusarium decemcellulare* para confirmação de *knockout* e integração do gene *hph* no genoma, na estratégia para obtenção de triplo *knockout*.....78

**LISTA DE TABELAS****METODOLOGIA****Capítulo I:**

Tabela 1: Sintomas internos e externos analisados em tecidos de tomateiro causados por *F. decemcellulare*, durante 30 dias.....69

**Capítulo III:**

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos e crRNAs.....48

**RESULTADO E DISCUSSÃO****Capítulo III:**

Tabela 1: Transformantes obtidos via estratégia de obtenção de *knockout* separadamente (separ.) e simultaneamente (simult.), com *knockout* único, duplo ou triplo nos genes alvo.....79

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL .....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1	O Guaranazeiro: .....	16
2.1.1	Origem e Classificação .....	16
2.1.2	Descrição Morfo-fisiologica .....	16
2.1.3	Importância Socioeconômica do Guaraná.....	17
2.2	Doenças da cultura do Guaranazeiro: .....	18
2.2.1	Complexo Superbrotamento .....	19
2.2.2	Dieback .....	21
2.3	<i>Fusarium decemcellulare</i> Brick .....	22
2.3.1	Classificação e Morfofisiologia .....	22
2.3.2	Etiologia e Plantas hospedeiras do <i>F. decemcellulare</i> .....	23
2.4	Interação Patógeno-Hospedeiro: Germinação, Penetração e Colonização .....	24
2.4.1	Proteínas fluorescentes aplicadas a estudos de colonização de plantas por fungos .....	27
2.5	Silenciamento Gênico Auxiliado pelo Sistema de Edição de Genoma CRISPR/Cas9.....	28
3.	OBJETIVO GERAL .....	32
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
4.	METODOLOGIA .....	33
4.1	Capítulo I: Transformação genética de <i>F. decemcellulare</i> com proteínas fluorescentes GFP e DsRed... 33	
4.1.1	Microrganismos e Condições de Cultivo .....	33
4.1.2	Vetores utilizados na transformação genética de <i>Fusarium decemcellulare</i> .....	33
4.1.3	Obtenção de Protoplastos.....	34
4.1.4	Transformação genética de <i>Fusarium decemcellulare</i> via ATMT.....	34
4.1.6	Caracterização dos Transformantes de <i>Fusarium decemcellulare</i> .....	36
4.1.6.1	Isolamento de DNA e análise dos transformantes por PCR.....	36
4.1.6.2	Teste de estabilidade mitótica .....	37
4.1.6.3	Deteção da proteína repórter GFP e RFP por microscopia de fluorescência.....	37
4.1.6.4	Análise do crescimento vegetativo e germinação de esporos .....	37
4.2	Capítulo II: Análise do processo de germinação á infecção de <i>Fusarium decemcellulare</i> em guaranazeiro causando sintomas de Dieback e Superbrotamento. ....	39
4.2.1	Material vegetal e preparo do isolado de <i>Fusarium decemcellulare</i> .....	39
4.2.2	Análise da germinação, penetração e colonização de <i>F. decemcellulare</i> por microscopia eletrônica ...	40
4.2.3	Análise da distribuição sistêmica de <i>F. decemcellulare</i> em mudas de guaranazeiro .....	40
4.2.4	Análise de plantas com sintomas de Dieback .....	40
4.2.5	Análise de tecidos com sintomas de superbrotamento .....	41
4.2.6	Análises morfológicas e filogenéticas.....	41
4.2.7	Análise histológica.....	42
4.2.8	Preparo das Amostras para Análise de Microscopia Eletrônica.....	42

4.2.8.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
4.2.8.2	Microscopia Eletrônica a Laser Confocal .....	43
4.3.1	Construção dos cassetes e modificações dos vetores para o sistema CRISPR/Cas9.....	43
4.3.2	Cultivo, obtenção de protoplastos e transformação genética de <i>Fusarium decemcellulare</i> .....	46
4.3.3	Caracterização das linhagens <i>knockout</i> .....	48
4.3.3.1	Isolamento de DNA e análise de transformantes via PCR.....	48
4.3.3.2	Sequenciamento.....	48
4.3.3.3	Teste de estabilidade mitótica.....	49
4.3.3.4	Análise morfofisiológica das linhagens transformantes.....	49
5.	Capítulo I: Transformação genética de <i>F. decemcellulare</i> com proteínas fluorescentes GFP e DsRed... 51	
5.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1.1	Transformação genética de <i>F. decemcellulare</i> via ATMT.....	51
5.1.2	Protoplastos de <i>F. decemcellulare</i> .....	51
5.1.3	Transformação genética de <i>F. decemcellulare</i> via PEG .....	51
5.1.4	Análise e caracterização dos transformantes de <i>F. decemcellulare</i> .....	52
6.	Capítulo II: Análise do processo de germinação á infecção de <i>Fusarium decemcellulare</i> em guaranazeiro causando sintomas de Dieback e Superbrotamento.....	62
6.1	RESULTADOS.....	62
6.1.1	Germinação, penetração e colonização de <i>F. decemcellulare</i> em mudas de guaranazeiro .....	62
6.1.2	Processo de infecção de <i>Fusarium decemcellulare</i> em guaranazeiro causando Dieback .....	65
6.2	DISCUSSÃO.....	70
7.	Capítulo III: Obtenção de mutantes para genes relacionados à patogenicidade de <i>F. decemcellulare</i> por meio de CRISPR/Cas9. ....	76
7.1	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	76
7.1.1	Obtenção e Caracterização de Linhagens com <i>Knockout</i> .....	76
8.	CONCLUSÃO .....	81
9.	REFERÊNCIAS .....	82

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O *Fusarium decemcellulare* é agente causal de doenças com sintomas variados, havendo relato em mais de 85 espécies vegetais, tropicais e subtropicais (Far e Rossman 2019). Já foi isolado de diversas espécies vegetais, como dos ramos da árvore ornamental *Magnolia denudata* (Wang e Chen, 2015); de frutos como a maçã (*Malus pumila* Mill.) com manchas redondas, castanho-avermelhado (Seung-Yeol et al., 2017); do cafeeiro (*Coffea canephora*) com sintomas de murchamento, amarelecimento das folhas, desfolhação, escurecimento do tecido vascular (Belan et al., 2018); da mangueira (*Mangifera indica*) que apresentou superbrotamento de gema vegetativa após 8 meses de inoculação nas gemas (García-López et al., 2017). Além do superbrotamento, há relatos também deste patógeno causando a doença de Dieback em magueira (Yan-Xiang et al., 2013), assim como em cacau (Adu-Acheampong et al., 2011).

Em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke) os sintomas do complexo superbrotamento causado pelo *F. decemcellulare* (*Fdc*) ocorrem praticamente durante todo o ano independentemente do estadió fenológico da planta. A grande variação nos sintomas ocorre de acordo com o genótipo da planta infectada. Alguns genótipos de guaranazeiro manifestam quase que exclusivamente a hipertrofia floral, enquanto em outros genótipos predomina o superbrotamento de gemas vegetativas ou ainda as galhas no caule (Batista e Bolkan, 1982). O comprometimento da planta com estes sintomas pode chegar a afetar até 100% da produção de frutos, sendo considerado um problema para o cultivo de guaranazeiro (Araújo et al., 2006; Gasparoto et al., 2006), que tem importância econômica para alguns municípios do Amazonas – Brasil, dentre eles: Presidente Figueiredo, Maués, Urucará, Apuí, Nova Olinda do Norte e Boa Vista do Ramos (Silva et al., 2018, IBGE, 2020).

O *Fusarium decemcellulare*, além de tecidos sintomáticos também foi isolado de tecidos assintomáticos como raiz, caule e folhas (Queiroz, 2016). Apesar do isolamento deste patógeno em diversas espécies de plantas em vários países, como a China, Coreia, Índia, e o Brasil, entre outros (Wang e Chen, 2015; Seung-Yeol et al., 2017; García-López et al., 2017; Belan et al., 2018), este é o primeiro trabalho que observa sintomas semelhantes da doença Dieback em mudas de guaranazeiro. É também o primeiro a investigar o processo de interação patógeno-hospedeiro em nível microscópico, em plantas de tomate e guaraná, visando à compreensão das fases que compõem o ciclo de vida (germinação, penetração, infecção e colonização) do *F. decemcellulare* nos tecidos tanto superficiais quanto internos por meio de microscopia eletrônica.

O uso das proteínas fluorescentes verde (*Green Fluorescent Protein* - GFP) e vermelha (*Red Fluorescent Protein* - RFP) em estudos de interação patógeno-hospedeiro tem facilitado a compreensão dos processos de infecção e colonização. O fungo transformado geneticamente com as proteínas é rastreado nos tecidos da planta, permitindo o acompanhamento de detalhes durante o processo de penetração e colonização, sendo diferenciado dos demais fungos que também podem estar presentes na planta hospedeira (endofíticos) (Logopodi et al., 2002; Stephens et al., 2008; Wu Lei et al., 2011; Xiao et al., 2013).

Além da necessidade de compreender os processos envolvidos na germinação, penetração e colonização, existe a necessidade de entender quais os mecanismos envolvidos no desencadeamento do processo de patogenicidade e/ou virulência desse fitopatógeno. A falta de informações sobre aspectos da patogenicidade e/ou virulência também é um empecilho aos avanços nas pesquisas e no desenvolvimento de formas de controle da doença. Visando superar este gargalo e contribuir com o avanço nas pesquisas de genômica funcional em *Fdc*, dados do genoma completo e transcriptoma foram obtidos pelo grupo de pesquisa AmazonMicro-Microbiota amazônica para o desenvolvimento de produtos e processos, e foram utilizados para caracterizar os genes relacionados à patogenicidade e virulência, por meio de diferentes ferramentas de silenciamento gênico, como o sistema de edição de genomas CRISPR/Cas9.

As análises genômica, transcriptômica e metabolômica de *F. decemcellulare* indicaram que entre as possíveis estratégias do patógeno para desencadear o superbrotamento, pode estar a biossíntese do hormônio auxina (IAA) (Lobo, 2016). Este hormônio pode estar associado ao surgimento dos sintomas, uma vez que, além da auxina endógena, a auxina produzida pelo patógeno pode desencadear um desequilíbrio hormonal como o observado em outras plantas (Tsavkelova et al., 2012; Kulkarni et al., 2013). Foram identificadas duas possíveis vias de síntese de IAA (vias do indol-acetaldeído e da triptamina), bem como também um desvio da via do indol-acetaldeído por meio da enzima monooxigenase YUCCA. Neste mesmo estudo realizado por Lobo (2016), foram localizados no genoma os genes destas vias, constatando que, o que codifica a enzima indol-acetaldeído desidrogenases (*aldh*) possui duas isoformas uma no cromossomo 9 e outra no cromossomo 2.

Embora tenham identificados genes relacionados à biossíntese de IAA em *F. decemcellulare* e confirmada a habilidade deste patógeno em produzir auxina, ainda não está claro se a produção de IAA apresenta alguma vantagem adaptativa ou se é um dos mecanismos utilizados para desencadear a doença em guaranazeiro, indicando a necessidade de estudos funcionais dos genes relacionados à sua produção e obtenção de linhagens *knockout* incapazes de produzir IAA.

Dentro deste contexto, o sistema CRISPR/Cas9 pode ser uma ferramenta para o estudo funcional dos genes envolvidos na via de síntese da auxina (IAA) e identificação do papel deste hormônio com a patogenicidade de *F. decemcellulare* em guaranazeiro, devido à alta eficiência deste sistema de edição de genoma de fungos filamentosos para a obtenção de *knockout* (Liu et al., 2015, Arazoe et al., 2015).

A identificação do papel funcional de genes relacionados à doença pode contribuir para o desenvolvimento de várias estratégias de controle. Contudo, para que isto ocorra faz-se necessário superar gargalos metodológicos que influenciam diretamente na análise funcional de qualquer genoma, como um protocolo eficiente de transformação genética e o estabelecimento de um sistema eficiente de edição de genoma.

Deste modo, este trabalho teve como objetivo colaborar significativamente na superação de gargalos relativos à interação *F. decemcellulare*-guaranazeiro, realizando: 1- o estabelecimento de condições eficientes para transformação genética de *F. decemcellulare*, que é etapa básica e crucial para qualquer pesquisa que vise acessar ou modificar o genoma de uma dada espécie como no caso em questão; 2- identificação da forma de colonização do *F. decemcellulare* em guaranazeiro para auxiliar no estabelecimento de formas de controle da doença, 3- desenvolvimento de uma metodologia eficiente para análise funcional de genes deste patógeno com base no sistema de edição de genoma CRISPR/Cas9.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O Guaranazeiro:

#### 2.1.1 Origem e Classificação

As espécies de guaranazeiro estão distribuídas pela América tropical e subtropical, e uma única espécie na África tropical. Dentre as espécies está *Paullinia cupana* H.B.K., dividida em duas subespécies ou variedades: *P. cupana* var. *typica* e *P. cupana* var. *sorbilis*. A variedade *sorbilis* (Mart.) Ducke, foi domesticada pela comunidade indígena Saterê-Maué da região de Maués-AM (Nascimento Filho, 2003).

#### 2.1.2 Descrição Morfo-fisiológica

Nas epidermes adaxial (superior) e abaxial (inferior) da folha de guaranazeiro variedade *sorbilis* as células apresentam contornos sinuosos e as paredes externas possuem adelgaçamentos bem visíveis. Na superfície adaxial da folha adulta próxima das nervuras ocorrem alguns tricomas glandulares (pluricelulares), diferentemente das folhas jovens que apresentam inúmeros tricomas glandulares em toda superfície da folha, que são perdidos durante o desenvolvimento foliar, sendo encontradas cicatrizes em folhas adultas consequentes da queda desses tricomas (Areia, 1965).

Já na epiderme abaxial das folhas, além dos tricomas glandulares são encontrados também tricomas lineares (unicelulares) presentes em maior frequência nas nervuras principal e secundária, com formato pontiagudo e formam-se pela diferenciação de uma célula epidérmica, apresentando pequenos grânulos na superfície externa da parede. Enquanto, os tricomas glandulares são formados pela divisão de uma célula epidérmica, composta por cerca de 6-8 células dispostas em fileira curvada, sendo que algumas de suas últimas células possuem grandes vacúolos cheios de substâncias às vezes com aspecto granuloso, possivelmente óleos essenciais ou resinas (Areia, 1965).

São encontrados também na superfície abaxial de folhas adultas numerosos estômatos, com significativa importância em relação à transpiração, economia hídrica e assimilação de CO<sub>2</sub>. Porém, os estômatos em algumas espécies de plantas podem também servir como porta de entrada para penetração de fungos patogênicos (Brunelli et al., 2004; Mafia et al., 2009).

A inflorescência da variedade *sorbilis* apresenta-se com tamanho variável ocorrendo geralmente na axila das folhas ou na base de uma gavinha. As flores são ligeiramente menores do que da variedade *typica*, são dispostas no eixo principal da inflorescência, organizadas em fascículos e são funcionalmente unissexuais. O cálice das flores é composto de cinco sépalas, das quais duas são menores e externas, enquanto as outras três são mais estreitas e semelhantes às pétalas (Escobar et al., 1983; Nascimento filho, 2001; Nascimento filho, 2003).

Embora as flores masculinas e femininas estejam presentes na mesma inflorescência, os picos de floração de ambas são dessincronizados. Os estames possuem pequenas quantidades de pólen, e a curta duração da antese masculina e feminina limita a possibilidade de realização de cruzamentos manuais em grande escala (Gondim, 1978). Aparentemente, quanto mais longo o período de atividade da inflorescência, maior a probabilidade de ocorrência de mais de um período de floração feminina. Por causa disso, são encontradas em uma mesma inflorescência, flores e frutos em diferentes estádios de maturação, o que pode obrigar à realização de diversas colheitas (Atroch, 2009).

A polinização natural dessas flores é efetuada por insetos, que segundo Gondim (1978) pode estar adaptada aos Hymenoptera. No entanto, além dos polinizadores, existem também outros insetos que causam sérios danos às folhas, a inflorescência e aos frutos do guaranazeiro, como é o caso do tripses (*Pseudophilothrips adisi*), pois se desenvolve geralmente na parte abaxial das folhas novas, causando deformações e queda, e nas inflorescências causa o secamento prematuro das flores, prejudica os frutos na fase inicial de desenvolvimento, afetando o crescimento e conseqüentemente a qualidade dos frutos (Tavares et al., 2005). Ademais, este inseto é considerado um vetor transmissor de fitopatógenos, como por exemplo, o fungo *Fusarium decemcellulare* agente causal do superbrotamento em guaranazeiro (Adis et al., 1985; Tavares et al., 2007).

As sementes do guaranazeiro da var. *sorbilis* apresentam altos teores de substâncias como a teobromina (vasodilatadora), teofilina (broncodilatadora) e cafeína (estimulante), propícias para serem usadas nas indústrias farmacêuticas e de bebidas, constituem-se em interessantes alternativas de exploração agrícola (Lima et al., 2005).

### **2.1.3 Importância Socioeconômica do Guaraná**

No Brasil o cultivo de guaranazeiro é realizado em sete Estados, nas regiões Norte (Amazonas, Pará, Acre e Rondônia), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso) e Sul (Santa Catarina) de acordo com o censo agropecuário IBGE (2020). Mas, também existem pequenas áreas plantadas em outras regiões do país e na Amazônia Venezuelana e Peruana. Contudo, mesmo havendo outros países produtores o Brasil permanece como único produtor mundial de guaraná em escala comercial (Suframa, 2003; CONAB, 2019).

O guaraná despertou a atenção para comercialização devido as suas ações estimulantes e potencialidades medicinais, sendo utilizado nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, e pelas indústrias de bebidas para produção de refrigerantes. Seus derivados são, em sua quase totalidade, comercializados de quatro diferentes maneiras: em sementes (ramas) - onde as

sementes são torradas e vendidas aos intermediários e indústrias, sendo essa a forma mais usada na comercialização; em bastão; em pó e em xaropes e essências (Suframa, 2003; Oliveira, 2010; Michiles, 2014).

Apesar da origem do guaraná ser no Amazonas, o Estado guaranaicultor mais produtivo do Brasil é a Bahia (IBGE, 2020). Essa alta produtividade da Bahia é explicada pelo uso de novas técnicas de cultivo empregadas pelos seus guaranaicultores, as quais começaram a ser utilizadas há menos tempo pelos agricultores no Amazonas. Havia resistência à renovação dos plantios por mudas desenvolvidas por meio do processo de clonagem (reprodução assexuada), acreditando que o uso de novas técnicas encareceria o produto (Suframa, 2003; Tavares et al., 2005).

Além da falta de uso de técnicas adequadas outros fatores podem levar a queda da produtividade, como o surgimento de pragas e doenças nas plantações que são favorecidas pelo clima tropical da região. Este problema pode ser amenizado por meio de pesquisas e de uma maior integração das comunidades com os geradores de conhecimento da cultura do guaraná. Havendo a necessidade de mudança neste cenário, visto ser esse fruto um produto com grande potencial econômico, pode beneficiar economicamente e de várias outras formas a região onde é cultivado, uma vez que o guaraná pode aumentar sua participação na pauta de exportações (Michiles, 2014).

Diante de esforços para aumentar a produção de guaraná, a produtividade no Amazonas saiu de 111 Kg/ha em 2010 para 174 Kg/ha em 2016 e 183 Kg/ha em 2018 (CONAB, 2013; CONAB, 2017; CONAB, 2019), demonstrando bons resultados de investimentos empregados na área de pesquisa e na distribuição de mudas de clones selecionados de guaranazeiros resistentes e com alta produtividade, desenvolvidos pela Embrapa em substituição às mudas menos produtivas, mais suscetíveis à doença e também aos guaranazeiros com idade avançada (CONAB, 2013; Pereira et al., 2007).

A implantação de projetos empresariais de cultivo contribui com a adoção de padrões técnicos agrícolas e o aumento da produtividade do guaraná no Amazonas (Pereira et al., 2007).

## **2.2 Doenças da cultura do Guaranazeiro**

Considerando o aumento da demanda do guaraná pelo mercado interno e externo, existe a constante necessidade de expansão de áreas de cultivo e a promoção do adensamento populacional do guaranazeiro, o que acaba proporcionando o surgimento de doenças, principalmente aquelas de natureza fúngica que interferem na produtividade e exploração comercial (Pereira et al., 2007), favorecidas pela alta umidade e temperatura da região

Amazônica (CONAB, 2014). Dentre as doenças que acometem a cultura do guaranazeiro estão a requeima, a mancha angular, a crosta preta, queima da teia micélica, pinta preta dos frutos, podridão do pé, podridão vermelha das raízes, entre outras. As consideradas de maior importância econômica são: a antracnose causada pelo *Colletotrichum guaranicola* e o superbrotamento causado pelo *F. decemcellulare* Brick (teleoformo *Albonectria rigidiuscula*) (Duarte & Albuquerque, 1999).

### 2.2.1 Complexo Superbrotamento

O superbrotamento em guaranazeiro é uma doença endêmica nas regiões produtoras de guaraná no Estado do Amazonas, conhecida também como complexo superbrotamento (Pereira et al., 2007). As plantas podem ser infectadas e manifestar três diferentes sintomas da doença que podem surgir desde a fase de muda (Figura 1A e C), acarretando redução no desenvolvimento das mesmas até a fase de planta adulta (Figura 1B), causando decréscimo na produção, que em alguns genótipos pode atingir até 100% (Batista & Bolkan, 1982; Araújo et al., 2006; Gasparoto et al., 2006; Pereira et al., 2007).

O *F. decemcellulare* infecta estruturas em desenvolvimento ativo, como os tecidos meristemáticos, tanto gemas vegetativas (ramos) quanto gemas florais (inflorescência) (Figura 1A, B e C). Os sintomas podem variar entre as diferentes partes da planta e em diferentes épocas após a infecção independente de seu estágio fenológico.

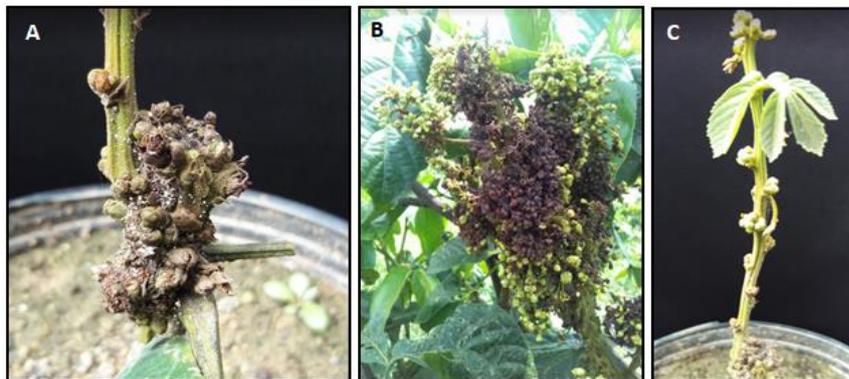


Figura 1: Imagens dos sintomas complexo superbrotamento. Em A: sintoma de superbrotamento com a formação de galha em mudas de guaranazeiro; Em B: Sintomas nas gemas florais em planta adulta; Em C: Sintomas de superbrotamento em gemas vegetativas em mudas de guaranazeiro, com encurtamento dos entrenós.

O sintoma desenvolvido em gemas vegetativas é conhecido como superbrotamento ou hiperplasia de gemas vegetativas. O fitopatógeno induz a proliferação constante de brotações sucessivas a partir de uma única gema, sendo que estas brotações ocorrem em caules com internódios de comprimento reduzido em pontos próximos, ocorrendo ao longo dos ramos devido à multiplicação exagerada das células (hiperplasia), podendo acarretar morte da muda (Figura 1A e C) (Duarte & Albuquerque, 1999; Araújo et al., 2006; Pereira et al., 2007).

Os sintomas da doença quando ocorrem em gemas florais, à doença é chamada de superbrotamento de inflorescência, resulta na hipertrofia e hiperplasia de células das pétalas e do número de pétalas, fazendo com que as flores adquiram um aspecto de massa densa inviabilizando completamente a produção de frutos que implica em redução significativa na produção (Figura 1B) (Araújo et al., 2006; Queiroz et al., 2020).

A doença também pode ocorrer em gemas terminais das mudas, sendo gerada uma massa desorganizada constituída por múltiplos e diminutos brotos, dando um aspecto de massa densa desuniforme, muitas vezes assemelhando-se a rosetas, nesse caso a doença é chamada de galha no caule (Figura 1A) (Araújo et al., 2006; Queiroz et al., 2020).

Em inflorescências com sintomas de superbrotamento, diferentemente das sadias, as cápsulas apresentam paredes muito espessas que impedem a exposição dos verticilos reprodutivos malformados contidos por pétalas também com má formação, e assim como nas gemas vegetativas, ocorre também o encurtamento no eixo longitudinal nas estruturas florais, sendo observado claramente o espessamento anormal nas sépalas e pétalas por meio de cortes transversais, com um aumento no número de camadas de células, no tamanho das células, além de um aparente aumento na espessura das paredes celulares (Queiroz et al., 2020). Estão presentes também alterações nos números dos componentes internos das capsulas como, nos conjuntos de verticilos e nos rudimentos de pistilos, estigmas, ovários e filetes que circundam os pistilos. Diante de todas essas alterações, além do aspecto compacto e endurecido da inflorescência, a polinização das flores acaba não sendo possível e conseqüentemente a produção dos frutos é afetada (Queiroz et al., 2020).

Já o sintoma da galha no caule, gerado pela aglomeração de cápsulas em ramos principais do guaranazeiro, foi observado por Queiroz et al., 2020, apresentando dois diferentes tipos de galhas dependendo da idade, baseadas nas diferenças da morfologia externa das cápsulas. No interior das cápsulas que compõem as galhas, observadas em corte longitudinal, ocorrem sucessões de gemas ou tecidos não diferenciados, que não apresentam sinais de amolecimento ou apodrecimento.

Uma hipótese que atualmente vem sendo investigada na tentativa de entender a ocorrência dessa doença em guaranazeiro, com esses diferentes sintomas, é a de que um elevado nível de hormônio nos tecidos da planta gere um desequilíbrio hormonal favorecendo o surgimento da doença. Estes hormônios atuam no crescimento e desenvolvimento de plantas, e também estão associados ao surgimento de doenças. Uma das formas de manter o equilíbrio dos níveis de auxina ativa é a indução da expressão de uma família de proteínas denominadas GH3 que ativa a conjugação de auxinas com aminoácidos, direcionando o conjugado à

degradação ou à reutilização (Staswick et al., 2005). Entretanto, apenas algumas formas podem ser hidrolisadas e utilizadas novamente, outras como a forma IAA-Asp aumentam a suscetibilidade da planta, contribuindo com a transcrição de genes de virulência em fitopatógenos (González-Lamothe et al., 2012).

Lobo (2016) identificou a nível genômico e transcriptômico, duas vias putativas de síntese de IAA em *F. decemcellulare*, a via do indol-acetaldeído e via da triptamina. A primeira composta por três passos, sendo que o patógeno apresenta ainda um desvio dessa via por meio da enzima YUCCA que permite a produção de IAA com dois passos metabólicos. Esses dados indicam uma versatilidade para síntese do hormônio auxina pelo patógeno. Mas, a confirmação da produção de auxina não é suficiente para confirmar se este hormônio é o único ou principal responsável pela doença em guaranazeiro, visto que no genoma de *F. decemcellulare* também foram detectados genes para outras vias hormonais como etileno e citocinina.

As formas de controle para o superbrotamento variam de acordo com os diferentes sintomas e reações dos genótipos dos clones de guaranazeiro, pois alguns genótipos manifestam quase que exclusivamente hipertrofia floral, já outros predominam quase exclusivamente o superbrotamento de gemas vegetativas. O uso de fungicida é considerado inviável economicamente e a poda fitossanitária é uma das poucas estratégias para redução dos danos causados pela doença (Araújo et al., 2016).

Diante dos estudos existentes, os quais visam conhecer melhor os sintomas desta doença e compreender aspectos fisiológico, genômico e transcriptômico do fitopatógeno, ainda existe uma enorme carência de informações no que diz respeito à interação entre *F. decemcellulare* e o guaranazeiro, envolvendo penetração, colonização e infecção, além de aspectos relacionados à patogenicidade e/ou virulências, especificamente à falta de informações sobre genes ou famílias gênicas que estejam envolvidos nos processos de patogenicidade e/ou virulência. A falta de informações sobre este patossistema é um empecilho aos avanços nas pesquisas e dificulta o desenvolvimento de estratégias de controle ao superbrotamento de forma estável.

### **2.2.2 Dieback**

A doença de Dieback é relatada em várias espécies de plantas podendo ser causada por diversos patógenos, inclusive algumas espécies de *Fusarium* (Elmer e Marra, 2010; Valdez et al., 2013). Os sintomas mais relatados quando causados por fungos são, manchas cloróticas em folhas, desfolhamento, escurecimento vascular dos ramos, necrose, secagem e morte da planta. Em cacau, a doença é causada pelo fungo *Oncobasidium theobromae* (Guest e Keane, 2007), pelo *Lasiodiplodia theobromae* e pelo *F. decemcellulare* (Adu-Acheampong, 2009; Adu-

Acheampong et al., 2011). Em manga existem relatos da doença sendo causada pelo *F. decemcellulare* (Yan-Xiang et al., 2013).

Os sintomas algumas vezes podem ser confundidos com outras doenças e podem ser causados por muitos fatores, dentre eles podemos citar as condições climáticas favoráveis para o fitopatógeno. Quando a doença é causada por fungos ela pode ser iniciada pelo crescimento sistêmico do patógeno favorecido muitas das vezes pela penetração por meio de ferimentos (lesões) no caule, onde os sintomas se desenvolvem. Em alguns casos, os sintomas foliares são menos frequentes, mas os caules ainda podem estar infectados (Crowdy, 1947; Ploetz, 2007; Guest e Keane, 2007; Adu-Acheampong et al., 2011). Segundo Ploetz (2007), o *F. decemcellulare* é o agente causal de sintomas como galha e dieback em cacau sendo considerada uma situação complexa.

### **2.3 *Fusarium decemcellulare* Brick**

Espécies do gênero *Fusarium* são capazes de infectar humanos, animais e plantas (Guarro e Gené, 1992; Leslie & Summerell, 2006; Muhammed et al., 2013). Na área agrônômica, algumas espécies apresentam importância econômica, por causarem perdas expressivas na produtividade em diversas culturas, dentre as espécies está o *F. graminearum* patógeno do trigo, *F. verticillioides* do milho, *F. oxysporum* de plantas mono e dicotiledôneas, *F. virguliforme* da soja e *F. decemcellulare* capaz de infectar várias espécies de plantas, encontrado normalmente em áreas tropicais e subtropicais (Leslie & Summerell, 2006; MA et al., 2010; Srivastava et al., 2014).

#### **2.3.1 Classificação e Morfofisiologia**

O *F. decemcellulare* Brick (*A. regidiuscula*) (Berk. & Broome) Rossman & Samuels é um fungo filamentosos que está classificado taxonomicamente na família Nectriaceae, gênero *Fusarium*, complexo de espécies *F. decemcellulare* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>).

Apresenta características morfológicas que facilitam sua identificação, onde as colônias quando cultivadas *in vitro*, em meio BDA (Batata Dextrose Agár), a 25° C, apresentam pigmentação rosa a vermelho carmim após 3 a 5 dias de cultivo e com cerca de 10 dias de cultivo atingem um diâmetro de cerca de 7,5 a 8,0 cm. Produz micélios aéreos cotonosos onde são gerados os microconídios, os quais na maioria das vezes são formados em cadeia ou em “falsas cabeças” e possuem características comuns aos conídios do gênero *Fusarium*, são hialinos, com formato oval medindo entre 10-15 x 3-5 µm. Já os macroconídios formados a partir dos conidióforos em arranjos chamadas de esporodóquios com coloração amarelada, são

curvos, cilíndricos a fusóides com parede grossa, exceto as pontas, medem cerca de 55-130 x 6-10 µm, constituído de cerca de 7 a 10 septos, com as células das extremidades chamadas de célula curvada e célula pé (Rossman et al., 1999; Leslie & Summerell, 2006).

O *F. decemcellulare* possui forma de reprodução assexuada e sexuada. A forma sexuada é definida pelo sistema de cruzamento denominado *mating type*. Este sistema é baseado no número de *loci* gênicos e no número de alelos nestes *loci* envolvidos no processo. Em ascomicetos existe um *locus* denominado *MAT*, com dois tipos de alelos funcionais ou idiomorfos “*MAT-1* e *MAT-2*”, ocorrem na mesma posição no cromossomo, não havendo similaridade nas suas sequências (Leslie & Summerell, 2006; Guimarães, 2013). Os isolados de *F. decemcellulare* que apresentam somente *MAT-1* ou *MAT-2* são denominados heterotáticos, enquanto aqueles indivíduos que apresentam os dois idiomorfos “*MAT-1* e *MAT-2*” em seu genoma são denominados homotáticos, sendo capazes de realizar autofecundação. Isolados heterotáticos necessitam da interação “cruzamento” entre isolados com idiomorfos distintos, e dessa maneira consequentemente contribui para o aumento da variabilidade genética da população. Os isolados homotáticos e heterotáticos podem ser separados filogeneticamente como indicado por Guimarães (2013).

Além das diferenças nos aspectos genéticos e fisiológicos, os isolados homotáticos e heterotáticos de *F. decemcellulare* também são diferenciados por aspectos morfológicos, pois os isolados homotáticos são capazes de produzir apenas quatro ascósporos “esporos sexuais” por asco, enquanto os isolados heterotáticos produzem oito ascósporos por asco (Alexander e Carmichel, 1973; Leslei e Sammerell, 2006; Guimarães, 2013).

Ademais, Ford e colaboradores (1967) observaram que os isolados homotático e heterotático diferenciam-se ainda em seus modos de vida, onde isolados homotáticos submetidos ao teste de patogenicidade em cacauero não foram capazes de desencadear sintomas nas plantas hospedeiras, apresentando assim, modo de vida endofítico. Diferentemente dos isolados heterotáticos que foram capazes de induzir sintomas nas plantas analisadas, considerado patogênico (Guimarães, 2013). No entanto, em estudo realizado por Sfalsin (2012) foram obtidos isolados homotáticos de tecidos sintomáticos de cacauero, levando a crer que o modo de vida precisa ser melhor estudado em *F. decemcellulare*.

### **2.3.2 Etiologia e Plantas hospedeiras do *F. decemcellulare***

Os primeiros relatos do *F. decemcellulare* como agente etiológico, associado a sintomas como a galha, ocorreu em mangueiras (*Mangifera indica*) na Venezuela, México e nos Estados Unidos (Malaguti e Reyes, 1964; Ângulo e Villapudua, 1982; Ploetz et al., 1996), e em 1982

foi relatado por Batista & Bolkan causando a doença superbrotamento em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) no Estado do Amazonas - Brasil com pelo menos dois sintomas diferentes, hipertrofia e hiperplasia em gemas vegetativas e inflorescência (Duarte e Albuquerque, 1999). Posteriormente, inúmeros casos foram relatados, sendo muitas das hospedeiras de importância econômica como, cacauzeiro (*Theobroma cacao*) (Dalla e Camargo 1997), cajueiro (*Anacardium occidentale*) (Matos et al., 2016), erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (Poletto et al., 2006), e várias outras (Araújo et al., 2006; Sfalsin, 2012; Guimarães, 2013).

Serrato-Diaz (2015), isolou *F. decemcellulare* de tecidos sintomáticos das plantas de longan (*Dimocarpus longan*), rambutã (*Nephelium lappaceum*) e manga, culturas muito importantes em Porto Rico. Os isolados estavam associados à necrose e murcha de inflorescências em longan e rambutã e nas mangueiras os sintomas foram necrose vascular e morte das flores ao longo das raques. Já em plantas de limão-caieira no Pará - Brasil, a doença ocorre tanto no tronco, nos ramos e nas inflorescências a partir do eixo floral, com inchamento dos talos florais (Bastos e Santos, 2001).

Diferentemente do que é observado na maioria das espécies de plantas afetadas, Poletto et al., (2006) observou nas partes aéreas de plantas de erva-mate que o *F. decemcellulare* causou apenas um crescimento mais lento não havendo severidade nos sintomas. Porém, os sintomas mais severos foram observados no sistema radicular, apresentando necrose em algumas partes, em especial nas pontas, produzindo um sistema radicular denso, agrupado (em forma de cabeleira) e curto, com uma excessiva emissão de radículas.

Este fungo mesmo sendo citado como patogênico devido estar associado a vários sintomas em inúmeras espécies de plantas é considerado saprofítico capaz de viver no solo e sobre matéria orgânica e restos culturais, além de ser considerado também endofítico, pois já foi isolado de plantas aparentemente saudáveis, havendo também registro do fitopatógeno isolado de frutos apodrecidos de cacauzeiro em sua forma não patogênica, porém existe a necessidade de ser melhor estudado (Meija et al., 2008; Sfalsin, 2012; Guimarães, 2013).

Apesar dos inúmeros relatos da ocorrência do *F. decemcellulare* como agente patogênico em diversas plantas, inclusive em guaranazeiro, pouco ou quase nada se conhece sobre a dispersão do patógeno e seu processo de infecção e colonização.

#### **2.4 Interação Patógeno-Hospedeiro: Germinação, Penetração e Colonização**

Estudar o processo de interação patógeno-hospedeiro é a base para aplicação de medidas que poderão direcionar novos estudos. Visto que, seu entendimento pode esclarecer como as plantas são infectadas, colaborando, desta maneira, na definição de estratégias que impeçam ou

dificultem a penetração do patógeno. Além de, indicar caminhos para o melhoramento de plantas visando à resistência e o controle de doenças (Brunelli et al., 2005; Zambenedetti et al., 2007).

O processo de interação entre fungo patogênico e planta hospedeira muitas vezes ocorre com o desenvolvimento de diferentes estratégias de defesa e ataque. Nas plantas o grau de envolvimento do sistema de resistência pode variar de acordo com diversos fatores como: a idade da planta hospedeira, o órgão e tecido afetado, o estado nutricional e as condições ambientais (temperatura, luminosidade e disponibilidade de água na superfície do hospedeiro), fatores que estão intimamente relacionados no desenvolvimento de mecanismos de defesa e ataque em ambos os organismos, interferindo no sucesso de processos iniciais como a germinação e penetração de fungos patogênicos e conseqüentemente a colonização da planta hospedeira (Johal et al., 1995; Walter, et al., 2009).

Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser classificados em bioquímicos e estruturais pré-formados e pós-formados (Pascholati e Leite, 1994). Os mecanismos estruturais são barreiras físicas com função de inibir à penetração e/ou colonização do fitopatógeno, enquanto os mecanismos bioquímicos constituem-se na síntese de substâncias tóxicas em células e tecidos, capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno. Estes devem estar presentes em concentração adequada e em forma acessível ao patógeno, de maneira que implique em mudanças na expressão da doença e na resistência da planta (Pascholati e Leite, 1994; Schwan-Estrada et al., 2008).

Segundo Pascholati e Leite (1994), a resistência observada em plantas hospedeiras é definida como a capacidade dela atrasar ou de evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos, onde a efetividade da ação depende da expressão dos seus mecanismos. Bentes e Matsuoka (2002) conseguiram diferenciar clones de guaranazeiros resistentes e suscetíveis ao fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola* observando que, nos clones resistentes ocorreu atraso no processo de penetração e colonização do fitopatógeno nos tecidos, sendo ainda observada uma baixa quantidade de formação de apressórios, diferentemente do que foi observado em clones suscetíveis.

A primeira etapa do processo de infecção de um fungo na planta hospedeira inicia-se com a deposição de seus esporos. Estes podem ser disseminados por meio do contato de plantas saudas com esporos liberados por plantas doentes ou pelo uso de material de plantio contaminado. Esporos do fungo também podem ser transportados pelo vento e por insetos, o que demonstra uma alta facilidade de contaminação. Após os esporos serem depositados na superfície do tecido da planta suscetível inicia-se o processo de adesão (Brunelli et al., 2005).

Alguns fungos patogênicos reconhecem a superfície do hospedeiro, por meio de proteínas de membrana que reconhecem moléculas da cutícula de seu hospedeiro, dando início ao processo de germinação, mesmo à cutícula sendo considerada uma barreira física e química a penetração fúngica (Zambenedetti et al., 2007; Stangarlin et al., 2011).

Além da interação com a cutícula, estruturas do limbo foliar (nervuras) também atuam como um estímulo físico ao tubo germinativo, facilitando assim o processo de penetração (Somavilla e Prestes, 1999; Jerba et al., 2005). Jerba et al. (2005), comprovou que o grau de resistência de cultivares de feijão apresenta relação com a saliência das nervuras (topologia foliar) e a pilosidade foliar, uma vez que, as cultivares resistentes a *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* apresentaram nervuras foliares menos salientes e um aumento da pilosidade, com maior número de tricomas glandulares na região internerval e na nervura secundária.

O tempo e outros eventos envolvidos na fase de germinação e penetração de diversas espécies de fungos fitopatogênicos tem sido estudados com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), como *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de *Coffea arábica* (Ferreira et al., 2009), *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja (Zambenedetti et al., 2007), *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho (Brunelli et al., 2005) e *C. guaranicola* em folhas jovens e velhas de guaranazeiro (Bentes & Matsuoka, 2002). O tempo de germinação para as diferentes espécies de fungos é bastante variável, ficando em torno de 4 a 12h após inoculação, ao passo que alguns são capazes de formar apressórios variando em torno de 8 a 18 h após inoculação. Esse tempo de germinação pode variar em decorrência de determinadas condições ambientais, como umidade, temperatura e luminosidade (Brunelli et al., 2005). Os tubos germinativos em alguns esporos fúngicos iniciam-se primeiramente nas extremidades, e depois lateralmente (Leite et al., 1996; Jerba et al., 2005).

Enquanto alguns fungos utilizam estruturas especializadas como os apressórios e ferimentos, outros conseguem penetrar na epiderme das plantas por meio de estruturas da planta que atuam como barreira à entrada do patógeno. Neste grupo pode-se citar a cutícula, tricomas (pilosidade) e estômatos. A cutícula exerce atividade na resistência a saída de água da planta, impedindo assim a formação de um filme de água necessária para o patógeno germinar e penetrar, ela é uma barreira física eficiente contra patógenos que colonizam a superfície. Porém, dependendo da espessura ou da densidade dessa camada cuticular e da interação química, o patógeno consegue vencer esta barreira (Zambenedetti et al., 2007; Stangarlin et al., 2011).

Os tricomas além de atuarem na redução da perda de água pela planta também atuam na proteção, devido à produção de substâncias inibidoras e devido ao número de tricomas, que quando em maior quantidade interferem na continuidade do filme de água e, conseqüentemente,

na possibilidade do patógeno atingir aberturas naturais como os estômatos, ou mesmo atingir a superfície das células por onde iniciará a penetração. Mas, a base dos tricomas glandulares pode ser um ponto suscetível à infecção, uma vez que, a penetração de hifas, nesta região, foi relatada em cultivar moderadamente resistente de feijoeiro (Jerba et al., 2005; Stangarlin et al., 2011).

Os fungos patogênicos após penetrarem o tecido das plantas hospedeiras distribuem suas hifas primárias na região inicialmente infectada na epiderme no intuito de obterem sua nutrição e vencer os mecanismos de defesa da planta. Depois passam a colonizar inter e intracelularmente o parênquima da planta hospedeira, danificando as células. Processo que foi observado durante a colonização de tecidos foliares de guaranazeiros por *C. guaranicola* (Bentes, 2000), com alteração da parede celular e formação de massa. Também foram observadas alterações na parede de células da epiderme e de células mucilaginosas de cacaueteiro durante a colonização por *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*), apresentavam-se espessas e com aparente achatamento, além de colonização intracelular (Silva, 1997).

Existem várias formas de colonizar a planta hospedeira como, por exemplo, a colonização seletiva, a não seletiva, localizada e sistêmica ou generalizada. A forma de colonização do guaranazeiro por *F. decemcellulare* não é conhecida, mas trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa da Embrapa Amazônia Ocidental – Manaus/AM isolaram o fungo de diferentes partes da planta como, raiz, caule, e folhas de plantas tanto sintomáticas quanto assintomáticas de guaranazeiro.

#### **2.4.1 Proteínas fluorescentes aplicadas a estudos de colonização de plantas por fungos**

O estudo das interações fungo-planta foi facilitado nos últimos anos devido ao uso das proteínas fluorescentes. São importantes marcadores, pois possibilitam principalmente a detecção do patógeno no organismo hospedeiro, não sendo necessário o emprego de substratos ou cofatores para a visualização *in vivo*, sendo utilizadas como genes repórteres em diversos organismos procariotos e eucariotos (Lagopodi et al., 2002).

Existem atualmente diversas proteínas fluorescentes observáveis em diferentes comprimentos de onda. A proteína GFP (*Green fluorescent protein*) isolada de água-viva (*Aequorea Victoria*) (Chalfie et al., 1994), é utilizada como gene repórter em diversos organismos, por meio da transformação genética. É observável quando exposta à irradiação com ultravioleta, no qual sob excitação de UV absorve luz azul e emite luz verde (Pedroso, 2009). Depois da descoberta da GFP foram desenvolvidas outras colorações variantes como, CFP-ciano e YFP-amarelo e outras, obtidas com base nas alterações em algumas cadeias de

aminoácidos, porém devido à similaridade no comprimento de onda estas proteínas não são viáveis para o uso simultâneo com GFP (Schwartz e Patterson, 2003).

Posteriormente à descoberta da GFP em *Aequorea Victoria* por Chalfie et al. (1994), foi identificada a proteína fluorescente vermelha chamada *DsRed* originada de um coral denominado *Discosoma sp.* Esta é excitada em comprimento de onda diferente da GFP, absorvendo luz verde e emitindo luz vermelha (Bevis and Glick, 2002). Portanto, devido a essa diferença nos comprimentos de onda de excitação e emissão, é possível o uso destas proteínas simultaneamente, auxiliando em estudos de interação entre organismos (Sarroco et al., 2007). Ademais, estas proteínas possuem baixa ou nenhuma toxicidade, não apresentam atividade endógena e são consideradas estáveis (Lagopodi et al., 2002)

As proteínas de fluorescência GFP e DsRed já foram utilizadas como marcadores em algumas espécies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. verticillioides* e *F. oxysporum*) para verificar o processo de infecção e colonização dos fungos em plantas, podendo assim desvendar o mecanismo de interação entre o patógeno e o hospedeiro (Lagopodi et al., 2002; Stephens et al., 2008; Wu Lei et al., 2011; Xiao et al., 2013). Os resultados obtidos nestes trabalhos demonstraram que a utilização de fungos marcados com proteínas fluorescentes é uma abordagem conveniente e eficaz para o estudo de interações patógeno-hospedeiro.

## **2.5 Silenciamento Gênico Auxiliado pelo Sistema de Edição de Genoma CRISPR/Cas9**

Além da necessidade de compreender os processos envolvidos na germinação, penetração e colonização, existe também a necessidade de entender quais os mecanismos envolvidos no desencadeamento do processo de patogenicidade e/ou virulência de diversos fitopatógenos de interesse agrônômico.

Inúmeros projetos de sequenciamento de genoma e transcriptoma, bem como o uso de técnicas como proteômica, auxiliam na identificação de muitos genes e metabólitos de vários organismos, inclusive de fungos. Contudo, além de obter as sequências dos genes, é necessário analisar e definir o seu papel funcional. Para auxiliar na solução deste problema uma série de técnicas de silenciamento tem sido desenvolvida ao longo dos últimos anos para análise funcional de genes que atuam na patogenicidade e/ou virulência de fungos de importância para a agricultura (Bhadauria et al., 2009; Walter et al., 2009; Hardy et al., 2010).

O silenciamento de genes pode ser realizado por meio da interrupção (*gene disruption*) ou remoção/substituição de um gene alvo (*gene replacement*) estratégia conhecida como *knockout* gênico (Tierney e Lamour, 2005). Porém, a principal limitação do método de *knockout* por meio da recombinação homóloga é a baixa taxa de recombinação inferior a 5% (Silva et al.,

2006; Miao et al., 1995), gerada devido à ação do complexo de proteínas de reparo, chamadas Ku, formadas por um heterodímero com subunidades *Ku70* e *Ku80*, que promovem a união de extremidades não homólogas (NHEJ – *Non-homolog end joining*) fazendo com que o DNA exógeno possa ser integrado em qualquer parte do genoma (integração ectópica) (Ninomiya et al., 2004; Malavazi, 2007; Carvalho et al., 2010).

Com a desativação das proteínas de reparo em linhagens de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger*, houve o aumento da eficiência de recombinação homóloga em cerca de até 100% (Ninomiya et al., 2004; Carvalho et al., 2010). No entanto, a desativação pode causar danos irreversíveis à célula. Além desta limitação, as proporções falso-negativas altas entre os transformantes, associadas com técnicas de transformação laboriosas e muitas vezes de baixo rendimento, podem exigir o rastreio de centenas de transformantes em várias tentativas de transformação antes de a linhagem transformante ser isolada (Fuller et al., 2017).

Um método denominado sistema CRISPR/Cas9, considerado rápido, fácil e mais eficiente para edição de genoma está sendo utilizado em diversos organismos, desde os microrganismos (procariotos e eucariotos) até aos organismos superiores. Esse sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) associada à enzima endonuclease Cas9 é derivado do sistema imune adaptativo de procariotos, bactérias e archaea, contra material genético de vírus e plasmídeos. (Barrangou et al., 2007; Marraffini e Sontheimer, 2008).

No processo natural de resposta de defesa em bactéria, as proteínas Cas (Cas 1 e 2) capturam as sequências exógenas de DNA viral e plasmídeos que invadem a célula bacteriana, e incorporam estas sequências no genoma da bactéria em regiões do *locus* CRISPR adjacentes ao *locus* dos genes *CAS*, formando pequenos espaçadores (Bolotin et al., 2005; Makarova et al., 2011). Esta região com espaçadores é transcrita gerando um longo pré-crRNA, que é hibridizado com um pequeno RNA denominado *trans-activating* CRISPR (tracrRNA) formando uma cadeia dupla de RNA para ser clivado e processado pela ação de ribonuclease (RNase) III gerando CRISPR RNAs (crRNA) maduros (Brouns et al., 2008). A sequência híbrida de crRNA:tracrRNA associa-se a endonuclease Cas9 guiando-a até o DNA alvo do invasor (Makarova et al., 2011; Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). O complexo Cas9-crRNA-tracrRNA realiza uma varredura no material exógeno até o reconhecimento do domínio *protospacer adjacent motif* (PAM). Este domínio corresponde a uma sequência “NGG”, no qual N poderá ser qualquer outro nucleotídeo. Após o reconhecimento da endonuclease Cas9, esta efetua a clivagem do DNA quatro nucleotídeos a montante do domínio PAM (Garneau et al., 2010). Essa clivagem ocorre por meio da ação de dois domínios presentes na Cas9, o HNH que

cliva a fita complementar da sequência do RNA guia (gRNA) e RuvC cliva a fita não complementar da fita de gRNA (Martins et al., 2012).

O sistema CRISPR/Cas9 foi adotado na engenharia genética para modificar genes específicos, sem que outros sejam alterados, esclarecendo, a função de um determinado gene e sua consequência para o organismo. Um gRNA sintético de 20 pb com especificidade para a região alvo do DNA é introduzido na célula, sendo que, é necessário seguir algumas regras para construção desse gRNA, como por exemplo, a escolha da melhor sequência na posição adjacente a sequência PAM. Para a construção dos gRNA existem programas de bioinformática desenvolvidos para facilitar e direcionar para uma região específica. Além do gRNA sintético inserido na célula, sequências que codificam a endonuclease Cas9 são inseridas no genoma do organismo de interesse por meio de vetores específicos, a fim de que a Cas9 seja expressa constitutivamente. Em 2013 foi publicado um trabalho com o primeiro organismo eucarioto, *Drosophila melanogaster*, capaz de expressar de forma estável a endonuclease Cas9 (Kondo e Ueda et al., 2013).

Já em 2015, outro trabalho mostrou linhagens do fungo filamentosso transgênico *Aspergillus fumigatus* expressando de forma constitutiva a endonuclease Cas9, confirmando que a expressão desta proteína não foi deletéria ao fungo, tanto em crescimento vegetativo quanto em virulência, reforçando o potencial desta tecnologia do sistema CRISPR em estudos de patogenicidade e/ou virulência (Fuller et al., 2015).

A expressão da Cas9 em fungos filamentosos exige atenção na otimização de códons e na utilização de um promotor forte importante para uma maior eficiência da expressão. Arazoe et al. (2015) analisou a eficiência de diferentes construções com diferentes promotores endógenos desenvolvidos no fungo *Pyricularia oryzae*, sendo U6-1, U6-2 promotores específico de RNA polimerase III e TrpC específico para RNA polimerase II, amplamente utilizado em fungos filamentosos. Os três promotores promoveram eventos com *knockout*, porém os promotores U6 apresentaram maior taxa de eficiência. Comprovando a eficiência do sistema CRISPR/Cas9 no reconhecimento de sequências alvo e edição de genes endógenos através da substituição de genes mediada por recombinação homóloga com alta eficiência.

O sistema CRISPR além de facilitar e aumentar a eficiência de recombinação também possibilita avaliar a atividade funcional de genes por meio da edição multiplex, sendo desta maneira possível a edição gênica de mais de um gene no mesmo organismo (Wang et al., 2016). Diferentemente de técnicas como RNA de interferência (RNAi), que pode promover o silenciamento multiplex, porém de forma parcial menos estável, pois age no produto gênico e não diretamente no gene.

Diante dos avanços nas tecnologias para edição de genoma, o sistema CRISPR/Cas9 representa uma excelente alternativa para estudo da função de genes, que estejam possivelmente envolvidos no processo de patogenicidade e/ou virulência em *F. decemcellulare*, o qual já tem seu genoma completo sequenciado.

As vias metabólicas relacionadas à síntese do hormônio vegetal IAA foram identificadas na análise do transcriptoma de *F. decemcellulare* por Lobo (2016). Contudo para testar a hipótese de que o patógeno utiliza a produção de IAA para desencadear a doença em guaranazeiro seria necessário obter uma linhagem do fungo incapaz de produzir este hormônio, ou seja, uma linhagem *knockout* para os genes chaves da via de produção de auxina.

### 3. OBJETIVO GERAL

Analisar o processo de interação *Fusarium decemcellulare*-guaranazeiro e obter mutantes funcionais para genes da biossíntese de auxina (IAA), possivelmente envolvidos na patogenicidade e/ou virulência deste fungo, via sistema CRISPR/Cas9.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estabelecer um protocolo de transformação genética eficiente para *F. decemcellulare*;
- 2- Obter transformantes de *F. decemcellulare* expressando as proteínas fluorescentes GFP (*Green Fluorescent Protein*) e RFP (*Red Fluorescent Protein*);
- 3- Analisar o processo de germinação, penetração, infecção e colonização de *F. decemcellulare* nos diferentes tecidos de guaranazeiro (folhas, gemas vegetativas, gema floral, raque, caule e raiz);
- 4- Analisar a eficiência do vetor CRISPR/Cas9 construído para *F. decemcellulare* visando alta eficiência de recombinação homóloga (*knockout* gênico).
- 5- Obter linhagens transformantes do fungo *F. decemcellulare* com *knockout* simultâneo nos genes envolvidos na via da síntese de auxina (IAA).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Capítulo I: Transformação genética de *Fusarium decemcellulare* com proteínas fluorescentes GFP e RFP

#### 4.1.1 Microrganismos e Condições de Cultivo

Isolados de *F. decemcellulare* patogênico (*Fdc* 307) e não patogênico (CML 2370), obtidos respectivamente de hipertrofia floral de guaranazeiro e de serrapilheira, foram cultivados e utilizados nos experimentos para obtenção de protoplastos e transformação genética. Os isolados foram rotineiramente cultivados em meio BDA (10g/L dextrose, 16g/L agar e 250g/L batata) mantidos em incubadora a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas.

No preparo das suspensões de esporos para o processo de obtenção de protoplastos foi realizada a raspagem dos micélios aéreos de placas com cultivo dos isolados com 10 dias de crescimento e colocados em meio TB3 (200g/L de sacarose, 3g/L de peptona e 3g/L de extrato de levedura) e filtrados com gaze. Foram preparadas suspensões com 25 mL de meio TB3 a 10<sup>9</sup> esporos/mL. As suspensões de esporos foram transferidas para frascos com 250 mL de meio TB3 e colocados sob agitação constante a 120 rpm, a 25 °C durante cerca de 18 a 22h.

#### 4.1.2 Vetores utilizados na transformação genética de *Fusarium decemcellulare*

O vetor binário pPGW-Hyg-GFP foi utilizado para transformação via *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), composto pelo cassete formado pelas sequências do gene de resistência *hph* que codifica a higromicina B fosfotransferase (confere resistência ao antibiótico higromicina B) regulada pelo promotor *P<sub>trpC</sub>* de *Aspegillus nidulans*, e pela sequência do promotor *P<sub>toxA-5'UTR</sub>* de *Pyrenophora tritici-repentis* controlando o gene GFP e pela sequência terminadora *T<sub>nos</sub>*.

Já na transformação genética com PEG (polietilenoglicol) para evitar a linearização dos vetores pSC001 (GFP-higromicina) e pSC002 (DsRed-higromicina), optou-se pela amplificação dos cassetes contendo os genes repórteres *gfp* (*green fluorescent protein*) ou *DsRed* (RFP- *Red fluorescent protein*) controlados pelo *P<sub>trpC</sub>* e o gene de resistência *hph* controlado pelo *P<sub>toxA-5'UTR</sub>* (Figura 1). A amplificação ocorreu com a enzima Pfx50 DNA polimerase (*Thermo Fisher*) utilizando os *primers* T3 5'- GCAATTAACCCTCACTAAAG e T7s 5'- GTAATACGACGCACTATAG e como *template* os plasmídeos pSC001 e pSC002.

As reações de amplificação ocorreram com a adição de cerca de 25 ng dos vetores em reações separadas. As reações de PCR foram realizadas em volume de 50 µL, contendo 1,5 µL de cada *primer* (10 µM), 5 µL tampão 10X (Pfx50), 1,5 µL dNTP (0,8 mM), 1 U taq polimerase e água destilada. As condições de PCR foram as seguintes: 94 °C por 2 min. para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 15 seg., 66 °C por 30 seg. para anelamento dos *primers*,

68 °C por 1 min. para síntese, e extensão final de 68 °C por 5 min. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

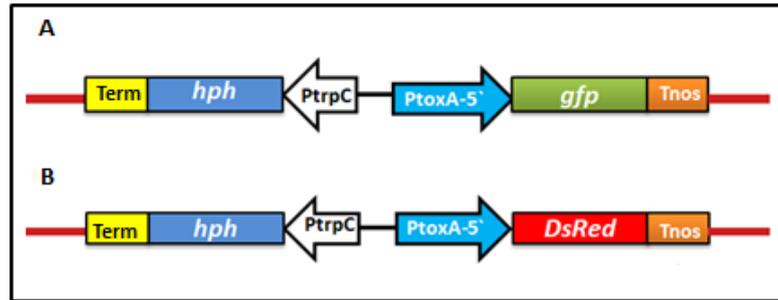


Figura 1: Esquema representando os cassetes amplificados dos vetores pSC001 e pSC002 para integração no genoma de *Fusarium decemcellulare*. Nos cassetes A e B: Em azul escuro o gene que confere resistência a higromicina (*hph*), sob o controle do promotor *PtrpC* de *A. nidulans*. No cassete A: em verde o gene *gfp* sob o controle de *PtoxA-5'* UTR de *P. tritici-repentis*, em azul claro. No cassete B: o gene *DsRed* em vermelho sob o controle também de *PtoxA-5'* UTR de *P. tritici-repentis*, em azul claro.

#### 4.1.3 Obtenção de Protoplastos

Na realização do processo para obter protoplastos foram utilizadas massas de micélios obtidas das suspensões de esporos crescidas durante 18 a 22 h dos dois isolados. As massas de micélios foram filtradas e lavadas com 100 mL de água destilada e em seguida lavadas com 20 mL de KCl 1,2 M. Posteriormente, 1g de cada um dos tecidos fúngicos foram ressuspensos em 25 mL de KCl 1,2 M contendo 500 mg de *Driselase* (D9515 - Sigma Aldrich) e 400 mg de enzima *Lysing Enzyme* (L1412 - Sigma Aldrich) separadamente, mantidos em agitação a 80 rpm a 30 °C durante 3 a 4 horas. O desenvolvimento dos protoplastos foi conferido microscopicamente. Após digestão total da massa micelial, foi realizada a filtração dos protoplastos em filtro de nylon estéril de 40 µm, removendo os fragmentos de hifas. Em seguida os protoplastos foram centrifugados a 3.200 rpm durante 10 min. descartado o sobrenadante cuidadosamente para que fosse adicionado 25 mL do tampão STC (940 mg/L de Sacarose, 10 mL/L de Tris-HCl (1 M pH 8,0), 50 mL/L de CaCl<sub>2</sub> 1 M), repetindo o processo de centrifugação e descarte do sobrenadante novamente. O *pellet* foi ressuspensado novamente em 1 mL de STC e transferido para um microtubo e centrifugado durante 5 min. a 5.000 rpm, para descarte do sobrenadante por pipetagem. E por fim, o *pellet* foi novamente ressuspensado em STC, misturado cuidadosamente e diluído para concentração de 10<sup>7</sup> protoplastos/mL.

#### 4.1.4 Transformação genética de *Fusarium decemcellulare* via ATMT

*Agrobacterium tumefaciens* linhagem AGL1 contendo vetor binário pPGW-Hyg-GFP foi utilizada conforme descrito por Zwiers *et al.* (2001), com algumas modificações. Neste trabalho foram testadas diferentes estratégias como transformação de microconídios e

protoplastos do isolado *Fdc* 307. Para obtenção de esporos foram colocados cubos de micélios em meio BD<sup>1</sup>/<sub>4</sub> e mantido sob agitação de 120 rpm, a 25 °C por 48 horas. A cultura de fungos foi filtrada com gaze estéril, lavada por duas vezes com H<sub>2</sub>O ultrapura autoclavada. Usando lâmina de Neubauer e microscópio óptico, os esporos foram contados e diluídos para concentração de 10<sup>6</sup> esporos/mL.

Linhagens de *A. tumefaciens* AGL-1 contendo vetor binário pPGW-Hyg-GFP foram cultivadas em meio LB-manitol líquido suplementado com 200 µg/mL de espectinomicina, 75 µg/mL de carbenicilina, incubadas sob agitação de 200 rpm, a 28 °C por 24 h. A cultura de bactérias foi centrifugada e descartado o sobrenadante para em seguida adicionar o meio mínimo – MM (K-buffer pH 6,8, CaCl<sub>2</sub> 1%, FeSO<sub>4</sub> 0,1%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 20%, M-N, Elemento de esporos, Glicerol 50%) e novamente incubada em 200 rpm, a 28 °C por mais 18 h. Posteriormente a cultura de bactérias foi centrifugada e ressuspensa em meio de indução - IM (K-buffer pH 6,8, CaCl<sub>2</sub> 1%, FeSO<sub>4</sub> 0,1%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 20%, M-N, Elemento de esporos, Glicerol 50%, MES 1M pH 4,8, Glicerol 20%, acetoseringona (AS) 200 µM) e mensurada a densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) no espectrofotômetro para observação do desenvolvimento das bactérias e posterior realização das diluições de 0,15 e 0,5. Aguardou-se cerca de ± 3 a 4 h para que a cultura de bactérias com OD 0,15 alcançasse OD de 0,18 e a OD de 0,5 alcançasse OD 0,6-0,8.

Esporos e protoplastos do fungo e a *Agrobacterium* foram co-cultivados na proporção de 1:1 (3 mL de esporos ou protoplastos do *Fdc* e 3 mL de cultura de *Agrobacterium*), e incubados a 22 °C em estufa tipo B.O.D. (*body oxygen demand*), durante 48 h e 96 h. Um total de 100 µL de co-cultivo foi espalhado em placas de petri contendo meio BDA (10 g/L de dextrose, 250 g/L de batata e 16 g/L de Ágar) suplementado com antibióticos (100 µg/mL higromicina-B e 400 µg/mL cefotaxina) para seleção de linhagens transformantes, em seguida mantidos a 25°C em B.O.D com fotoperíodo de 12 h até a possível visualização de micélios dos transformantes. O restante do co-cultivo foi centrifugado, descartado o IM e adicionado o mesmo volume (6 mL) de meio BD (10 g/L de dextrose e 250 g/L de batata), suplementado com 100 µg/mL higromicina-B e 400 µg/mL cefotaxina, dividindo em 3 alíquotas de 2 mL cada, mantidos em agitação (150 rpm) a 25 °C até a possível visualização de crescimento de micélios.

#### **4.1.5 Transformação genética de *Fusarium decemcellulare* via PEG**

O isolado *Fdc* 307 foi transformado com os cassetes contendo GFP-higromicina (GFP-Hyg) e *DsRed*-higromicina (RFP-Hyg) e CML 2370 foi transformado apenas com GFP-Hyg.

A transformação genética foi realizada com 100 µL da suspensão de 10<sup>7</sup> protoplastos/mL adicionados em cada tubo, juntamente com 90 µL de STC e 10 µL (15 a 20 µg) do cassete amplificado por PCR. Como controle negativo foi utilizado água no lugar do DNA. O conteúdo de cada tubo foi misturado cuidadosamente e incubado a temperatura ambiente por 20 min. Após este período foi adicionado 1 mL da solução de PEG 8000 40% em cada um dos tubos, misturado e incubado a temperatura ambiente por mais 20 min. Em seguida foi acrescentado 5 mL de meio de cultura TB3 líquido aos tubos e colocados sob agitação de 80 rpm em overnight.

Após o período de incubação foi iniciado o processo de seleção dos possíveis transformantes. Foram vertidos cerca de 2,5 mL da suspensão deixada em overnight em 50 mL de meio seletivo TB3 semi-sólido (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona, 200 g/L de sacarose e 4 g/L de Ágar) acrescido de 100 mg/mL do antibiótico higromicina B. Aguardou-se o desenvolvimento dos transformantes por cerca de 3 dias. Após o surgimento das colônias no meio seletivo foi realizada a repicagem das colônias e o preparo de cultura monospórica.

#### 4.1.6 Caracterização dos Transformantes de *Fusarium decemcellulare*

##### 4.1.6.1 Isolamento de DNA e análise dos transformantes por PCR

Os isolados monospóricos (selvagens e mutantes) foram inoculados em meio BD crescidos sob agitação constante, a 25 °C. A extração do DNA total de *F. decemcellulare* foi realizada de acordo com o método de CTAB (Doyle & Doyle, 1990). Em seguida, foi tratado com RNase (Invitrogen) e submetido a quantificação em NANODROP e gel de agarose a 0,8%. A confirmação dos possíveis transformantes foi realizada pela detecção do gene de resistência a higromicina-B presente em ambas as construções utilizadas neste trabalho. A confirmação da presença do gene de resistência *hph* no genoma dos possíveis transformantes foi determinada por PCR, empregando o par de oligonucleotídeos *hph* – *primer forward* – 5' TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT 3' e *primer reverse* – 5' CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG 3'. Foi confirmado também a presença dos genes repórteres *gfp* e *DsRed* nos transformantes por meio de PCR com os *primers* para *gfp forward* - 5' ACGTAAACGGCCACAAGT 3' e *reverse* – 5' TGCTCAGGTAGTGGTTGT 3', e *DsRed forward* – 5' TACAGGAACAGGTGGTGGCG 3' e *reverse* – 5' ATGGCCTCCTCCGAGGACG 3'. A reação de amplificação ocorreu com a adição de cerca de 50 ng de DNA total dos transformantes e do fungo selvagem (controle). As reações foram realizadas em volume final de 15 µL, contendo 1 µL de *primers forward* e *reverse* (0,3 µM) específico para o gene de interesse, 1,5 µL tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris -HCl pH 8,4; 1% Triton X-100), 1,2 µL MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 1,6 µL dNTP (0,8 mM), 1U de enzima DNA

polimerase (Phoentria) e água destilada. As condições de PCR foram as seguintes: 94 °C por 3 min. para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 seg., 66 °C (*hph*) e 60 °C (*gfp* e *DsRed*) por 30 seg. para anelamento dos *primers*, 72 °C por 1 min. para síntese e extensão final de 72 °C por 10 min. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

#### **4.1.6.2 Teste de estabilidade mitótica**

A análise de estabilidade mitótica dos transformantes foi realizada por meio da propagação por cinco repicagens sucessivas em meio de cultura BDA sem antibiótico. E então transferidas novamente para meio com agente seletivo (antibiótico higromicina-B).

#### **4.1.6.3 Detecção da proteína repórter GFP e RFP por microscopia de fluorescência**

O microscópio de fluorescência Axio Imager M2 (Zeiss) foi utilizado para detecção das proteínas fluorescentes GFP e RFP nas linhagens transformadas. As imagens foram feitas a partir de micélios, macroconídios e microconídios. O isolado selvagem foi utilizado como controle negativo.

#### **4.1.6.4 Análise do crescimento vegetativo e germinação de esporos**

As linhagens transformantes a serem utilizadas no processo de interação patógeno-hospedeiro foram selecionadas com base em aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e à esporulação. Para isto, foram realizadas comparações das colônias do selvagem com a dos transformantes que apresentaram estabilidade mitótica. Discos de micélios (mesmo tamanho) foram colocados em placas de Petri com BDA suplementado com higromicina-B (100 mg/mL) e mantidos em incubadora a 25°C. Após 7 dias de cultivo, o crescimento vegetativo dos transformantes foi comparado ao selvagem quanto a forma e tamanho radial das colônias, produção de micélios aéreos e pigmentação. No processo de avaliação de germinação dos transformantes, foram preparadas suspensões de esporos e analisado o tempo de germinação durante 8 h de cultivo em meio BD, a 25 °C sob agitação constante a 120 rpm, e a cada 2 h foram visualizados no microscópio eletrônico a laser confocal e de fluorescência LSM780 (Zeiss).

#### **4.1.6.5 Teste de Patogenicidade**

O teste de patogenicidade foi realizado em mudas de tomateiro – *Lycopersicon esculentum* Mill. (variedade Yoshimatsu). As plantas foram inoculadas com a linhagem selvagem de *Fdc* e linhagens transformantes com GFP e RFP. O experimento foi realizado em triplicata para cada tratamento e repetido por três vezes em diferentes períodos do ano. As

mudas de tomate foram cultivadas em câmara de crescimento (Fitotron), com temperatura ambiente de 26 °C por 12 h com iluminação e a 22 °C por 12 h sem iluminação, com 60% de umidade.

A inoculação foi realizada de forma pontual nas axilas das folhas em plantas com cerca de 25-30 cm de comprimento, por meio da aplicação de 20 µL de suspensão de esporos no tecido injuriado com agulha. Foram utilizadas suspensões de esporos na concentração de 10<sup>6</sup> esporos/mL de cada linhagem de *Fdc* (selvagem, linhagem expressando GFP e expressando RFP). No tratamento das amostras controle foi realizado procedimento semelhante, utilizando água estéril na inoculação.

Após 72h, 5 e 30 dias da inoculação, tecidos dos pontos inoculados e de regiões adjacentes aos pontos inoculados foram analisados por meio de microscopia eletrônica confocal e fluorescência, conforme descrito no item 4.1.6.6.

Além de analisar o processo de colonização foi observada também a ocorrência de sintomas internos e externos no decorrer de 30 dias da inoculação (tabela 1), característicos aos sintomas causados pelo *Fdc* em guaranazeiro e outras espécies de plantas.

Tabela 1: Sintomas internos e externos analisados em tecidos de tomateiro causados por *F. decemcellulare*, durante 30 dias.

ITEM	SINTOMAS INTERNOS	SINTOMAS EXTERNOS
1	Sem sintomas	Sem sintomas
2	Escurecimento localizado no ponto da inoculação	Superbrotamento de ramos foliares
3	Escurecimento atingindo pontos fora da inoculação	Desenvolvimento acelerado dos novos ramos foliares
4	Necrose vascular	Acúmulo de nódulos no caule
5	-----	Encurtamento de entrenós
6	-----	Produção de flores e frutos
7	-----	Secagem dos ramos foliares
8	-----	Morte da planta

Depois das análises dos sintomas foi realizado o isolamento das linhagens inoculadas para confirmação do Postulados de Koch. O procedimento ocorreu com o corte de pequenos fragmentos ao longo das mudas de tomate, seguido da assepsia das superfícies dos fragmentos e o cultivo em meio ágar-água e posterior transferência dos isolados para o meio de cultura

BDA para isolamento da linhagem selvagem e em meio BDA suplementado com higromicina B (100 µg/µL) para isolamento das linhagens transformantes com GFP e RFP.

#### **4.1.6.6 Microscopia Eletrônica a Laser Confocal e Fluorescência**

Fragmentos de diferentes pontos ao longo do caule das mudas de tomateiro foram analisados com 72h, 5 e 30 dias após inoculação (DAI), por meio da microscopia confocal e fluorescência. Os cortes dos fragmentos foram realizados nos tecidos inoculados sem a necessidade de prévio tratamento ou processamento das amostras. A captura e visualização das amostras em microscópio confocal e de fluorescência foram realizadas utilizando microscópio confocal Leica TCS SP8 do Laboratório do Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABIO) da Universidade do Estado do Amazonas - UEA.

## **4.2 Capítulo II: Análise do processo de germinação á infecção de *Fusarium decemcellulare* em guaranazeiro causando Superbrotamento e sintomas semelhantes a Dieback.**

Tecidos de mudas de guaranazeiro (folhas, raque, gemas vegetativas, caule e raiz) genótipo CMU 300 foram inoculados com o isolado *F. decemcellulare* 307 (*Fdc* 307), utilizando tanto o isolado selvagem, quanto a linhagem de *Fdc* 307 transformada geneticamente com a proteína repórter RFP e a marca de seleção ao antibiótico higromicina B (RFP-Hyg) (ver capítulo 1). Além das mudas de guaranazeiro, tecidos de plantas adultas sintomáticas obtidas em condições naturais no campo também foram analisados.

As inoculações das mudas de guaranazeiro para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no laboratório de biologia molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, no Km 29 da Rodovia AM-010, Manaus-AM; na casa de vegetação do departamento de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA; e em câmara vegetal do departamento de fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas as inoculações com a linhagem transformada com RFP-Hyg para análise por meio da Microscopia Eletrônica Confocal e de fluorescência.

### **4.2.1 Material vegetal e preparo do isolado de *Fusarium decemcellulare***

As mudas foram cultivadas em vasos contendo mistura de terra e areia estéril até atingirem cerca de 40 a 50 cm de altura para realização do processo de inoculação.

As suspensões de esporos (*Fdc* 307 selvagem e linhagem com RFP) para inoculação foram preparadas por meio da raspagem dos micélios aéreos (placas de cultivo de 10 dias de crescimento), com adição de 5 mL de água estéril e posterior filtragem em gaze estéril, obtendo uma suspensão de micro e macroconídios na concentração de 10<sup>6</sup> esporos/mL.

#### **4.2.2 Análise da germinação, penetração e colonização de *F. decemcellulare* por meio de microscopia eletrônica**

A inoculação para observar o processo de germinação foi realizada de forma pontual em folíolos das mudas de guaranazeiro nas superfícies adaxial e abaxial separadamente, sem e com injúrias geradas com agulha. Para análise do processo de penetração, colonização e infecção a inoculação foi realizada em diferentes tecidos (raque, gemas vegetativas, caule e raiz), também de forma pontual injuriados artificialmente. Foram depositados nos pontos das inoculações 20 µL da suspensão de micro e macroconídios ( $10^6$  esporos/mL).

Após a inoculação foram coletados os fragmentos foliares com cerca de 1 cm<sup>2</sup> para análise do processo de germinação em diferentes períodos (6, 12, 24 e 48 horas após inoculação (HAI), observados por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura. Para a análise do processo de penetração e colonização foram coletados os fragmentos com 4, 15, 25 e 45 dias após inoculação (DAI) pontual, observados por meio de MEV e microscopia eletrônica confocal.

#### **4.2.3 Análise da distribuição sistêmica de *F. decemcellulare* em mudas de guaranazeiro**

Os experimentos foram realizados em blocos casualizados e em triplicata para cada tratamento (folha, raque, gemas vegetativas, caule e raiz) em mudas do clone CMU 300 por meio de inoculação do isolado *Fdc* 307.

As análises foram realizadas após 45 e 120 dias da inoculação. A partir dos pontos de inoculação foi avaliado toda a extensão de 3 cm a montante e a jusante com base em fragmentos de 2 mm. Além desta região, toda a planta foi avaliada a cada 2 cm.

Os fragmentos obtidos destes pontos foram submetidos ao processo de isolamento do *F. decemcellulare*, no qual os fragmentos passaram por assepsia em etanol a 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio 0,5% por 1 minuto e lavagem por três vezes em água destilada. Em seguida, plaqueados em Ágar-Água, incubados a 25°C com fotoperíodo de 12 h e as placas foram verificadas em intervalos de 48 h. Os isolados com características morfológicas de *Fdc* foram transferidos para BDA e confirmados com base na pigmentação da colônia, formação de micélio aéreo e produção de macro e microconídio.

#### **4.2.4 Análise das plantas com sintomas de Dieback**

Após 45 dias da inoculação foram realizadas análises dos sintomas nas mudas, conforme item 4.2.3, que apresentaram sintomas semelhantes à doença de Dieback, observados nos tecidos tanto externos, quanto internos. Os sintomas externos avaliados foram: 1- quanto ao escurecimento de parte da folha apical; 2- a presença de manchas que se iniciam marrons progredindo ao enegrecimento nos pecíolos e peciólulos; e 3- a progressão dos sintomas de secagem das hastes e folhas até a morte da planta. Para analisar a presença dos sintomas internos

foram realizados cortes longitudinais e transversais nos pontos inoculados e não inoculados, com ou sem sintomas externos, sendo avaliada a presença de manchas internas castanho-claro a escuro; quais os tecidos afetados; e a presença do patógeno, examinados microscopicamente por meio de MEV.

#### **4.2.5 Análise de tecidos com sintomas de superbrotamento**

Como os sintomas de superbrotamento não foram observados nas condições de inoculação artificial realizadas em mudas, então foram coletados tecidos sintomáticos em plantas adultas naturalmente infectadas em campo e analisados os sintomas de superbrotamento de gema vegetativa e inflorescências.

Gemas vegetativas, gemas florais sintomáticas e fragmentos com cerca de 1 cm das hastes dos ramos com sintoma foram cortados de forma longitudinal e transversal para observação dos sintomas internos macroscopicamente visíveis (manchas, lesões necróticas e ressecamento) e para análise por meio de MEV com objetivo de averiguação dos tecidos lesionados e observação da presença do patógeno.

Fragmentos destes mesmos tecidos analisados também foram utilizados no processo de isolamento, conforme descrito no item 4.2.3.

#### **4.2.6 Análises morfológicas e filogenéticas**

Os isolados obtidos dos tecidos analisados no item 4.2.5 foram submetidos à caracterização morfológica e molecular para confirmar a identidade da linhagem fúngica recuperada de tecidos vegetais de plantas de guaranazeiros sintomáticos.

As características macromorfológicas e micromorfológicas foram observadas no meio BDA, após 10 a 14 dias de incubação a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Foram analisados aspectos como, formato da colônia, a presença e coloração do esporodóquio, tamanho, forma e formação de microconídios e macroconídios, conforme descrito por Leslie e Summerell (2006). Os isolados foram cultivados em meio líquido BD por 3 dias a 130 rpm a 25 °C para extração de DNA, realizada utilizando o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987).

A amplificação por PCR da sequência parcial do fator de alongação *I- $\alpha$*  (*EF 1 $\alpha$* ) e da região ITS1/ITS2 foram amplificadas usando os respectivos *primers* EF1/ EF2 (O'Donnell et al., 1998) e ITS1/ITS4 (O'Donnell & Cigelnik, 1997). Os fragmentos gênicos foram purificados usando o kit *BigDye*® Terminator v3.1 e sequenciados em um sequenciador 3500 *Genetic Analyser*.

Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 6

(Tamura et al., 2013). As análises filogenéticas do gênero *Fusarium* foram obtidas por meio da análise concatenada dos dois *locus* pelos métodos de Máxima Likelihood (ML) e por Máxima Parcimônia (MP), e os ramos internos foram avaliados com 1000 repetições de *bootstrap*.

#### **4.2.7 Análise histológica**

Para análise microscópica o material vegetal foi fixado em FAA por até 48 horas e logo após, transferido para etanol 50% por 30 minutos para fragmentos mais finos e de 4-8 horas para fragmentos mais grossos. A desidratação do material foi realizada através de série etanol-butanol (50, 70, 85, 100 e 100%) por 1, 2 e 4 horas respectivamente. Em seguida, o material foi transferido para butanol-clorofórmio (3:1) e incluído em parafina a 55-60 °C. O material devidamente infiltrado foi colocado em um molde de papel formando um pequeno bloco que foi seccionado em micrótomo em secções longitudinais e transversais (10-18 µm). As lâminas contendo os cortes foram transferidas para xilol, para a retirada da parafina, logo após em uma série etílica decrescente (100, 95, 70, 50 e 30%) por 3 minutos cada etapa, coradas com o corante azul de toluidina, por uma série etílica crescente e por último, novamente em xilol. As lâminas permanentes foram montadas com Bálsamo do Canadá.

Cortes histológicos a mão livre foram feitos nos tecidos vegetais e lâminas foram preparadas com corante Lactofenol Azul de Algodão para a observação da colonização do patógeno. O material foi analisado e fotografado utilizando microscópio óptico Zeiss Axio Imager M.2 acoplado à câmera digital AxioCam MRc.

#### **4.2.8 Preparo das Amostras para Análise de Microscopia Eletrônica**

##### **4.2.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Os fragmentos obtidos para análise da germinação (6, 12, 24 e 48 HAI), penetração, colonização, infecção causando sintomas semelhantes à Dieback (4 e 45 DAI) e causando superbrotamento (tecidos sintomáticos de plantas adultas) foram transferidos para microtubos contendo solução de fixação glutaraldeído (3%) e armazenados a 4°C. Após a fixação, o material foi processado realizando uma série de três lavagens com água por 5 min. cada e em seguida outra série de lavagem com álcool de 50, 70, 90, 95% e 100% por 10 minutos cada, e depois mantidos em etanol a 100% garantindo a total desidratação do material. O material foi seco em ponto crítico usando CO<sub>2</sub> líquido no aparelho Bal Tec modelo CPD 030. Os fragmentos secos foram fixados em suportes metálicos e pulverizados com ouro. Finalmente, os fragmentos foram observados em MEV do laboratório Multidisciplinar de Microscopia Eletrônica do INPA – LMME/INPA.

#### 4.2.8.2 Microscopia Eletrônica a Laser Confocal e de Fluorescência

Fragmentos dos diferentes tecidos das mudas de guaranazeiro (gema, raque, caule e raiz) foram analisados com 4, 15 e 25 dias após inoculação, por meio da microscopia confocal, sendo realizados cortes nos tecidos inoculados sem a necessidade de prévio tratamento ou processamento das amostras. Para captura e visualização das amostras em microscópio de fluorescência foi utilizado o microscópio invertido confocal a laser LSM780 (Zeiss) do laboratório Multidisciplinar de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras/MG – LME/UFLA – Departamento de Fitopatologia.

### 4.3 Capítulo III: Obtenção de mutantes para genes relacionados à patogenicidade de *Fusarium decemcellulare* por meio de CRISPR/Cas9.

#### 4.3.1 Construção dos cassetes e modificações dos vetores para o sistema CRISPR/Cas9

As regiões que flanqueiam os genes da monooxigenase (*yucca*) e indol-acetaldeído desidrogenase (*aldh*) de *F. decemcellulare* (*Fdc* 307) foram identificadas no genoma e utilizadas na construção dos cassetes para recombinação homóloga. Estes genes expressam enzimas envolvidas em duas prováveis vias de síntese de auxina identificadas no genoma de *F. decemcellulare* (*Fdc* 307) (Figura 1).

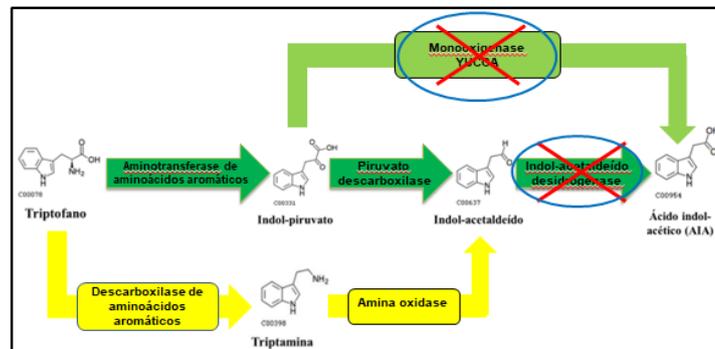


Figura 1: Duas prováveis vias de síntese de auxina identificadas no genoma de *Fusarium decemcellulare*. ■ Via do indol- acetaldeído, ■ Via da triptamina, ■ enzima YUCCA (desvio da via do indol acetaldeído). Fonte: Lobo, 2016.

A partir da identificação das sequências flanqueadoras 5' e 3' de cada gene, com base no genoma do isolado *Fdc* 307 foram montados três cassetes, um para cada cópia do gene que codifica a enzima Indol-acetaldeído desidrogenase (presentes no cromossomo 2 e 9) e outra para *yucca*. As sequências necessárias para construção de cada cassette (5' + Hyg + 3') foram amplificadas utilizando os *primers* (Tabela 1) desenhados no *NEBuilder Assembly Tool*. As regiões flanqueadoras 5', 3' e o gene que confere resistência a higromicina B obtidas via PCR foram clonadas no vetor pGEM (Figura 2) para formação dos cassetes por meio do *Gibson Assembly® Cloning Kit*, seguindo as recomendações do fabricante.

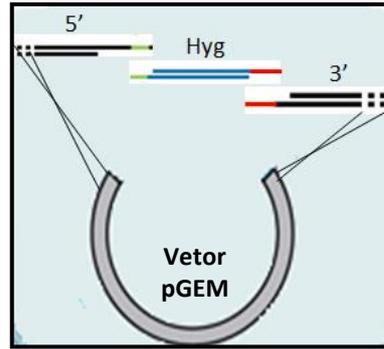


Figura 2: Representação esquemática da montagem do cassete para recombinação homóloga, contendo três sequências utilizadas para ligação no vetor pGEM. Sequências 5' e 3' das regiões que flanqueiam os genes monooxigenase (*yucca*) e indol-acetaldeído desidrogenase (*aldh*), intercaladas pelo gene que confere resistência a Higromicina-B.

Os cassetes clonados ao pGEM foram amplificados via PCR para utilização no processo de transformação genética, utilizando a enzima DNA polimerase *Platinum High Fidelity* (Invitrogen), os *primers* foram os mesmos *primers forward* (*indol 9 5' F*, *indol 2 5' F* e *yucca 5' F*) utilizados para amplificação da sequência flanqueadora 5' e os mesmos *primers reverse* (*indol 9 3' R*, *indol 2 3' R* e *yucca 3' R*) utilizados para amplificação da sequência 3' (Tabela 1), nas seguintes condições: as reações de PCR foram realizadas com a adição de cerca de 25 ng dos vetores em reações separadas em volume final de 50  $\mu$ L, contendo 1,0  $\mu$ L dos *primers forward* e *reverse* (0,5  $\mu$ M), 10  $\mu$ L de tampão 10X (600 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8,9), 180 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2,0  $\mu$ L dNTP (10 mM), 2,0  $\mu$ L MgSO<sub>4</sub> (50 mM), 1 U da enzima DNA polimerase “*Platinum High Fidelity*” e água destilada. As condições de PCR foram de 98 °C por 2 min. para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos a 98 °C por 30 seg., 60 °C por 30 seg. para anelamento dos *primers*, 72°C por 5 min. para síntese e extensão final de 72°C por 5 min. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Foram gerados amplicons para recombinação homóloga contendo o gene da higromicina com as regiões flanqueadoras do gene alvo, *aldh 9*, *aldh 2* e *yucca* com 4.165 pb, 5.366 pb e 5.078 pb respectivamente (Figura 3A, B e C).

A construção do vetor para expressão de CRISPR-Cas9-sgRNA foi realizada a partir da modificação do vetor pCRISPR/Cas-U6-1, que foi gentilmente doado por Arazoe e colaboradores. Para utilização em *F. decemcellulare* foi substituído o promotor da RNA polimerase III (U6-1) de *Pyricularia oryzae* pelo promotor específico da RNA polimerase III de *F. decemcellulare*, gerando o vetor pFDC-U6-CRISPR/Cas9 (Figura 4). Os RNAs guias para cada gene alvo, *aldh 9* (sgRNA *indol 9*), *monooxigenase yucca* (sgRNA *yucca*), *aldh 2* (sgRNA *indol 2*) (Tabela 1), foram desenhados por meio do *software* sgRNACas9 (<https://sourceforge.net/projects/sgrnacas9/>) e depois clonados no plasmídeo FDC-U6-

CRISPR/Cas9 conforme Arazoe et al. (2015), gerando três diferentes vetores de expressão Cas9-sgRNA.

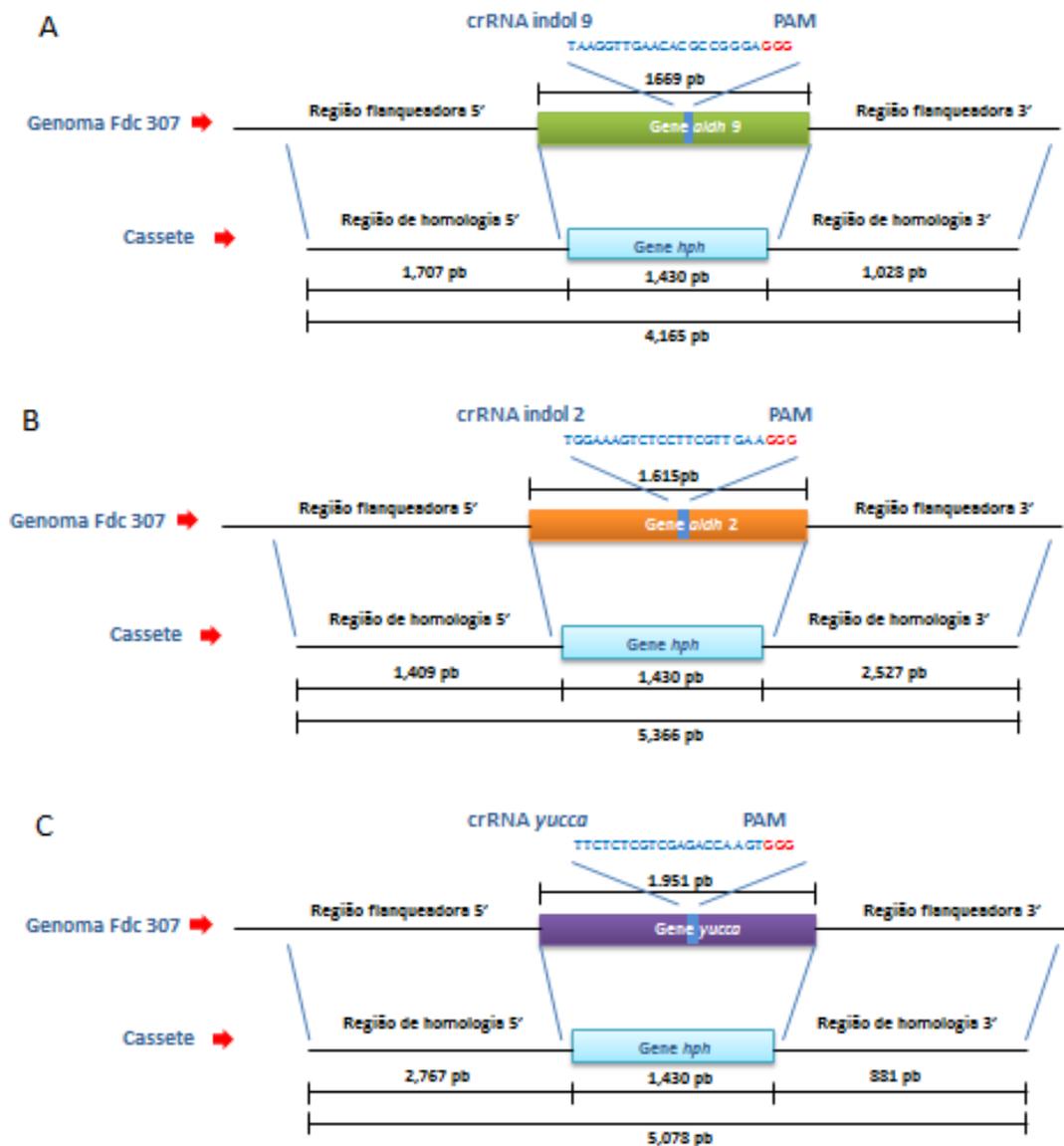


Figura 3: Visão geral esquemática da estratégia de substituição de genes. Em A: cassete para recombinar nas sequências flanqueadoras do gene *aldh 9* (em verde), substituindo o gene alvo pelo gene *hph*; B: cassete para recombinar nas sequências flanqueadoras do gene *aldh 2* (em laranja), substituindo o gene alvo pelo gene *hph*; C: cassete para recombinar nas sequências flanqueadoras do gene *yucca* (em lilás), substituindo o gene alvo pelo gene *hph*. Em letras vermelhas a PAM (*Protospacer-Adjacent Motif*) e em azul a sequência do RNA guia (crRNA).

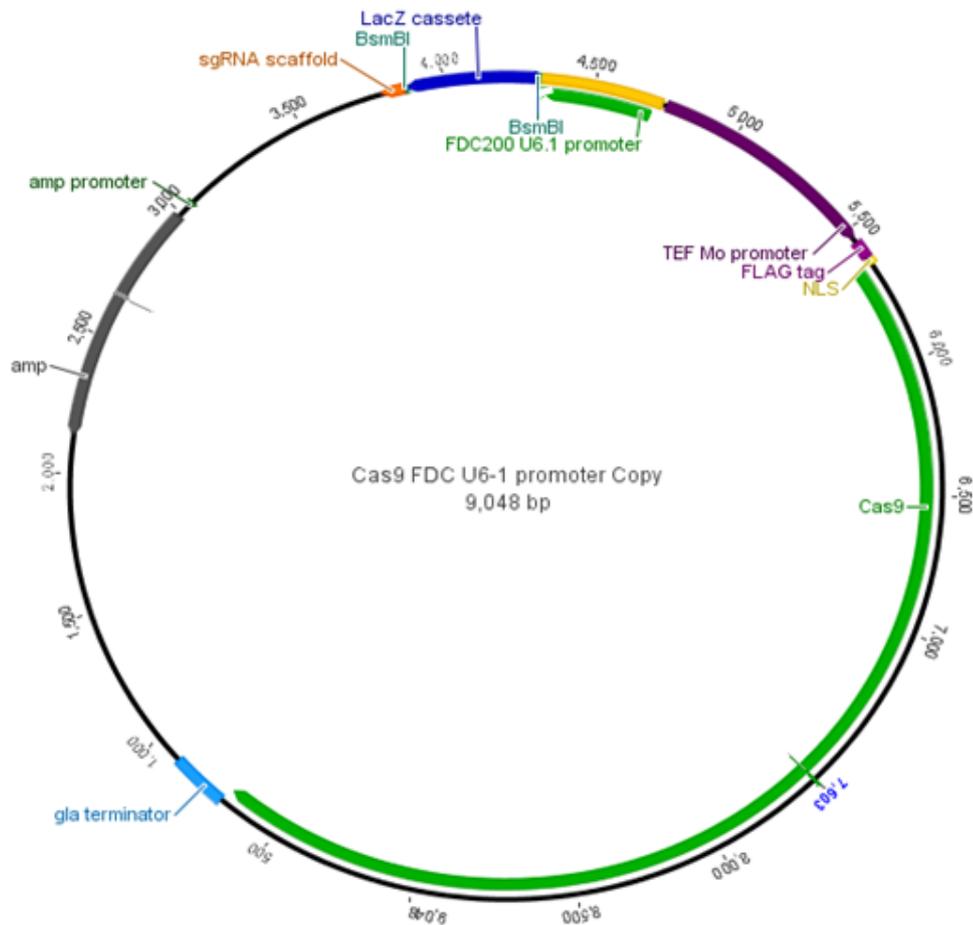


Figura 4: Mapa do vetor pFDC-U6-CRISPR/Cas9. Gene da CAS 9 controlado pelo promotor TEF e o sgRNA controlado pelo promotor U6-1 específico do *Fusarium decemcellulare*.

#### 4.3.2 Cultivo, obtenção de protoplastos e transformação genética de *Fusarium decemcellulare*

As condições de cultivo do *Fdc* 307, o preparo de protoplastos e a transformação genética foram realizados adotando os procedimentos descritos no capítulo I, com algumas modificações. Inicialmente para obter linhagens transformantes com *knockout* em apenas um único gene foram realizados processos de transformação genética separadamente para cada gene de interesse, sendo utilizados 10  $\mu$ L de reação do cassete obtido por PCR (conforme item 4.3.1) na concentração de 15-20  $\mu$ g e 10  $\mu$ L do vetor de expressão pFDC-U6-CRISPR/Cas9 na concentração de 1  $\mu$ g. Para obtenção de linhagens mutantes com *knockout* nos três genes simultaneamente (triplo *knockout*) foi utilizada a seguinte estratégia no processo de transformação: 10  $\mu$ L de reação (conforme item 4.3.1), porém neste caso foi necessário realizar as reações para cada gene separadamente e posteriormente misturou-se os três cassetes na concentração final de 15-20  $\mu$ g obtidos via PCR, juntamente com 10  $\mu$ L dos três vetores pFDC-U6-CRISPR/Cas9-sgRNAs na concentração total de 1  $\mu$ g, misturando-os aos protoplastos.

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos e crRNAs

\*Fw: Forward ; Rv: Reverse

<i>Primers</i>		<i>Sequências</i>	<i>Tamanho amplicon (pb)</i>
Flanq. 5' indol 9	Fw Rv	5' ggccgccatggccgcgggatAAGCTCAACATTTTTCTTTTTTC 3' 5' ccgggaaccaAGATAGATGTTGACTTGGG 3'	1.707
Hyg - indol 9	Fw Rv	5' acatctatctTGGTTCCCGGTCGGCATC 3' 5' tgttattaagCAATCGATACCGTCGACGTTAACTG 3'	1.430
Flanq. 3' indol 9	Fw Rv	5' gtatcgattgCTTAATAACAAGGAGAGTAGATGTTGGG 3' 5' caggcggccgactagtagctTTGGGTCGGCGAGATGG 3'	1.028
Flanq. 5' yucca	Fw Rv	5'ggccgccatggccgcgggatGTTGTTATTGTAGTTGTGTGAAATC 3' 5' ccgggaaccaGTACGAGGGGACTGATGAC 3'	2.767
Hyg - yucca	Fw Rv	5' ccctctgtacTGGTTCCCGGTCGGCATC 3' 5' ctgggcaagtCAATCGATACCGTCGACGTTAACTG 3'	1.430
Flanq. 3' yucca	Fw Rv	5' gtatcgattgACTTGCCCAGGCACAAAG 3' 5' caggcggccgactagtagctGGTAGGGAAGTGATAGTGATG 3'	881
Flanq. 5' indol 2	Fw Rv	5' ggccgccatggccgcgggatCTCGAAACCTGTTCCCCG 3' 5' ccgggaaccaGTCAAGAAAAGGAAAGCGAAATG 3'	1.409
Hyg - indol 2	Fw Rv	5' tttcttgacTGGTTCCCGGTCGGCATC 3' 5' accagtcacaCAATCGATACCGTCGACGTTAACTG 3'	1430
Flanq. 3' indol 2	Fw Rv	5' gtatcgattgTGTGACTGGTATATGGGATG 3' 5' caggcggccgactagtagctTTTCGGGTCAGGAACACAC 3'	2.527
sgRNA indol 9	Fw Rv	5' TTCGTAAGGTTGAACACGCCGGGAGGG 3' 5' AAACCCCTCCCGGCGTGTTC AACCTTA 3'	23 +PAM
sgRNA Yucca	Fw Rv	5' TTCGTTCTCTCGTCGAGACCAAGTGGG 3' 5' AAACCCCACTTGGTCTCGACGAGAGAA 3'	23 +PAM
sgRNA indol 2	Fw Rv	5' TTCGTGGAAGTCTCCTCGTTGAAGGG 3' 5' AAACCCCTTCAACGAGGAGACTTTCCA 3'	23 +PAM
hph - higromicina	Fw Rv	5' TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT 3' 5' CGCGTCTGCTGCTCCATAACAAG	590
Indol 9 -PCR confirm.	Fw Rv	5' CTGACCGTGGTTGTAGTAGATG 3' 5' AATACCGCAGACAGGCAAT 3'	588
Yucca - PCR confirm.	Fw Rv	5' ACGACCCTGTCTGGTATGA 3' 5' CTGAACGATGGTGA CTGGTAG 3'	461
Indol 2 -PCR confirm.	Fw Rv	5' CTCCTGCTCATCCTTGA ACTT 3' 5' CGTTGACAAGATTGCCTTCAC 3'	537

### 4.3.3 Caracterização das linhagens *knockout*

#### 4.3.3.1 Isolamento de DNA e análise de transformantes via PCR

O isolado selvagem e os transformantes obtidos foram cultivados em meio BD sob agitação de 120 rpm por sete dias para obtenção de massa micelial. A extração de DNA total foi realizada de acordo com o método de CTAB (Doyle & Doyle, 1990). Em seguida, foram tratados com RNase (Invitrogen) e submetido a quantificação em nanodrop e gel de agarose a 0,8%. A confirmação dos possíveis transformantes foi realizada pela detecção do gene de resistência a higromicina no genoma via PCR, empregando o par de oligonucleotídeos *hph* (Tabela 1), gerando um amplicon de 590 pb. Além da confirmação do gene de resistência foram utilizados também pares de oligonucleotídeos para confirmar via PCR e posteriormente por sequenciamento, se houve *knockout* nos genes alvo, sendo utilizados os seguintes pares de oligonucleotídeos: indol 9 - PCR, yucca PCR e indol 2 - PCR, que geraram amplicons de 588 pb, 461 pb e 537 pb respectivamente (Tabela 1).

As reações de amplificação ocorreram com a adição de cerca de 50 ng de DNA total dos transformantes e do fungo selvagem (controle) realizadas em volume final de 25 µL, contendo 1 µL de *primers forward* e *reverse* (0,3 µM) específico para o gene de interesse, 2,5 µL tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris -HCl pH 8,4; 1% Triton X-100); 1,0 µL MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 1,0 µL dNTP (10 mM), 1U de enzima DNA polimerase (Phoneutria) e água. As condições de PCR foram as seguintes: 94 °C por 3 min. para desnaturação inicial, seguindo de 30 ciclos a 94 °C por 30 seg., 60 °C para todos os genes por 30 seg. para anelamento dos *primers*, 72 °C por 1 min. para síntese e extensão final de 72 °C por 5 min. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

#### 4.3.3.2 Sequenciamento

As linhagens transformantes que não apresentaram silenciamento gênico por meio de recombinação homóloga no processo realizado para obtenção de triplo *knockout* foram analisadas via sequenciamento das regiões onde estavam localizados os sgRNAs, a fim de verificar a ocorrência de mutações indel. A reação de amplificação via PCR foi realizada conforme item 4.3.3.1 e os *primers* utilizados foram os mesmos empregados para confirmação de *knockout* nos genes alvo. A reação de sequenciamento foi realizada usando o kit *Big Dye Terminator* (v3.1) da *Thermo Fisher Scientific*, seguido de purificação para precipitação das reações de sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi realizado no Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

#### 4.3.3.3 Teste de estabilidade mitótica

A análise de estabilidade mitótica das linhagens transformantes com *knockout* gênico foi realizada com a repicagem em meio de cultura BDA sem antibiótico a partir de culturas monospóricas por cinco repicagens, e então foram transferidas novamente para meio com agente seletivo (*hph*).

#### 4.3.3.4 Análise morfofisiológica das linhagens transformantes

As análises foram realizadas colocando pequenos discos de micélios (todos com mesmo tamanho) em placas de Petri com BDA suplementado com antibiótico higromicina-B (100 µg/mL), obtidos após teste de estabilidade mitótica. Após 7 dias de cultivo, o crescimento vegetativo dos transformantes foi analisado quanto à influência do *knockout*, por meio de comparações ao selvagem quanto a forma e tamanho radial das colônias, a produção de micélios aéreos e pigmentação.

Foi avaliada também a esporulação, utilizando pequenos discos de micélios dos transformantes e do selvagem (controle). Estes foram colocados em frascos contendo 50 mL de BD<sup>1/4</sup> suplementado com higromicina, e mantidos a 25 °C sob agitação a 150 rpm, durante 3-7 dias. As soluções com micélio e esporos foram filtradas com gaze estéril para que fosse obtida uma suspensão de esporos, os quais foram contados e visualizados no microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer. Os procedimentos foram realizados em triplicata.

No processo de avaliação da germinação dos transformantes, foram preparadas suspensões de esporos e analisado o tempo de germinação durante 8 h de cultivo em meio BD, a 25 °C sob agitação constante a 120 rpm.

## CAPÍTULO I

### TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Fusarium decemcellulare* COM PROTEÍNAS FLUORESCENTES GFP E DsRed

## 5. Capítulo I: Transformação genética de *Fusarium decemcellulare* com proteínas fluorescentes GFP e RFP.

### 5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1.1 Transformação genética de *Fusarium decemcellulare* via ATMT

Após inúmeras tentativas, nenhum transformante de *F. decemcellulare* foi obtido por ATMT a partir de micélios, conídios e até mesmo com o uso de protoplastos. Para confirmar que o insucesso do método estava relacionado a alguma característica ainda não conhecida de *Fdc*, e não a construção e reagentes utilizados, o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* foi utilizado como controle e transformado com sucesso.

#### 5.1.2 Protoplastos de *Fusarium decemcellulare*

A obtenção de protoplastos dos isolados *Fdc* 307 e CML 2370 e os ajustes no protocolo foram a parte inicial do processo para realização da transformação genética por PEG. Etapa que, conforme Peberdy et al. (1976) vários fatores podem influenciar na obtenção de protoplastos, principalmente, a idade micelial, as enzimas, o estabilizador osmótico e o microrganismo utilizado.

Neste trabalho, foi possível observar que a idade micelial dos isolados exerceu influência na obtenção dos protoplastos, já que a melhor concentração foi obtida a partir de micélios com 18 a 22 h de crescimento em meio TB3. Períodos de cultivo superiores às 22 h mostraram baixa produção de protoplastos.

Em relação às enzimas utilizadas, apesar de alguns trabalhos com *Fusarium* spp. (Pedroso, 2009; Visser et al., 2004) fazerem uso de um mix com 3 diferentes enzimas de lise, neste trabalho com apenas duas enzimas, *Driselase* (*Driselase* from *Basidiomycetes* sp.- Sigma-D9515-1G) e *Lyzing enzyme* (Sigma- L1412-10G) foi possível obter protoplastos no período entre 3 h e 4 h, com digestão total da massa micelial, em KCl 1,2 M como estabilizador osmótico. Siqueira (2009) conseguiu  $30 \times 10^5$  em KCl 0,7 M, sendo este estabilizador mais eficiente.

#### 5.1.3 Transformação genética de *Fusarium decemcellulare* via PEG

O processo de transformação genética com PEG 8000 (polietilenoglicol 8000) foi realizado com sucesso utilizando os protoplastos dos isolados *Fdc* 307 e CML 2370 na concentração de  $10^7$  protoplastos/mL. Estes foram transformados separadamente com cassete portador do gene *gfp-Hyg* e *DsRed-Hyg*. Vale ressaltar que, este é o primeiro relato de transformação genética no fungo *F. decemcellulare*. Foram obtidos em média 40 a 50 linhagens transformantes em cada processo de transformação. A eficiência foi aproximadamente 2 a 3

transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA, níveis semelhantes também foram obtidos com *F. verticillioides* (Oren et al., 2003).

Transformação genética utilizando PEG é considerada um método altamente eficiente, porém pode ocasionar a integração de várias cópias do DNA exógeno no genoma do organismo alvo gerando instabilidade e alterações fenotípicas importantes, ao contrário da transformação via ATMT que geralmente gera transformantes com integração de apenas uma cópia do T-DNA no genoma do hospedeiro, diminuindo o risco de afetar genes importantes e ocasionar alterações fenotípicas (Crowhurst et al., 1992; Sook-Young et al., 2013). Contudo, mesmo ocorrendo uma variação no número de cópias integradas no genoma, este método é considerado simples e apropriado para transformação de muitas espécies de *Fusarium* (Lagopodi et al., 2002; Pedroso, 2009; Moradi et al., 2013).

#### 5.1.4 Análise e caracterização dos transformantes de *Fusarium decemcellulare*

Do total de transformantes obtidos foram selecionados aleatoriamente 11 linhagens de *Fdc 307* expressando a proteína GFP (*Fdc 307-GFP-Hyg*), 16 do *Fdc 307* expressando à proteína RFP (*Fdc 307-RFP-Hyg*) e 14 CML 2370 expressando a proteína GFP (CML 2370 GFP-Hyg). Todas as linhagens apresentaram resistência ao antibiótico Hygromycin-B (Figura 1 A, B e C).

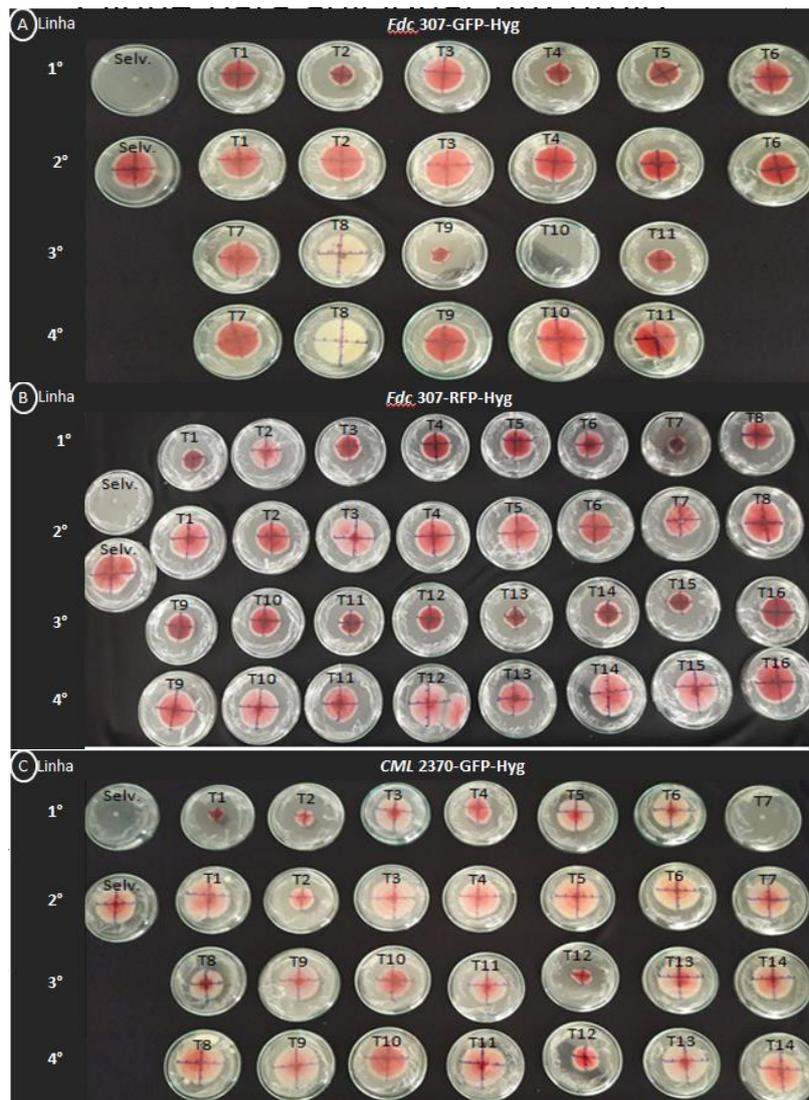
As linhagens transformantes expressando as proteínas fluorescentes (GFP e RFP) foram isoladas de culturas monospóricas em meio seletivo (BDA com hygromycin-B) para realização do teste de estabilidade mitótica, e posterior avaliação das características fenotípicas por meio da comparação morfológica com a linhagem selvagem (linhagem não transformada). Avaliados os seguintes parâmetros: forma da colônia, o crescimento micelial, pigmentação e produção de micélios aéreos. Estes procedimentos visaram à seleção da linhagem transformante para análise do processo de interação patógeno-hospedeiro.

Em relação ao formato da colônia, todas as linhagens transformantes quando comparadas as selvagens apresentaram uniformidade antes e após o teste de estabilidade mitótica. E quanto ao crescimento micelial, houve diferenças entre os transformantes e o selvagem cultivados durante 7 dias em meio seletivo e não seletivo (Figura 1).

Cinco dos onze transformantes *Fdc 307-GFP-Hyg* apresentaram crescimento reduzido após teste de estabilidade (T2, T4, T5, T9 e T11) (Figura 1A), oito dos dezesseis *Fdc 307-RFP-Hyg* (T1, T3, T7, T11, T12, T13, T14 e T15) (Figura 1B) e três dos quatorze CML 2370- GFP-Hyg (T1, T2 e T12) (Figura 1C), sendo que, alguns apresentaram esta diferença apenas quando cultivados em meio seletivo. O *Fdc 307 T10* (T10) transformado com GFP-Hyg e o CML 2370

T7 (T7) também transformado com GFP-Hyg, após teste de estabilidade não apresentaram mais resistência a higromicina-B, demonstrando serem geneticamente instáveis (Figura 1B).

Na pigmentação também ocorreu alteração em um dos transformantes do isolado *Fdc* 307- GFP-Hyg, transformante 8 (T8), perdeu a pigmentação vermelho carmim característica fenotípica do *F. decemcellulare*, permanecendo com a capacidade de crescer em meio seletivo, porém com descoloração mesmo após cinco sucessivas repicagens do teste de estabilidade mitótica. Já na produção de micélio aéreo não houve diferença comparado ao isolado selvagem.



Figuras 1: Imagem das colônias das linhagens transformantes e selvagens (controle) de *Fusarium decemcellulare*. Em A: linhagens transformantes *Fdc* 307-GFP-Hyg; Em B: linhagens transformantes *Fdc* 307-RFP-Hyg; Em C: linhagens transformantes CML 2370-GFP-Hyg. Em todas as figuras A, B e C, nas primeiras e terceiras linhas estão as linhagens transformantes, crescendo em meio seletivo (BDA suplementado com 100 µg/mL de higromicina-B) e nas 2ª e 4ª linhas estão crescendo em meio não seletivo; Nas 1ª colunas, de A, B e C estão os isolados selvagens crescendo em meio BDA com e sem antibiótico.

A avaliação por PCR em todos os transformantes selecionados, realizada antes do teste de estabilidade mitótica, confirmou a presença dos fragmentos com cerca de 590 pb referentes

à amplificação do gene *hph*, e dos genes repórteres *gfp* com 500 pb e *DsRed* de 607 pb, indicando a presença do cassete transferido (Figura 2) com exceção de seis transformantes de *Fdc* 307-RFP-Hyg (T1, T4, T5, T6, T10 e T13), que não amplificaram para o gene *rfp*, demonstrando que as linhagens possuíam apenas a região do gene *hph* integrado no genoma (Figura 2B).

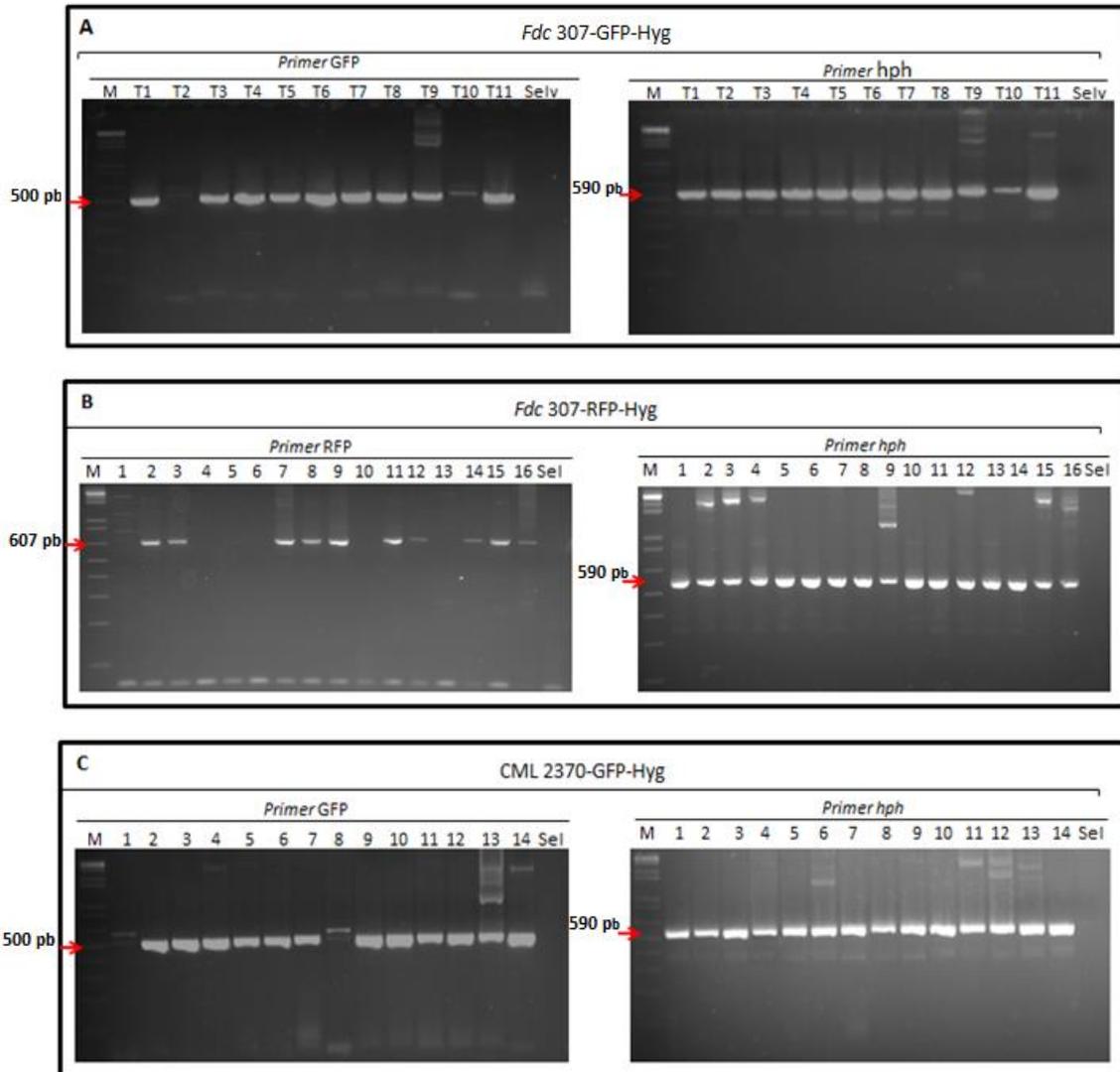


Figura 2: Caracterização molecular dos transformantes de *Fusarium decemcellulare* para análise da integração dos genes *gfp*, *DsRed* e *hph*. Em A: Amplificação do gene *gfp* na imagem da direita e amplificação do gene *hph* na imagem da esquerda; M – marcador 1 Kb plus (Invitrogen); os números 1 a 11 representam os transformantes *Fdc* 307-GFP-Hyg; na última coluna, Selv - linhagem selvagem (controle). Em B: Amplificação do gene *DsRed* imagem da direita e amplificação do gene *hph* imagem da esquerda; M - marcador 1 Kb plus (Invitrogen); os números 1 a 16 representam os transformantes *Fdc* 307 RFP-Hyg; na última coluna, Selv - linhagem selvagem (controle). Em C: Amplificação do gene *gfp* gel da direita e amplificação do gene *hph* gel da esquerda; M – marcador; os números 1 a 14 representam os transformantes CML 2370 GFP-Hyg; na última coluna, Selv - linhagem selvagem (controle).

Na análise de fluorescência realizada por meio da microscopia de epifluorescência foi detectado tanto GFP quanto RFP nas linhagens transformantes (Figura 3). Mesmo sem o uso de uma escala para mensurar a intensidade de fluorescência foi possível verificar diferenças nas

intensidades. Das 11 linhagens transformantes de *Fdc 307-GFP-Hyg* que cresceram em meio seletivo 7 apresentaram o que aqui chamamos de fluorescência forte, assim como também 10 dos 16 de *Fdc 307-RFP-Hyg* e 8 dos 14 de CML 2370-GFP-Hyg.

A perda de parte do cassete contendo os genes *DsRed* e *hph* foi observada em seis dos 16 transformantes *Fdc 307-RFP-Hyg*, que não apresentaram fluorescência e também não houve amplificação do gene *DsRed*, mas houve amplificação do gene *hph*, conforme mostrado na figura 2B, mostrando uma média de co-transformação de cerca de 62,5%, similar aos resultados encontrados por Dumas et al. (1999).

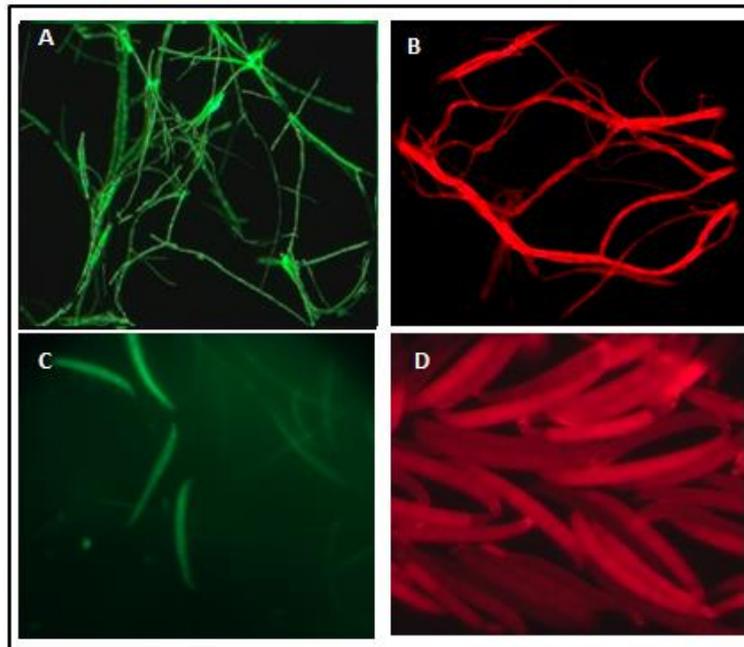


Figura 3: Imagens de micélios e esporos de linhagens transformantes de *Fusarium decemcellulare* expressando proteínas fluorescentes GFP e RFP. Em A e C: Massa micelial e esporos respectivamente de *Fdc 307-GFP-Hyg*; Em B e D: Massa micelial e esporos respectivamente de *Fdc 307-RFP-Hyg*.

Dois linhagens que apresentaram maior similaridade morfofisiológica com o isolado selvagem (T6 de *Fdc 307-GFP-Hyg* e T16 de *Fdc 307-RFP-Hyg*) foram selecionadas para análise da interação patógeno-planta. A taxa de crescimento, a produção de micélios aéreos e a pigmentação não foram modificadas pelo acúmulo de GFP ou RFP, demonstrando que a integração da(s) cópia(s) do(s) gene(s) e a expressão das proteínas fluorescentes não interferiram na fisiologia dos transformantes. Os conídios germinaram dentro do período observado no selvagem, iniciando a germinação entre 3 a 4 horas de cultivo em meio líquido, estando com o tubo germinativo desenvolvido em cerca de 6 horas de cultivo.

Em análises realizadas por Dumas et al. (1999), a expressão de GFP durante o crescimento saprofítico do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* foi observada após o período de incubação de 12 h a 25 °C, os conídios apresentaram fluorescência, mas não no tubo

germinativo. Porém, depois de 24 h de incubação foi detectada facilmente a fluorescência ao longo do tubo germinativo. Resultado semelhante foi observado na linhagem T16 de *Fdc 307-RFP-Hyg*, que apresenta fluorescência forte nos conídios, e nos tubos germinativos a fluorescência é detectável, porém menos intensa nas primeiras horas do desenvolvimento (Figura 4).

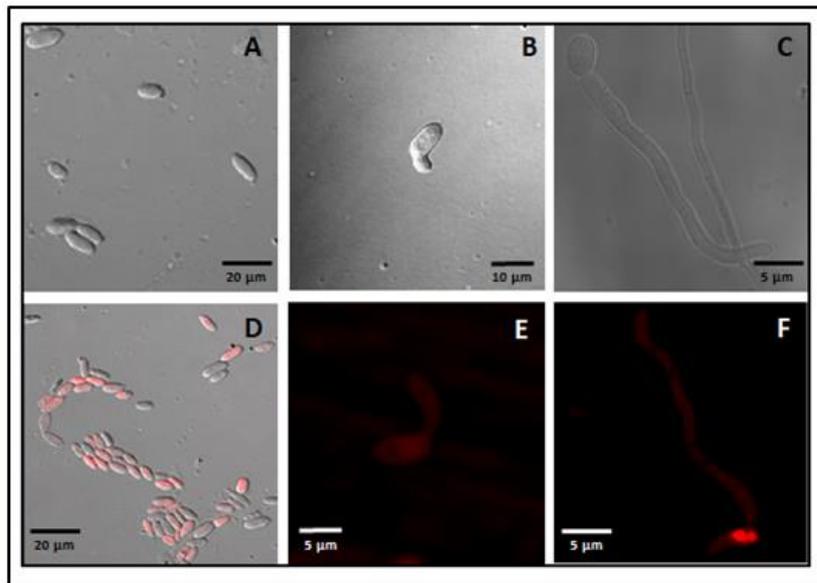


Figura 4: Germinação de esporos de linhagem transformante e selvagem visualizadas via microscopia confocal. Em A: linhagem selvagem tempo 0; Em B: selvagem germinando com 4 h; e em C: selvagem com 8h de germinação; Em D: transformante T16 de *Fdc 307-RFP- Hyg* tempo 0; Em E: T16 germinando com 4 h; e F: T16 com 8 h de germinação.

As proteínas verde e vermelha utilizadas neste trabalho são bastante empregadas em estudos de interação planta-patógeno após total comprovação da eficiência da integração e expressão de seus respectivos genes sem qualquer dano morfofisiológico ao organismo transformado. Existe atualmente uma enorme quantidade de trabalhos que evidenciam seu potencial, e não somente das proteínas, mas também do processo de transformação para obtenção de linhagens transformantes. Sarroco et al. (2007) conseguiu transformantes com integração e expressão estável das proteínas fluorescentes via PEG, e selecionou linhagens transformantes de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (*Fod*) com base no brilho e estabilidade da fluorescência para inoculação em raízes de cravo parcialmente resistente. Da mesma forma Xiao et al. (2013), também realizou o processo de transformação e seleção de linhagens transformantes expressando GFP para análise do processo de colonização do *F. oxysporum* f. sp. *ubense* (*Foc*) raça 4 em bananeiras. Lagopodi et al. (2002), Oren et al. (2003), Pedroso (2009), Van der Does et al. (2019) também empregaram linhagens de fungo transformadas com as proteínas fluorescentes e obtiveram sucesso em suas análises.

### 5.1.5 Avaliação de patogenicidade de linhagens transformantes de *Fusarium decemcellulare* em tomateiro

O tomateiro possui ciclo de vida curto, diferentemente do guaranazeiro, o que facilita a análise da patogenicidade e/ou virulência. Os sintomas externos e internos nas mudas de tomateiro surgiram com poucos dias após a inoculação, demonstrando a capacidade infectiva das linhagens transformadas com as proteínas fluorescentes.

Inicialmente as análises ocorreram por meio da microscopia confocal, sendo observada a colonização dos tecidos internos do tomateiro (região do caule), confirmando a presença do fungo nas áreas com sintomas característicos aos sintomas já relatados em diversas espécies de plantas afetadas pelo *F. decemcellulare* (Batista e Bolkan, 1982; Serrato-Diaz, 2015; Matos et al., 2016; García-López et al., 2017; Belan et al., 2018; Queiroz et al., 2020).

A colonização nos tecidos do caule dos tomateiros pelos fitopatógenos expressando GFP e RFP foi observada primeiramente após 72h de inoculação. Na área externa do caule na região dos pontos inoculados foi observada claramente a concentração de micélios, comprovando a germinação dos esporos e o desenvolvimento das hifas, diferentemente da planta controle (Figura 5 A e C). Já nos tecidos internos do caule havia escurecimento na região vascular que não se estendia ao longo de todo o caule da planta, ficando localizado em ponto específicos (Figura 5 D). Esta região escurecida quando analisada via microscopia confocal, por meio de cortes longitudinais e transversais, apresentou fluorescência intensa dentro e nos contornos das membranas das células vegetais que sugerem a colonização do fungo (Figura 5 H, I e J), diferente do observado em tecido de plantas controle, cuja autofluorescência é baixa (Figura 5 G).

O escurecimento dos tecidos vegetais internos ficou mais evidente após 5 dias de inoculação, mantendo-se localizado nas proximidades do ponto da inoculação. Nas análises de microscopia confocal não foi possível observar a fluorescência nos tecidos mais distantes ao ponto com sintomas. No entanto, o fitopatógeno foi isolado destas regiões, o que confirma que o fungo estava no tecido e por algum motivo não foi possível visualizá-lo. Os motivos podem estar relacionados à concentração de hifas nos locais analisados e/ou a própria fluorescência da hifa, que podia não está forte o suficiente e acabou sendo confundida com a autofluorescência dos tecidos da planta, conforme mostrado anteriormente neste capítulo, no qual os tubos germinativos apresentavam fluorescência menos intensa da observada nos esporos germinados (Figura 4F).

Aos 30 dias após a inoculação havia necrose na região do parênquima medular e nos tecidos do sistema vascular (Figura 5 E e F), e em algumas mudas além da necrose localizada

já havia escurecimento se estendendo ao longo do caule. Nestes tecidos com necrose, analisados via microscopia confocal, foram observadas fluorescência conforme mostrado na figura 5 K na região vascular (xilema e floema). A fluorescência nesta região foi observada tanto com a linhagem com GFP quanto com RFP. Os sintomas gerados pelos fungos transformados foram semelhantes aos causados pelo isolado selvagem e a colonização ocorreu de forma inter e intracelular, onde hifas transpassam as células (Figura 5 L), diferentemente das características das células da planta controle (Figura 5 G).

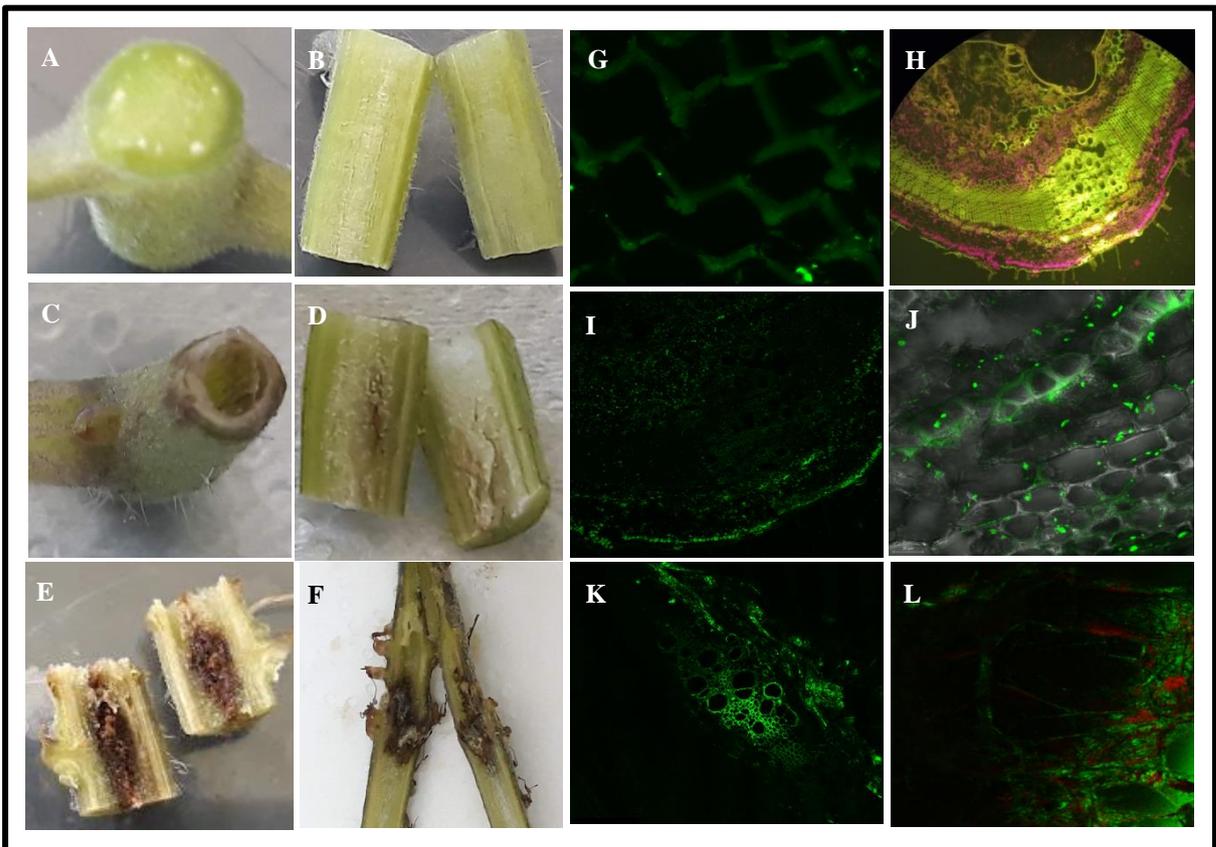


Figura 5: Sintomas e colonização dos tecidos internos em mudas de tomateiro. Em A e B: corte transversal e longitudinal, respectivamente, região do caule de planta controle sem sintoma; C e D: corte transversal e longitudinal, respectivamente, região do caule com sintoma de escurecimento 72h após inoculação com *F. decemcellulare* transformado com *gfp*; E e F: colonização de tecidos com sintomas de necrose 30 dias após inoculação; G: tecido do caule de planta controle com baixa intensidade de autofluorescência, objetiva 63x; em H: estrutura dos tecidos do caule inoculado com *F. decemcellulare* expressando GFP, corte transversal, obj. 10x; I e J: fluorescência nos tecidos 72h após inoculação, objetiva 10x e 63x respectivamente; K: fluorescência intensa na região do sistema vascular 30 dias após inoculação, objetiva 20x; L: Hifas fluorescentes transpassando a célula vegetal em tecidos 30 dias após inoculação, objetiva 63x. (imagens de microscopia confocal e fluorescência de G - L)

Os sintomas externos foram observados inicialmente após 5 dias da inoculação. Germinaram novas folhas nas axilas dos ramos foliares (com e sem injúria), tanto nas plantas inoculadas com as linhagens transformantes, quanto com a linhagem selvagem do *F.*

*decemcellulare*. Esses novos ramos também surgiram nas plantas controle, porém isso ocorreu em um período mais tarde, após cerca de 10 a 15 dias da inoculação (Figura 6 A, B e C).

O superbrotamento de ramos foliares deixou clara a diferença entre plantas inoculadas com o patógeno e plantas controle. Nos tomateiros inoculados com a linhagem expressando GFP e a linhagem selvagem o surgimento e o desenvolvimento dos novos ramos foram mais rápidos. Já nas plantas com o fungo com RFP foi mais lento quase similar às plantas controle.

Mesmo com a rapidez no alongamento e surgimento dos novos ramos, as plantas inoculadas com o fungo selvagem e com GFP ficaram claramente mais baixas que o padrão observado em plantas controle, enquanto as plantas com o fungo expressando RFP apresentaram alongamento do caule muito parecido às plantas controle (Figura 6 D). Esta diferença foi observada nas três repetições do experimento, demonstrando que a integração do(s) cassete(s) durante o processo de transformação genética do fungo pode(m) ter afetado gene(s) importante(s) relacionado(s) a virulência do patógeno, alterando o nível de virulência da linhagem contendo o gene *DsRed*.

Os ramos novos surgiram constantemente no decorrer de 30 dias e se desenvolveram, outros pequenos folíolos também foram brotando no caule na região próxima às raízes, principalmente nas plantas infectadas pelo *F. decemcellulare* com GFP e pela linhagem selvagem (Figura 6 E e F).

Além do superbrotamento de gemas vegetativas foi observado o desenvolvimento de nódulos no caule, com o lançamento de pequenos ramos que se mantiveram atrofiados. Os nódulos se distribuíam ao longo do caule de forma isolada ou aglomerada, sugerindo a formação do sintoma de galha no caule (Figura 6 G e H).

Após 30 dias da inoculação, os ramos mais antigos secaram e os ramos novos que brotaram no mesmo ponto dos antigos permaneceram aparentemente saudáveis (Figura 6 I). Nas plantas que apresentaram estaturas mais baixas, os espaçamentos entre um ramo e outro (entrenós) eram mais curtos, bem diferentes do distanciamento observado nas plantas com o fungo com RFP e nas plantas controle (Figura 6 J e K).



Figura 6: Sintomas externos em mudas de tomate. Em A: planta controle, gemas vegetativas 10 dias após o início do experimento; B e C: planta inoculada com *F. decemcellulare* transformado com *gfp*, ramos foliares com 7 e 15 dias após inoculação, respectivamente; D: da esquerda para direita, 1- planta controle, 2- planta inoculada com *F. decemcellulare* transformado com *DsRed*, 3- planta inoculada com *F. decemcellulare* transformado com *gfp* e 4- planta inoculada com *F. decemcellulare* selvagem; E e F: superbrotamento de folhas na região inferior do caule; G e H: nódulos aglomerados e folha atrofiada; em I: ramos ressecados ao longo do caule; J: encurtamento de entrenós em planta inoculada; K: distanciamento de entrenós em planta controle.

Apesar do desenvolvimento destes sintomas, as plantas alcançaram seu primeiro ciclo de vida completo com a floração e a produção de frutos, não havendo a morte da planta pelo menos no primeiro ciclo de vida observado neste experimento.

As condições do ambiente de cultivo, como por exemplo, a disponibilidade de água, a umidade, temperatura, a suscetibilidade da planta, e a intensidade luminosa também podem influenciar de forma considerável a atuação do patógeno na planta, podem ser fatores importantes para desencadear os sintomas nas plantas infectadas pelo *F. decemcellulare*. Oren et al. (2003) observou que a infecção do *Fusarium verticillioides* transformado com GFP em planta de milho foi mais severa em condições de baixa luminosidade, plantas com duas semanas de tratamento tiveram apodrecimento intenso e grandes quantidades de micélio foram detectados dentro das plantas.

## CAPÍTULO II

ANÁLISE DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO Á INFECÇÃO DE *Fusarium*  
*decemcellulare* EM GUARANAZEIRO CAUSANDO SINTOMAS DE  
DIEBACK E SUPERBROTAMENTO

## 6. Capítulo II: Análise do processo da germinação á infecção de *Fusarium decemcellulare* em guaranazeiro causando sintomas de Dieback e Superbrotamento

### 6.1 RESULTADOS

#### 6.1.1 Germinação, penetração e colonização de *F. decemcellulare* em mudas de guaranazeiro

Na observação realizada por meio de MEV nas superfícies da epiderme foliar em desenvolvimento, evidenciou-se que os tricomas tanto glandulares quanto os simples são abundantes na superfície abaxial das folhas das mudas do genótipo CMU 300 (tolerante) (Figura 1A).

Os esporos de *F. decemcellulare* observados 6 horas após inoculação nas superfícies foliares, tanto na superfície adaxial quanto abaxial, com injúria e sem injúria, apresentaram tubos germinativos longos originados nas células das extremidades dos macroconídios. Essas observações são compatíveis com dados da germinação *in vitro* onde foi observada formação de tubos germinativos a partir de 4 horas de crescimento a 25 °C (dados mostrados nos resultados do capítulo I).

Os dados indicam que a germinação ocorreu sem nenhum padrão especial de direcionamento sobre a epiderme tanto nas superfícies adaxial quanto abaxial. Mesmo com grandes quantidades de estômatos presentes na superfície abaxial não foi observada a atração dos tubos germinativos para penetração por meio destas aberturas naturais (Figura 1B e C).

No período de 12 horas após inoculação foi possível observar que alguns esporos apresentaram dois tubos germinativos razoavelmente desenvolvidos em cada extremidade, na célula apical (forma de gancho) e na célula basal (forma de pé), além da germinação ocorrer também nas células centrais dos macroconídios de forma mais atrasada (Figura 1D e E). Nesse período de germinação também não foi observada a atração dos tubos germinativos aos estômatos para realização da penetração.

Nos intervalos de 24 a 48 horas após inoculação foi observado desenvolvimento das hifas em estágio avançado, com hifas ramificadas, colonizando as superfícies adaxial e abaxial, sem indício da penetração pelos estômatos. As hifas foram observadas crescendo ao redor e sobre os estômatos abertos sem que ocorresse a penetração (Figura 1 F e G). No entanto, observou-se penetração pelas injúrias artificiais e tricomas rompidos (Figura 1H e I).

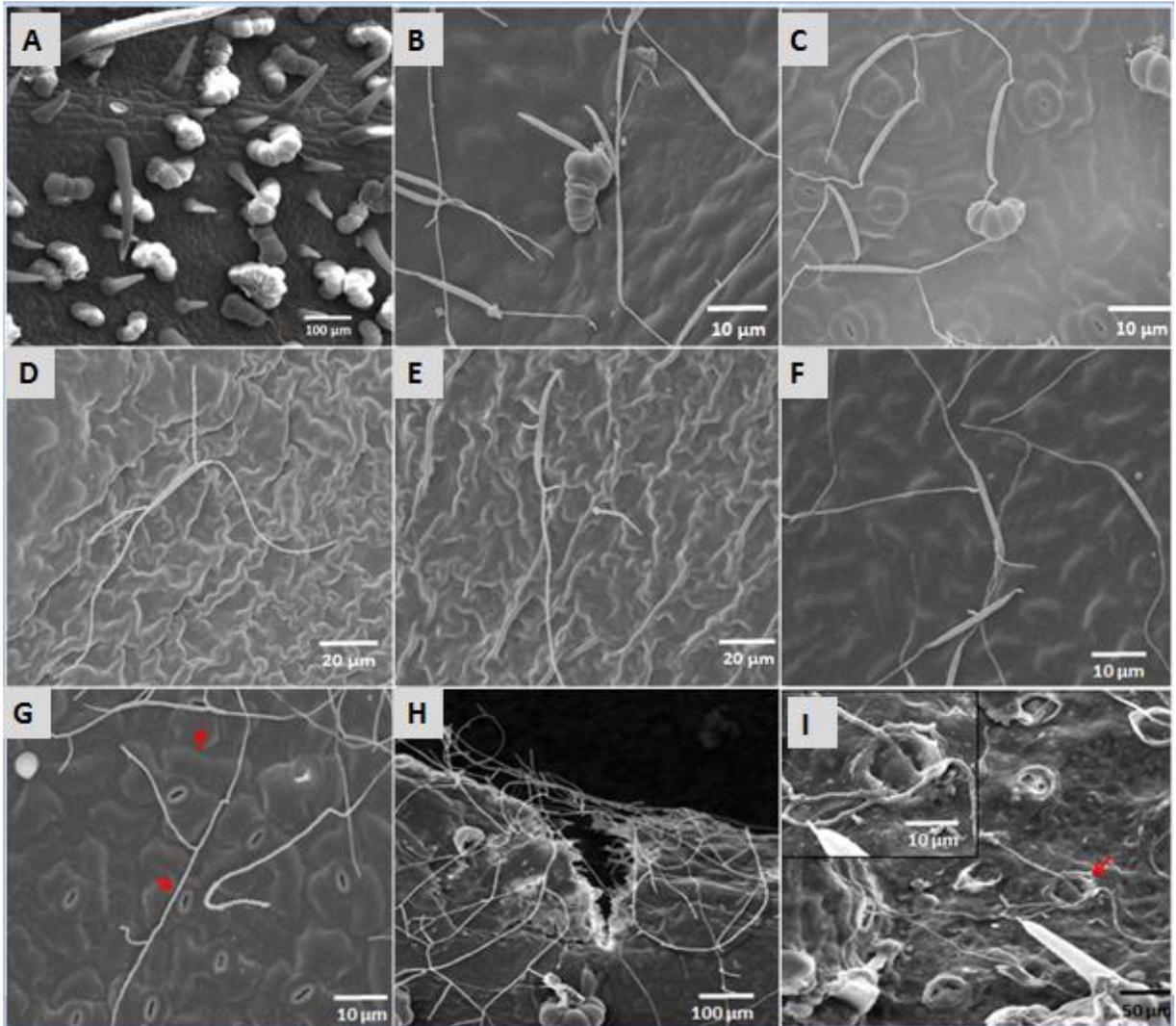


Figura 1: Microscopia de varredura em folíolos de guaranazeiro. Em A: superfície abaxial de folíolos do genótipo CMU 300 com evidente densidade de tricomas; B e C: superfície adaxial e abaxial respectivamente de folíolos, em ambos mostrando o desenvolvimento de tubos germinativos sem padrão de direcionamento; D: superfície adaxial de folíolos com conídios apresentando dois tubos germinativos em cada uma das extremidades após 12 h de inoculação; E: superfície adaxial de folíolos com tubos germinativos originados nas células centrais do conídio; F e G: superfície abaxial de folíolos 24 h após inoculação, com conídios apresentando hifas bem desenvolvidas com ramificações, sem penetração em estômatos; H e I: superfície abaxial de folíolos com injúria ocasionada por perfuração e por rompimento dos tricomas, após 48 h de inoculação, ocorrendo a penetração das hifas nos canais dos tricomas.

Após a análise da germinação e penetração de *F. decemcellulare* em folhas, constatou-se que este não é capaz de progredir de maneira eficaz com a infecção e disseminação no tecido foliar. Portanto, para determinar as vias mais eficazes de entrada deste patógeno no guaranazeiro, outras diferentes partes da planta foram inoculadas, conforme descrito abaixo.

Os tecidos inoculados foram raque, gema, caule e raiz, todos com injúrias. A penetração das hifas de *F. decemcellulare* ocorreu em todos estes tecidos inoculados, sendo observada uma elevada concentração de micélios 4, 15 e 25 DAI. As áreas onde foram inoculados os esporos ficaram com um aspecto esbranquiçado característico da formação de massa micelial,

diferentemente do observado na planta controle com aspecto saudável. Estes resultados demonstraram que houve perfeitamente a germinação e desenvolvimento dos tubos germinativo, indicando que os esporos mantiveram-se viáveis nas cavidades dos ferimentos. Além dessa massa micelial, os tecidos da planta apresentavam-se escurecidos e ressecados (Figura 2A).

Nas primeiras camadas de células da epiderme de gemas vegetativas, da epiderme e parênquima cortical (córtex) da raque e do caule foi observada apenas uma escassa penetração e colonização de hifas de forma intracelular (Figura 2B), mesmo existindo uma grande concentração de micélios macroscopicamente visíveis na superfície da epiderme e também na região interna côncava da injúria visualizada tanto por meio de MEV 15 DAI, quanto da microscopia eletrônica confocal com 25 DAI (Figura 2C e D).

Já nas células do sistema vascular (xilema, floema e esclerênquima) da raque e do caule, 25 DAI, observadas por meio da microscopia confocal utilizando linhagem transformante de *F. decemcellulare* não foram observadas hifas colonizando tais tecidos, sugerindo que este fungo coloniza os tecidos de forma lenta. Ademais, o guaranazeiro apresenta autofluorescência, tanto na faixa verde quanto vermelha, porém em maior intensidade para fluorescência verde (Figura 2B e D).

O crescimento e desenvolvimento do fungo na raque, na gema vegetativa, no caule e na raiz ocorreram de maneira muito semelhante, não havendo distinção no processo de colonização seja de forma inter ou intracelular nas diferentes partes das plantas inoculadas durante os períodos de análise (4, 15 e 25 DAI). Desta forma, pode-se dizer que este fungo não apresentou preferência por nenhuma das partes das plantas, pois em todas as partes inoculadas o fungo manteve-se viável e apresentando micélios macroscopicamente visíveis na epiderme e colonização lenta em todos os tecidos.

Somente aos 45 dias após a inoculação, visualizados por meio de MEV, os pontos inoculados apresentaram maior densidade de hifas colonizando de forma intracelular, atravessando e aderindo internamente nas células dos tecidos que antes não foram encontrados aos 15 e 25 DAI, como por exemplo o sistema vascular e parênquima medular na raque, no caule e raiz (Figuras 2E, F, G, H e I).

Aos 45 DAI as mudas apresentaram sintomas semelhantes aos da doença Dieback, ainda não relatada no guaranazeiro sendo causada por *F. decemcellulare*. Entretanto, existem vários relatos deste fungo causando esta mesma doença em outras espécies de plantas frutíferas, como em cacauzeiro e mangueira com os sintomas muito semelhantes aos observados no guaranazeiro (Adu-Acheampong et al., 2011; Yan-Xiang et al., 2013).

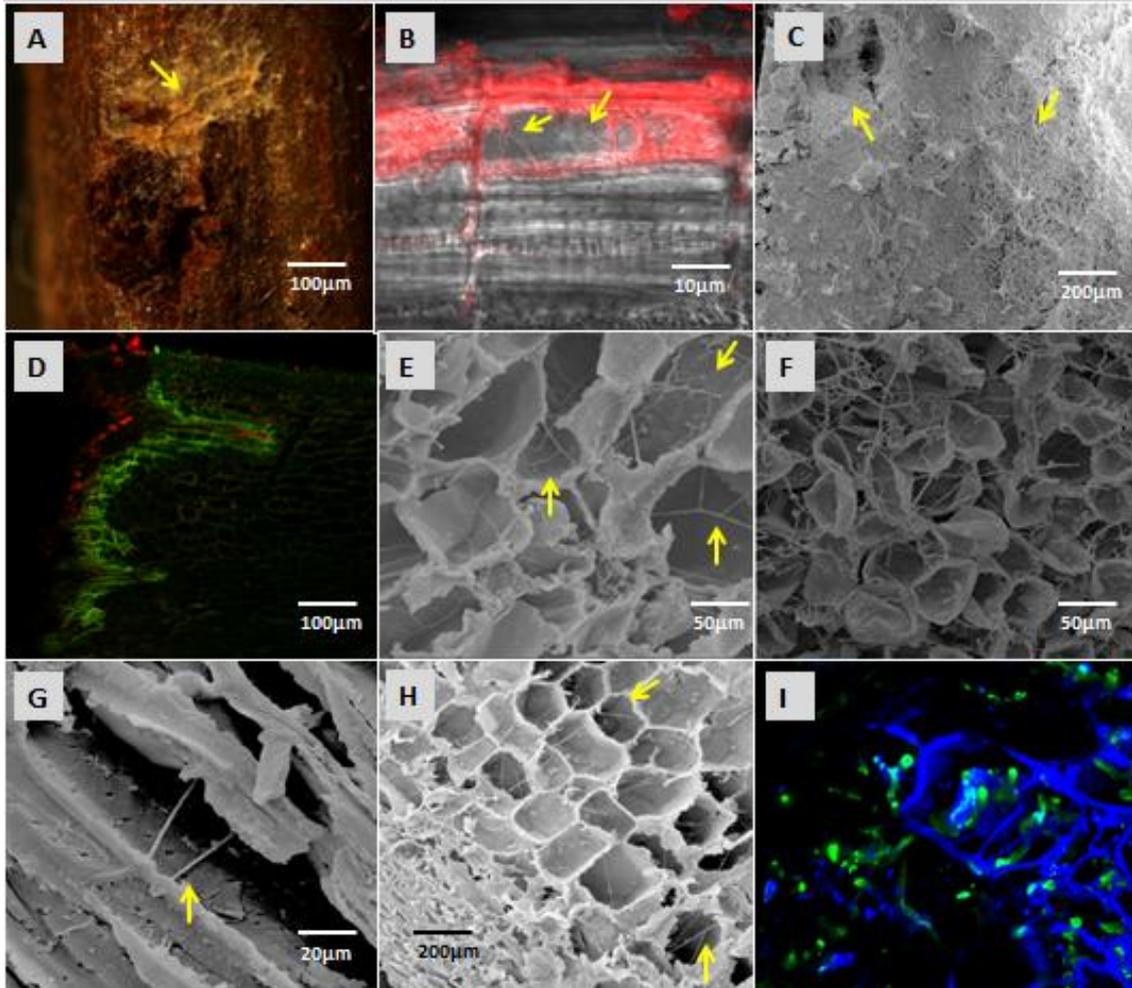


Figura 2: Eletromicrografia de varredura, microscopia de luz e eletrônica confocal em tecidos de guaranazeiro. Em A: formação de massa micelial com aspecto esbranquiçado na superfície da região inoculada do caule, 4 DAI; B: colonização de hifas em tecidos internos da raque observados por microscopia confocal, 25 DAI; C: micélios na superfície da epiderme da raque e na região da perfuração inoculada, 15 DAI; D: colonização na região côncava inoculada com *F. decemcellulare* expressando RFP, 25 DAI; E, F, G e H: colonização de tecidos internos na raque, na gema, no caule e raiz, respectivamente, observada por meio de MEV, 45 DAI. Em I: colonização na raiz visualizada por meio do método de clarificação.

### 6.1.2 Processo de infecção de *Fusarium decemcellulare* em guaranazeiro causando Dieback

Os sintomas mais severos da doença ocorreram em mudas de guaranazeiro inoculadas na raque e na raiz, que levaram à morte da planta 45 DAI. Os sintomas foram semelhantes a doença Dieback, caracterizada por manchas irregulares inicialmente de cor marrom progredindo para a cor preta, manchas localizadas nos pecíolos e galhos, necrose vascular e folhas secas, avançando para mortalidade completa do galho e conseqüentemente da planta (Yan-Xiang et al, 2018).

Nas mudas inoculadas na raque e na raiz, além dos sintomas de escurecimento e necrose visualizados nos pontos inoculados com injúria, outras partes da planta onde não houve inoculação também apresentaram escurecimento dos tecidos externo, como por exemplo, os

nós dos peciolulos das folhas (Figura 3A e C) e nós dos pecíolos (Figura 3B e C). Estes iniciaram com coloração marrom na área externa dos tecidos e no estágio mais avançado apresentaram aspecto enegrecido e ressecado, sendo visível também o escurecimento nos tecidos internos na região da injúria artificial onde foi realizada a inoculação e na região do sistema vascular de partes não inoculadas da planta (Figura 3D - G). Na folha, o limbo ficou escurecido, assim como também a metade da folha (seca), enquanto a outra metade permaneceu verde até a secagem total e escurecimento das folhas, resultando assim na morte da planta (Figura 3H).

As plantas inoculadas no caule e na gema vegetativa apresentaram os sintomas externos mais leves da doença, ficando apenas no estágio inicial, com a coloração marrom dos nós dos peciolulos das folhas e dos nós dos pecíolos, não progredindo para coloração enegrecida. Mas, mesmo apresentando sintomas externos leves, foram observados no caule das plantas inoculadas escurecimento do tecido vascular e necrose no local da inoculação. Nas plantas inoculadas na gema vegetativa, as gemas inoculadas ficaram ressecadas e escurecidas externa e internamente, não ocorrendo o lançamento de um novo folíolo. Mesmo apresentando esses sintomas não houve morte da planta após 120 DAI.

O comprimento médio das lesões causadas por *F. decemcellulare* variou nas diferentes partes inoculadas da planta, ficando muito evidente o escurecimento na região do sistema vascular 120 DAI, sendo consistentemente reisolado das lesões em plantas inoculadas e nunca de plantas controle. Além das regiões das lesões na raque, no caule, na gema e na raiz, foi possível reisolamento de *F. decemcellulare* de todas as outras partes das plantas, porém com maior frequência na região inoculada alcançando uma distância entre 20 e 30 mm, depois desta distância o fungo foi reisolado em menor frequência a cada 2 cm de distância um do outro.

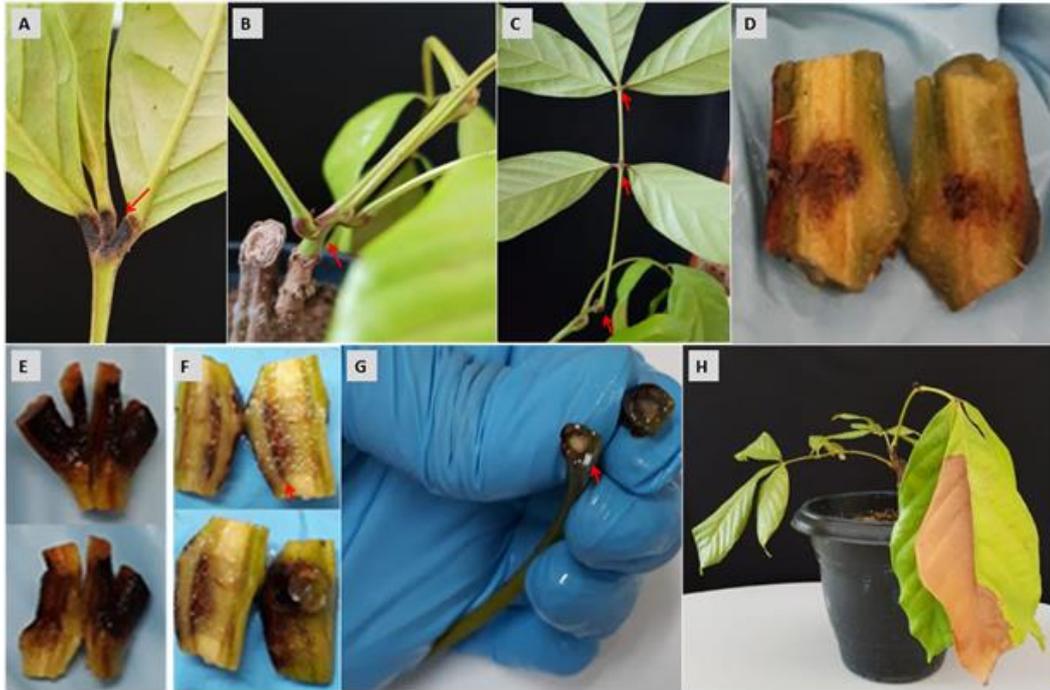


Figura 3: Sintomas semelhantes a doença de dieback em mudas de guaranazeiro. Em A, B e C: manchas de cor negra em nós dos peciólulos das folhas e pecíolos; D: necrose no ponto da inoculação na raque, 45 DAI; E e F manchas escuras e necrose vascular observadas em cortes longitudinais na raque, 45 DAI; G: escurecimento vascular em nós dos pecíolos, corte transversal 45 DAI; H: folha seca com mancha irregular de cor marrom causadas 45 dias após a inoculação..

### 6.1.3 Análise da infecção em guaranazeiro com sintomas de superbrotamento causado por *Fusarium decemcellulare*

*Fusarium decemcellulare* foi isolado de todas as estruturas sintomáticas (tecidos reprodutivos “gemas florais”, tecidos vegetativos “gemas vegetativas, ramos foliares e galhas nos ramos principais”) e apresentou as características típicas da espécie na literatura, como coloração vermelha carmim em placas com BDA, microconídios em formato oval, sem septos e em cadeias; macroconídios produzidos em esporodóquios amarelados, curvados a cilíndricos com 6-9 septos (Figura 4A - E). Os resultados confirmam que as colonizações são provenientes de *F. decemcellulare* e não de outros fungos (endofíticos ou saprófitos) que possam estar presentes nos tecidos com sintomas.

Nos tecidos de plantas adultas com sintomas de superbrotamento “*oversprouting*” foi possível observar perfeitamente a presença de hifas, micro e macroconídios colonizando os espaços intracelulares e aderidos internamente às membranas das células, no qual, quando observados por meio de métodos histológicos as estruturas do fungo e células da planta distinguem-se pelo contraste da coloração obtida com o corante azul de lactofenol (Figura 4F - H).

Nas gemas florais observou-se associação consistente das hifas fúngicas e alta concentração de macroconídios com os tricomas na superfície da epiderme e também dentro

das câmaras internas formadas pelas brácteas nas “cápsulas” (Figura 4I). Hifas também foram visualizadas colonizando intensamente as células internas dos tecidos das gemas florais de forma intracelular, sendo observada além das hifas a presença de micro e macroconídios, porém em menor concentração que a observada na superfície da epiderme junto aos tricomas (Figura 4 J e K).

Em ramos foliares afetados tanto pelo superbrotamento de gemas vegetativas quanto de gemas florais, foi observada cancrese na região do xilema e floema, e na região central do parênquima medular, visualizados macroscopicamente em cortes longitudinais (Figura 4L) e microscopicamente por meio de MEV (Figura 4M), nesta região havia uma intensa colonização, com presença de hifas e uma grande concentração de microconídios (Figura 4N - P) com características morfológicas muito semelhantes às descritas por Leslie e Summerrell (2006), ficando muito clara a presença e ação desse fungo no sistema vascular da planta hospedeira. Em cortes transversais nos ramos também foram observados nos tecidos do sistema vascular colonização intracelular (Figura 4Q).

As análises filogenéticas foram realizadas com sequências de isolados obtidos de tecidos sintomáticos de plantas e sequências de outras espécies de *Fusarium* previamente depositadas no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI). Os resultados confirmam a presença de *F. decemcellulare* em todos os tecidos da planta do guaraná com sintomas da doença.

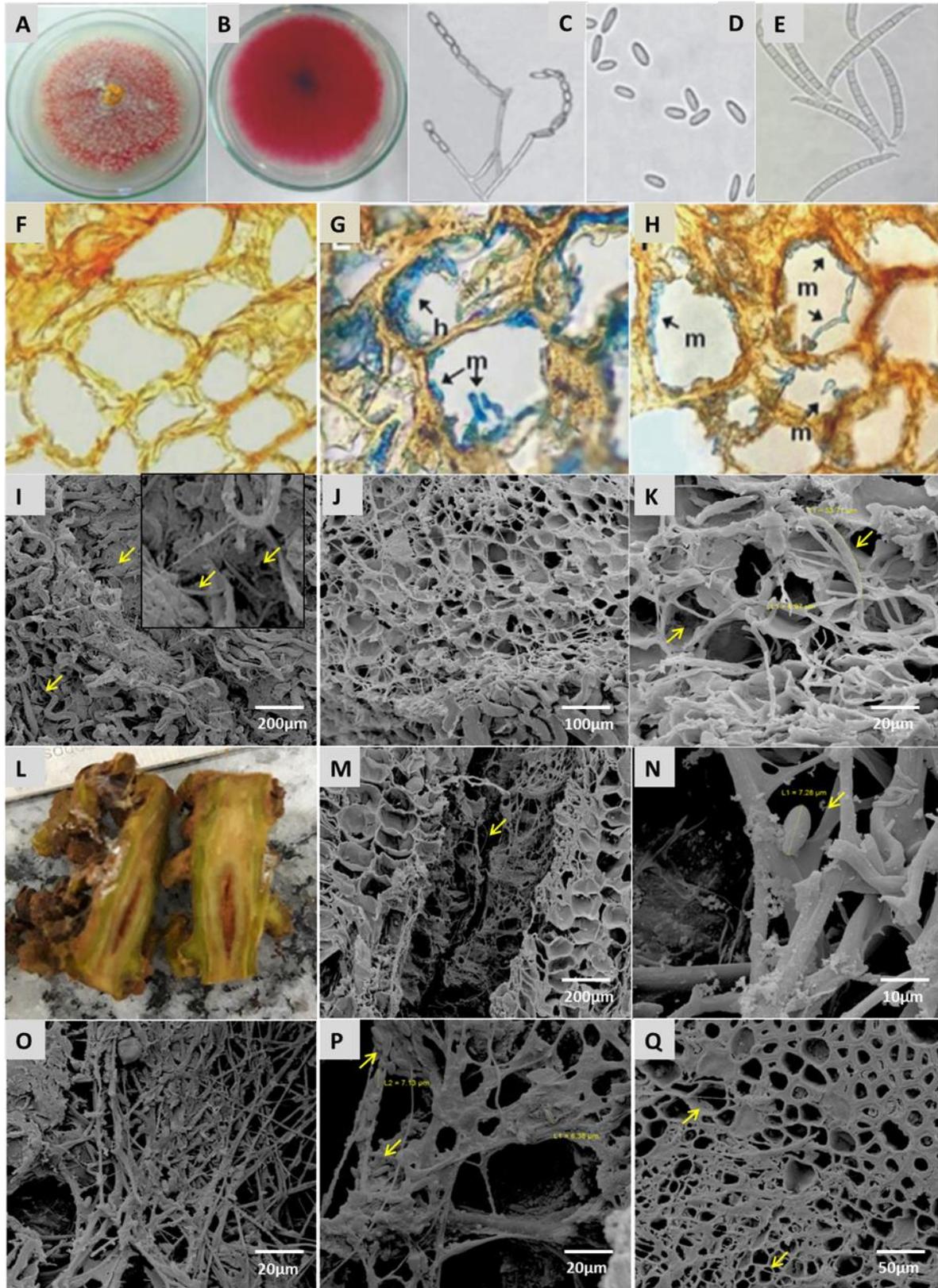


Figura 4. *Fusarium decemcellulare* cultivado *in vitro* e em tecidos sintomáticos de plantas de guaraná. Em A e B: Colônia após 10 dias de crescimento no meio SNA; C e D: Microconídios formados em cadeia; E: Macroconídios; F: Cortes transversais de tecidos de flores assintomáticas de guaranazeiro, demonstrando a ausência de estruturas morfológicas do fungo; G e H: Cortes transversais de tecido sintomático evidenciando a colonização intracelular, por coloração diferencial; I: hifas e alta concentração de macroconídios associados aos tricomas na superfície da epiderme de “cápsula” de tecido reprodutivo; J e K: cortes transversais em cápsulas florais, hifas colonizando as células internas de forma intracelular, com a presença de micro e macroconídios; L:

secção longitudinal em tecido sintomático de ramos florais, demonstrando manchas e necrose vascular; M e N: região da mancha e cancrese da figura L visualizadas por meio de MEV, presença de hifas e microconídios; O e P: corte longitudinal de outra região do ramo floral com mancha e necrose vascular com hifas e microconídios; Q: corte transversal de ramos florais, hifas colonizando de forma intracelular tecido vascular; h – hifas; m – micélios.

## 6.2 DISCUSSÃO

A germinação dos macroconídios e microconídios do *F. decemcellulare* ocorreu perfeitamente entre 4 h e 6 h, mesmo tempo observado no cultivo *in vitro*, e após 8 h de inoculação os tubos já estavam bem desenvolvidos. Na análise comparativa realizada por Grades (2014) entre três espécies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*), o *F. graminearum* foi o que lançou tubos germinativos em menor tempo, cerca de 8 h, porém quase o dobro do tempo observado com *F. decemcellulare*. E assim como o *F. decemcellulare*, o *F. graminearum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* também lançaram tubos germinativos em células centrais dos macroconídios (Figura 1 E), no qual 24 HAI foram observados 6 tubos germinativos.

Os resultados da MEV mostraram uma grande quantidade de tricomas no genótipo CMU 300 de guaranazeiro (Figura 1A). Nos tricomas foram observadas hifas oriundas de esporos recém germinados associados tanto aos tricomas intactos, quanto aos tricomas rompidos, havendo uma clara penetração das hifas nos tecidos da folha por meio dos tricomas rompidos e por meio das injúrias artificiais que foram ocasionadas por perfuração (Figura 1B, C, H e I). Isso ocorre mesmo os tricomas sendo relatados com papel importante contra a infecção fúngica e outros patógenos (Pascholati e Leite, 1995), devido serem compostos por uma diversidade de metabólitos secundários e voláteis, como óleos, néctar, sais, resinas, mucilagens, e água, entre outros, dependendo da espécie e da necessidade da planta (Schnetzler et al., 2017).

Assim como foi observado com o *F. decemcellulare*, a interação com os tricomas também foi relatada com o *F. graminearum* na superfície da flor da cevada, assim como na fixação das hifas de *F. graminearum*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* nos tricomas e ao redor de tricomas glandulares do milho (Grades 2014; Imboden et al., 2018). Considerando-se intrigante a capacidade destes *Fusarium* se associarem aos tricomas para penetrar na planta, mesmo com o acúmulo de compostos associados à defesa nessas células. Podendo-se acreditar então, que os compostos presentes nos tricomas de alguma maneira fornecem nutrientes que possibilitam o desenvolvimento das hifas, contribuindo com o processo de infecção destes patógenos (Schnetzler et al., 2016; Imboden et al., 2018).

Segundo Imboden et al. (2018) os tricomas são importantes na penetração de fungos, mas os que estão localizados sobre regiões vasculares despertam maior importância devido

poderem atuar como condutores de hifas para o acesso ao sistema vascular com estádios de desenvolvimento do fungo importante para a esporulação sexual e assexual.

As paredes de células basais de alguns tipos de tricomas, especialmente os glandulares, apresentam placas de perfurações, que não estão especificamente relacionadas a doenças, facilitam a troca de metabólitos entre as células basais dos tricomas e as células subjacentes (Evert, 2007). As placas crivadas são estruturas vegetais bastante especializadas e raras, encontradas na base de pelos glandulares e nectários extraflorais (Evert, 2007), a princípio observadas neste trabalho, porém ainda não descritas em *Paullinia cupana*. Estas aberturas naturais da parede lignificada das células da epiderme poderiam ser utilizadas pelas hifas para penetrar mais facilmente, podendo se mover pelos espaços intercelulares até as células do sistema vascular. Talvez a facilidade da penetração possa explicar a constante associação de hifas do micélio aéreo com os tricomas.

Nesta investigação, assim como foi observada a associação das hifas aos tricomas em superfície de tecidos inoculados com suspensão de esporos (Figura 2A e C), em tecidos sintomáticos de guaranazeiro (infectados naturalmente) principalmente em gemas florais pôde-se observar também um acúmulo de hifas, além de alta densidade de macroconídios encontrados principalmente na região mais superficial dos tecidos, sempre em associação com grandes quantidades de tricomas e dentro das câmaras internas formadas pelas brácteas (Figura 4I).

Nas regiões internas onde foram realizados os cortes nos tecidos inoculados, a colonização foi melhor evidenciada aos 45 DAI em todas as partes da planta analisadas (raque, gema, caule e raiz) (Figura 3E, F, G e H), alcançando os tecidos do sistema vascular e parênquima medular que antes não havia evidência de colonização nem aos 4, 15 e 25 DAI. A visualização por meio da microscopia confocal pode ter sido dificultada devido às hifas ficarem aderidas internamente nas células, como foi possível observar na Figura 2E por meio de MEV e na Figura 2I por meio do processo de clarificação tecidual, mas principalmente devido à planta apresentar autofluorescência. E assim como nas mudas de guaranazeiro, nos tecidos internos de plantas sintomáticas, como em ramos foliares e florais, observou-se entre o parênquima medular e os vasos do xilema e floema onde foram realizados os cortes um acúmulo de hifas, porém com a presença de microconídios (Figura 4M, N, O, P e Q).

Estes resultados nos mostram que, provavelmente a infecção de *F. decemcellulare* ocorre de forma semelhante das demais espécies de *Fusarium* (Brown et al., 2010; Ortiz et al., 2014), ocorrendo a infecção pela epiderme com associação das hifas aos tricomas (Figura 2A e C) depois uma possível colonização intercelular (Figura 2B), seguida por penetração para o interior das células por meio de perfurações naturais, iniciando assim o processo de colonização

intracelular, podendo ser transpassando as células e/ou aderindo as membranas das células internamente (Figura 2E, F, G e H), provocando alterações morfológicas no tecido da planta e ocasionando os sintomas da doença. Perfurações ou aberturas naturais no tecido vegetal também foram observadas sendo colonizada por *F. graminearum*, onde houve a translocação de hifas entre as células do hospedeiro (Brown et al., 2010).

A presença de micélios aéreos e esporos de *F. decemcellulare* na superfície de inflorescências no guaranazeiro é extremamente importante, devido esse patógeno ser capaz de sobreviver no ambiente por cerca de um longo período (Adu-Acheampong, 2009) podendo se dispersar e aumentar a incidência das doenças. No entanto, apesar dele apresentar um processo rápido de germinação e penetração, não se desenvolve rapidamente na planta quando comparado a outros patógenos, e além dos tricomas necessita de ferimentos nos tecidos da planta para infectar, como observamos neste trabalho em guaranazeiro (Figura 1H e I) e também observado por Adu-Acheampong (2009) em cacau e por Yan-Xiang et al. (2013) na manga, onde o *F. decemcellulare* tem como via mais eficaz de entrada tecidos com injúria, apresentando 100% de infecção nestes tecidos injuriados.

No campo estes ferimentos também podem ser gerados pela incidência de insetos, como o tripses (*Pseudophilothrips adisi*) no guaranazeiro considerado um vetor do *F. decemcellulare* (Adis et al., 1985; Tavares et al., 2007), semelhante ao mirid (*Distantiella theobroma*) para o cacau (Ploetz, 2007). Segundo Adu-Acheampong (2009), o controle do mirid poderia contribuir para redução da doença dieback em cacau, já que controlando este inseto pode ocorrer redução da dispersão dos esporos, das lesões nas plantas e transmissão do patógeno. No caso do guaranazeiro ainda não foram realizados trabalhos que nos permitam correlacionar se a redução do tripses também reduziria a frequência de superbrotação.

A dispersão desse patógeno na superfície dos tecidos do guaranazeiro, observado neste trabalho em alta densidade, também pode ser minimizada por meio da poda fitossanitária com a remoção de ramos infectados, prática já realizada por agricultores que cultivam o guaraná, e indicada por Adu-Acheampong (2009) em cacau, preferencialmente antes do processo de esporulação. Porém, dependendo do estágio de colonização este fungo já invadiu os tecidos internos das plantas hospedeiras causando sintomas e emergindo nos tecidos externos produzindo novos esporos, conforme observado nas inflorescências sintomáticas com alta densidade de macroconídios (Figura 4I), que podem dar continuidade ao ciclo de vida do patógeno, com a dispersão e nova inoculação. Neste estágio de infecção o controle por meio da poda fitossanitária poderia ser menos eficiente, ou até mesmo servir de porta de entrada do patógeno em plantas não infectadas.

O *Fusarium decemcellulare* além de progredir com o desenvolvimento das hifas nos tecidos pode ainda produzir e liberar esporos no sistema vascular, no qual sugeriu-se que estes poderão fluir nos vasos e assim dar início a uma nova colonização em outra parte da planta. Uma vez que, na análise da colonização realizada por meio do processo de isolamento, aos 45 DAI o fungo foi isolado de pontos próximos a inoculação e de pontos mais distantes, porém em algumas áreas que intercalam estes pontos não foi isolado, já aos 120 DAI foi possível isolar o fungo a partir do ponto de inoculação se estendendo ao longo de toda a planta, sendo que nas partes mais distantes da área inoculada o isolamento foi mais escasso.

A produção de substâncias pelo *F. decemcellulare* que podem ter um papel importante na expressão de sintomas e na morte da planta conforme presumido por Adu-Acheampong et al. (2011), também nos indica que nas condições de inoculação realizadas neste trabalho este fungo tenha produzido substâncias que podem ter se deslocado pelo sistema vascular estimulando um sistema de resposta da planta, como o escurecimento de tecidos internos principalmente em áreas do sistema vascular do pecíolo, peciólulo e no caule (Figura 3C, D, F e G) observado nas mudas de guaranazeiro com sintomas semelhantes a dieback e superbrotamento, em regiões onde não foi possível isolar o *F. decemcellulare* e nem visualizá-lo por meio do MEV. Os sintomas de escurecimento do sistema vascular do pecíolo, do peciólulo e dos ramos, com posterior morte da planta foram muito semelhantes aos descritos em mangueira (*Mangifera indica*) por Yan-Xiang et al. (2013) na China. E nas últimas seis décadas, *F. decemcellulare* tem sido implicado como um dos principais agentes causais de doença na África Ocidental (Crowdy, 1947; Adu-Acheampong et al., 2011).

Existem relatos também deste fitopatógeno como agente causal de doenças na árvore ornamental *Magnolia denudata*, que após sete dias de inoculação apresentou o sintoma de cancro no ramo (Wang e Chen, 2015); na maçã (*Malus pumila* Mill.) ocasionando manchas redondas, castanho-avermelhado após 15 dias de inoculação tanto em maçã com ferimentos, quanto nas sem ferimentos (Seung-Yeol et al., 2017); no cafeeiro (*Coffea canephora*) com sintomas na raiz e sintomas de murchamento, amarelecimento das folhas, desfolhação e escurecimento do tecido vascular com 45 dias de inoculação e após 65 dias secagem e morte da planta (Belan et al., 2018); e na mangueira (*Mangifera indica*) causando superbrotamento de gema vegetativa após 8 meses a inoculação em gemas (García-López et al., 2017).

Em guaranazeiro com sintomas de superbrotamento foi possível evidenciar os sintomas internos em ramos (foliares e de gemas vegetativas) que já haviam sido descritos em outras espécies de plantas, mas não no guaranazeiro até o momento, sendo observado pela

primeira vez um comprometimento do sistema vascular dos tecidos sintomáticos (Figura 4M, N, O, P e Q) com os tecidos internos secos e escurecidos (Figura 4L).

Neste trabalho foi possível analisarmos tempo de germinação, formas de penetração e colonização, evidenciando claramente o tipo de colonização (sistêmica) deste fitopatógeno. No entanto, existe ainda a necessidade de mais estudos a respeito do processo infeccioso de cada doença, uma vez que, obtivemos mudas com sintomas semelhantes a Dieback, mas não foi possível obtermos com sintomas de superbrotamento, por algum motivo que até o momento não sabemos.

Acredita-se que as condições de temperatura e umidade sejam determinantes no processo de infecção, desenvolvimento e disseminação, fatores que não foram avaliados durante o experimento. Outro fator que se pode levar em consideração são as condições de campo, já que no campo a planta pode receber várias inoculações diariamente, por meio de insetos, por exemplo.

Neste trabalho o objetivo foi verificar o tipo de colonização e o direcionamento do patógeno na planta, portanto, foi realizada apenas uma única inoculação pontual por planta. Diante destes resultados sugerimos mais estudos a fim de elucidar os mecanismos deste fungo e assim desenvolver métodos de controle.

### CAPÍTULO III

OBTENÇÃO DE MUTANTES PARA GENES RELACIONADOS À PATOGENICIDADE  
DE *Fusarium decemcellulare* POR MEIO DE CRISPR/Cas9

## 7. Capítulo III: Obtenção de mutantes para genes relacionados à patogenicidade de *Fusarium decemcellulare* por meio de CRISPR/Cas9.

### 7.1 RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 7.1.1 Obtenção e Caracterização de Linhagens com *Knockout*

Atualmente, existem várias maneiras de utilizar o sistema CRISPR/Cas9 de acordo com a necessidade. O sistema baseia-se em um complexo formado pela enzima Cas9 guiada pelo crRNA:tracrRNA (sgRNA), estes podem ser introduzidos nas células por meio de vetores de expressão que podem ou não se integrar no genoma e assim produzir de forma constitutiva a Cas9. O organismo que produzir esta enzima constitutivamente poderá ser utilizado como modelo para outros processos de transformação genética, necessitando posteriormente apenas da inserção do sgRNA na célula (Arazoe et al., 2015; Zheng et al., 2017). Outro método é o livre de vetor, inserindo na célula todo o complexo já formado fora da célula (enzima Cas9, crRNA:tracrRNA (sgRNA) disponível para venda no mercado, que tem como vantagem o fato de não ser necessário a expressão da enzima e do sgRNA dentro na célula, economizando tempo e minimizando a possibilidade de problemas na expressão *in vivo* (Nagy et al., 2017).

Neste trabalho optamos por utilizar vetor de expressão da enzima Cas9 e do sgRNA *in vivo*, assim como também utilizar cassetes para recombinação homóloga que permitissem a retirada dos genes de interesse (indol-acetaldeído desidrogenase presente no cromossomo 9 (*aldh 9*), monooxigenase (*yucca*) e indol-acetaldeído desidrogenase no cromossomo 2 (*aldh 2*), proporcionando à análise funcional pela ausência gênica, método que já mostrou ser eficiente em fungos filamentosos (Arazoe et al., 2015) e também consideramos mais barato comparado aos citados anteriormente. E segundo Zheng e colaboradores (2017), o uso de cassetes pode não apenas permitir a seleção dos transformantes, mas também potencializar a eficiência do processo de *knockout* no local de corte da Cas9.

O vetor de expressão carregando a Cas9 e os sgRNAs selecionados para uso neste trabalho apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando funcionalidade em *F. decemcellulare* após as alterações realizadas no promotor para viabilizar a expressão do sgRNA, conforme mencionado anteriormente na metodologia. Os sgRNAs específicos para cada gene alvo foram selecionados levando em consideração critérios comprovadamente bem-sucedidos em fungos filamentosos e outros organismos (Ran et al., 2013; Arazoe et al., 2015; Liu et al., 2017). Procuramos por sequências de sgRNA selecionadas pelo software sgRNAs9 (<https://sourceforge.net/projects/sgrnacas9/>), avaliando a localização da sequência alvo dentro de um exon, os sítios *Protospacer Adjacent Motif* - PAM (-NGG), e se o sgRNA a ser escolhido não tinha homologia em outra região do genoma, capaz de gerar mutação fora do alvo (*off-*

*target*), sendo considerado a posição e quantidade de *mismatch* (incompatibilidade de bases) nas sequências dos sgRNAs. Os sgRNAs escolhidos para os três genes (*aldh 9*, *yucca* e *aldh 2*) ficaram localizados mais ao centro dos genes alvo, com base no trabalho realizado por Arazoe et al (2015), que analisando quatro sgRNA os dois que apresentaram maior eficiência estavam localizados mais ao centro do gene alvo. E dentre as várias possibilidades de escolha do sítio PAM o escolhido foi -GGG, que de acordo com Ran et al (2013), Arazoe et al (2015) e Liu et al (2017) os sítios que apresentaram maior eficiência em seus experimentos foram os que apresentam no mínimo duas guaninas (-NGG). Estes são pontos importantes que necessitam de atenção e segundo Ran et al (2013) existe a possibilidade em raras ocasiões, dos sgRNAs não funcionarem por razões ainda desconhecidas, portanto, recomenda-se projetar pelo menos dois sgRNAs para cada locus e testar suas eficiências.

Além de termos dado bastante atenção a estes critérios, antes de trabalharmos com o sistema CRISPR/Cas9 foi pré-estabelecido um protocolo de transformação genética via protoplastos para o *F. decemcellulare*, conforme descrito no capítulo I, uma vez que, faltava um método de transformação eficaz para este fungo, já que os métodos atualmente estabelecidos se limitam a cepas modelo.

Depois de estabelecido um protocolo de transformação foi realizada a estratégia para nocautear genes em processos de transformação separadamente. Os resultados foram os seguintes: de três linhagens transformantes selecionadas no processo para silenciar apenas o gene *aldh 9* (transformantes T1, T2 e T3), destas três linhagens uma apresentou *knockout* gênico (T3); para o gene *yucca* resultado similar foi obtido; e de três linhagens transformantes do processo para o gene *aldh 2* (T1, T2 e T3) duas apresentaram *knockout* (T1 e T2), confirmados via PCR (Figura 1A, B e C). Confirmando assim, a viabilidade funcional dos métodos utilizados para construção dos sgRNA e o sucesso das alterações realizadas no vetor cedido por Arazoe e colaboradores, além da integração dos cassetes no genoma confirmados via PCR com os primers específicos.

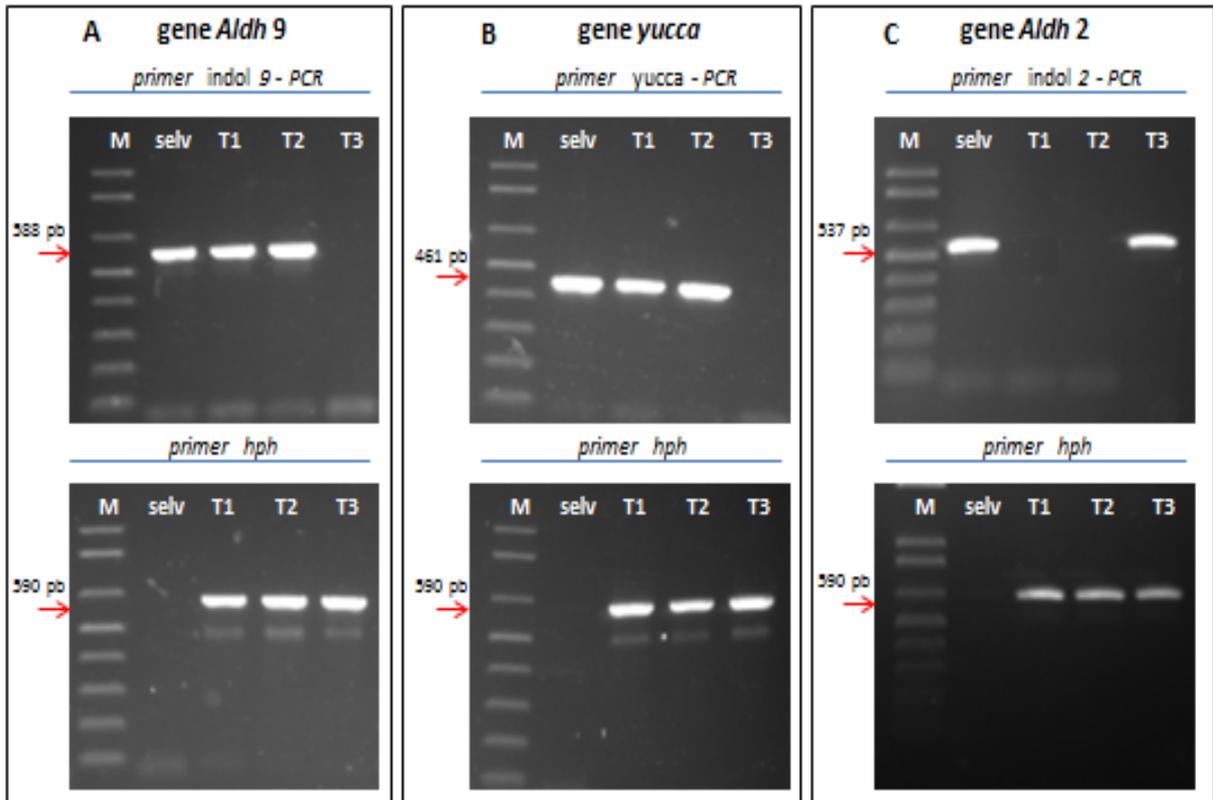


Figura 1: Caracterização molecular dos transformantes de *Fusarium decemcellulare* para análise de *knockout* e confirmação da integração do gene *hph* no genoma, na estratégia para obtenção separadamente de *knockout* gênico. Em A: gel superior amplificação do gene *aldh 9*, coluna 1 - M (marcador 1 Kb plus (Invitrogen)), coluna 2 – isolado selvagem (controle), coluna 3 e 4 – linhagens transformantes sem *knockout*, coluna 5 – linhagem transformante com *knockout*. Gel inferior amplificação do gene *hph*, coluna 1 - M, coluna 2 – isolado selvagem, coluna 3 - 5 – linhagens transformantes com e sem *knockout*; Em B: gel superior amplificação do gene *yucca* e inferior amplificação do gene *hph*, descrição similar a figura 1 A; Em C: gel superior amplificação do gene *aldh 2*, coluna 1 - M, coluna 2 – isolado selvagem, coluna 3 e 4 – linhagens transformantes com *knockout*, coluna 5 – linhagens transformantes sem *knockout*. Gel inferior amplificação do gene *hph*, coluna 1 - M, coluna 2 – isolado selvagem, coluna 3 - 5 – linhagens transformantes com e sem *knockout*.

No procedimento para obtenção de triplo *knockout* onde foram preparadas suspensões contendo os três diferentes vetores e os três diferentes cassetes foram selecionadas quatorze linhagens transformantes com resistência ao antibiótico higromicina, destas apenas quatro apresentaram recombinação homóloga (T6, T8, T12 e T14), com deleção de apenas um dos três genes alvo (Figura 2A, B e C), sendo que os transformantes T12 e T14 tiveram apenas o gene *aldh 9* com *knockout*, e o transformante T6 e o T8 tiveram somente o gene *aldh 2*. Não foram obtidas linhagens com *knockout* do gene *yucca* neste procedimento. Os demais transformantes (dez) apresentaram recombinação ectópica, uma vez que, possuíam a sequência do gene de resistência a higromicina, confirmado via PCR (Figura 2 D) e a sequência dos três genes alvo. Portanto, não foram obtidas linhagens com triplo *knockout*, conforme demonstrado na tabela 1.

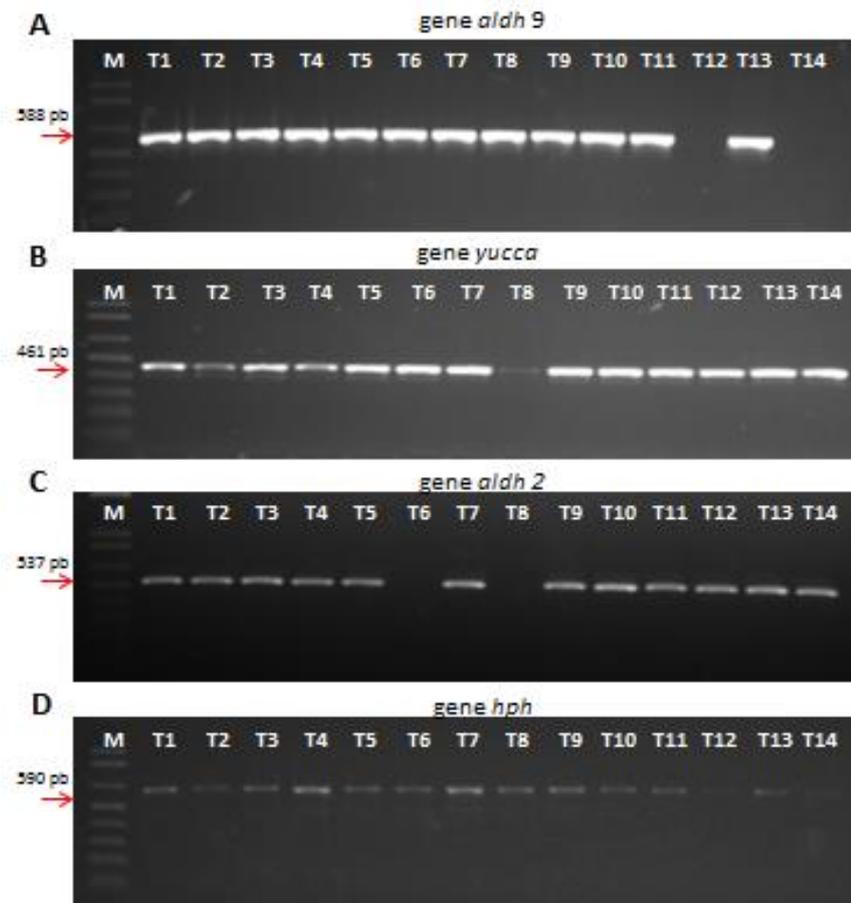


Figura 2: Caracterização molecular dos quatorze transformantes de *Fusarium decemcellulare* para confirmação de *knockout* e integração do gene *hph* no genoma, na estratégia para obtenção de triplo *knockout*. Em A: amplificação do gene *aldh 9*, coluna 1 - M (marcador 1 Kb plus (Invitrogen)), coluna 2 - 15 – transformantes, coluna 13 e 15 – transformantes com *knockout*; Em B: amplificação do gene *yucca*, coluna 1 - M, coluna 2 - 15 – transformantes sem *knockout*. Em C: amplificação do gene *aldh 2*, coluna 1 - M, coluna 2 - 15 – transformantes, coluna 7 e 9 – transformantes com *knockout*; Em D: amplificação do gene *hph*, coluna 1 - M, coluna 2 - 15 – transformantes com integração do gene que confere resistência a higromicina, colunas 7, 9, 13 e 15 transformantes com *knockout* por meio de recombinação. As demais colunas são transformantes com integração ectópica.

Tabela 1: Transformantes obtidos via estratégia de obtenção de *knockout* separadamente (separ.) e simultaneamente (simult.), com *knockout* único, duplo ou triplo nos genes alvo.

<i>Knockout</i>	Genes						Total <i>Knockout</i> / transf.
	<i>aldh 9</i>		<i>yucca</i>		<i>aldh 2</i>		
	separ.	simult.	separ.	simult.	separ.	simult.	
Único	1/3	2/14	1/3	0/14	2/3	2/14	8 / 23
Duplo	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Triplo	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Além de investigarmos a presença de *knockout* por meio da PCR foi realizado também o sequenciamento de DNA das linhagens transformantes nas regiões a montante e a jusante a

PAM onde foram desenhados os sgRNAs de cada gene alvo. Conforme mencionado anteriormente, este sistema além de possibilitar o *knockout* por meio da remoção ou interrupção de um gene utilizando cassetes, também pode silenciar gerando mutações na região de corte da Cas9. A quebra da dupla fita de DNA (DBS) causada pela Cas9 pode proporcionar a inserção e/ou deleção de nucleotídeos durante o período de ativação do sistema de reparo presentes em todas as células, capaz de unir extremidades não homólogas devido à ação do complexo de proteínas de reparo, Ku, com sua subunidade  $\Delta Ku70$  e  $\Delta Ku80$ , que promovem a união de extremidades não homólogas (NHEJ) (Ninomiya et al., 2004; Malavazi, 2007; Carvalho et al., 2010). No entanto, conforme alinhamento realizado comparando as sequências das linhagens transformantes a sequência do isolado selvagem, nenhuma das quatorze linhagens transformantes apresentaram mutação indel nas regiões analisadas (dados não mostrados). Assim como o sistema de reparo pode atuar de forma favorável, também pode proporcionar casos de recombinações ectópicas, o que pode justificar o alto índice neste trabalho de linhagens transformantes com recombinação ectópica.

Os resultados obtidos até o momento mostram que por algum fator ainda não identificado não foi possível a obtenção de linhagens com triplo nem duplo *knockout*, sendo necessária a realização de testes adicionais para obtermos mais informações, uma vez que, sabemos que tanto os cassetes, quanto os vetores com os sgRNAs e suas alterações são perfeitamente funcionais.

A recombinação homóloga ocorrida nas linhagens transformantes resultou em transformantes geneticamente estáveis, quando comparados ao isolado selvagem. Todos os oito transformantes apresentaram uniformidade quanto aos aspectos morfofisiológicos antes e após o teste de estabilidade mitótica, não apresentando alterações no desenvolvimento radial, nem na pigmentação e nem na produção de esporos quando cultivadas em meio BDA com antibiótico durante 10 dias.

Mesmo obtendo transformantes com *knockouts* únicos, estes serão avaliados futuramente quanto a influência na via de biossíntese do IAA, a fim de verificar se há alteração no nível de produção da auxina. Uma vez que, é comprovado que várias espécies de *Fusarium* podem sintetizar fitohormônios, como giberelinas (GAs) e auxinas (IAA), que contribuem para doenças em plantas (Troncoso et al., 2010; Tsavkelova et al., 2012; Niehaus et al., 2016).

## 8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

1 - O processo de transformação genética de *F. decemcellulare* para expressão das proteínas fluorescentes GFP e RFP por meio do método químico (PEG) foi realizado com sucesso, demonstrando ser um método eficiente para obtenção de linhagens transformantes de fungo.

2 - *Fusarium decemcellulare* coloniza o tomateiro e o guaranazeiro de forma sistêmica, sendo capaz de germinar, penetrar e colonizar todos os tecidos inoculados (gema, raque, caule e raiz), permanecendo por longos períodos na superfície dos tecidos inoculados. Além disso, infecta o guaranazeiro podendo causar além do superbrotamento a doença dieback observada pela primeira vez em guaranazeiro. As análises via microscopia eletrônica mostram detalhes da colonização em tecidos que ainda não haviam sido mostrados em nenhum trabalho que relata a patogenicidade deste fungo.

3- Apesar de não ter sido possível até o momento obtermos linhagens com triplo *knockout* para genes relacionados à produção de auxina, neste trabalho evidenciamos que o método de transformação genética por meio do sistema CRISPR/Cas9 é perfeitamente aplicável para silenciar genes e realizar análise de função gênica, pois apresenta resultados satisfatórios na tentativa de silenciar um único gene.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Adis, J.; Fonseca, O. J. M. and Strassen, R. Z. 1985. A *thrips* as vector of the “supersprouting” fungus disease in guarana plants of the Central Amazon. **Fitopatologia Brasileira**. v.10, p. 677-679.
2. Adu-Acheampong, R. K. 2009. Pathogen diversity and host resistance in dieback disease of cocoa caused by *Fusarium decemcellulare* and *Lasiodiplodia theobromae*. Agriculture. Entomology. Division of Biology. Imperial College London.
3. Adu-Acheampong, A. S.; Leather S. 2011. Resistance to dieback disease caused by *Fusarium* and *Lasiodiplodia* species in cacao (*theobroma cacao* L.) genotypes. **Expl Agric**, v. 48, ed. 1, p. 85-98.
4. Alexander J. V.; Carmichael N. M. 1973. Divergent patterns of ascus development in homothallic and heterothallic isolates of *Calonectria rigidiuscula*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, 100: 35-40.
5. Ângulo, S. M.; Villapudua, J. R. 1982. Buba of mango (*Mangifera indica* L.) in the state of Sinaloa, México: abstract the american phytopathological society. **Phytopathology**, v. 72, n. 1, p. 171.
6. Areia, C. A. 1965. Anatomia da folha do guaraná *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae). **Rodriguésia**. v. 25, n. 37, p. 297-305.
7. Araújo, J. C. A.; Pereira, J. C. R.; Gasparotto, L.; Arruda, M. R. 2006. O complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle. Disponível em: <[http://servicos.cpaembrapa.br/livraria/arquivos\\_gratis/ComTec\\_45\\_2006.pdf](http://servicos.cpaembrapa.br/livraria/arquivos_gratis/ComTec_45_2006.pdf)>. Acesso em: junho, 2017.
8. Arazoe, T.; Miyoshi, K.; Yamato, T.; Ogawa, T.; Ohsato, S.; Arie, T.; Kuwata, S. 2015. Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. **Biotechnol Bioeng**. v. 112, n.12, p. 2543-9.
9. Atroch, A. L. 2009. Avaliação e seleção de progênies de meios irmãos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) utilizando caracteres morfo-agronômicos, 2009. Tese (doutorado área de concentração Genética). UFAM/INPA.
10. Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S. & Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712.
11. Bastos, C. N.; Santos, A. O. 2001. Superbrotamento de inflorescências do limão-de-caiena causado por *Fusarium decemcellulare*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.232.
12. Batista, M. F.; Bolkan, H. A. 1982. Superbrotamento do guaranazeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 7, p. 315-317.

13. Belan L. L.; Rafael A. M. 2018. First Report of *Fusarium* Species Associated with *Fusarium* Wilt in *Coffea canephora* Plants in Brazil. **Department of Agronomy**. v. 102, n. 9, p. 1859. doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0186-PDN.
14. Bentes, J. L. S. 2000. Histologia da interação de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dissertação (Mestrado em fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa-UFV. Viçosa – MG.
15. Bentes, J. L. S.; Matsuoka, K. 2002. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**. 27: 071-077.
16. Bevis, B. J. and Glick, B. S. 2002. Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 83-87. DOI:10.1038/nbt0102-83.
17. Bhadauria, V.; Banniza, S.; Wei Y. D.; Peng, Y. L.; Peng, Y-L. 2009. Reverse Genetics for Functional Genomics of Phytopathogenic Fungi and Oomycetes. **Comp. Funct. Genom.** Review Article. p. 380-719. doi: 10.1155/2009/380719.
18. Brouns, S. J.; Jore, M. M.; Lundgren, M.; Westra, E. R.; Slijkhuis, R. J.; Snijders, A. P.; Dickman, M. J.; Makarova, K. S.; Koonin, E. V.; van der Oost, J. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science**. v.321, p. 960–96.
19. Brown, N. A.; Urban, M.; Van De Meene, A. M. L.; Hammond-Kosack, K. E. 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. **Fungal Biology**, v.114, p. 555-571.
20. Brunelli, K. R.; Athayde Sobrinho, C.; Cavalcanti, L. S.; Ferreira, P. T. O.; Camargo, L. E. A. 2005. Germinação e Penetração de *Stenocarpella macrospora* em Folhas de Milho. **Fitopatologia Brasileira**. v.30, p.187-190.
21. Bolotin, A.; Quinquis, B.; Sorokin, A.; Ehrlich, S. D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**. v.151, n.8, p.2551-2561.
22. Carvalho, N. D. S. P.; Arentshorst, M.; Kwon, M. J.; Meyer, V.; Ram, A. F. J. 2010. Expanding the *ku70* tool box for filamentous fungi: establishment of complementation vectors and recipient strains for advanced gene analyses. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.87, n.4, p.1463–1473.
23. Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**. v.263, n.5148, p.802–80.
24. CONAB, 2013. Proposta de Preços Mínimos, Safra 2013/2014 (Produtos de inverno, regionais e leite). Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_11\\_22\\_15\\_42\\_37\\_pm\\_imvero\\_13\\_14.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_imvero_13_14.pdf)>. Acessado em agosto, 2017.

25. CONAB, 2014. Guaraná – Análise mensal. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/guaranajunho2014>>. Acessado em agosto, 2019.
26. CONAB. Guaraná - Análise mensal. 2017. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_08\\_22\\_17\\_16\\_07\\_guarana\\_2\\_-\\_julho\\_de\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_22_17_16_07_guarana_2_-_julho_de_2017.pdf)>. Acessado em agosto, 2019.
27. CONAB. Guaraná - Análise mensal. 2020. Disponível em: <[https://www.conab.gov.br/guaraná-análise mensal-outubro 2020.pdf](https://www.conab.gov.br/guaraná-análise%20mensal-outubro%202020.pdf)>. Acessado em julho, 2021.
28. Cong, L.; Ran, F. A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P. D.; Wu X.; Jiang, W.; Marraffini, L. A.; Zhang, F. 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**. v. 339. p. 819–823.
29. Crowhurst, R. N.; Rees-George, J.; Rikkerink, E. H.; Templeton, M. D. 1992. High efficiency transformation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 2 (mating population V). **Curr Genet**. v. 21, n. 6, p. 463-9.
30. Crowdy, S. H. 1947. Observations on the pathogenicity of *Calonectria rigidiuscula* (Berk and Br.) Sacc. on *Theobroma cacao* L. **Ann. Appl. Biol.** p. 45-49.
31. Dalla P. M.; Camargo, L.E.A. 1997. Doenças do Cacaueiro (*Theobroma cacao*). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo. **Editora Agronômica Ceres**.
32. Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1990. Isolamento of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v. 12, p. 13-14.
33. Duarte, M. L. R.; Albuquerque, F. C. 1999. Doença da cultura do guaranazeiro. In: DUARTE, M. L. R. (Ed.). **Doenças de Plantas no Trópico Úmido Brasileiro: Plantas Industriais**. Belém – PA. **Embrapa Amazônia Oriental**. p. 89-121.
34. Dumas, B.; Centis, S.; Sarrazin, N.; Esquerré-Tugayé M. T. 1999. Use of Green Fluorescent Protein to Detect Expression of an Endopolygalacturonase Gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during Bean Infection. **Appl Environ Microbiol**. v. 65, n. 4, p. 1769–1771.
35. Elmer W. H.; Marra R. E. 2011. New species of *Fusarium* associated with dieback of *Spartina alterniflora* in Atlantic salt marshes. **Journal Mycologia**. v. 103, p. 806-819.
36. Escobar, J. R.; Corrêa, M. P. F.; Aguilera, F. J. P. 1983. Estruturas florais, floração e técnicas para polinização controlada do guaranazeiro. In: Simpósio brasileiro do Guaraná. Manaus. **Anais: EMBRAPA**, 1984a. p. 240-256.
37. Evert, R.F. 2007. Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body, their structure, function, and development. Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, US.

38. Farr, D.F.; Rossman, A.Y. 2014. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA, from /fungaldatabases.
39. Farr, D.F., & Rossman, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved October 17, 2017. Disponível: <<https://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases/>>. Acessado em 05/2019.
40. Ferreira, J. B.; Abreu, M. S. de; Alves, E.; Pereira, I. S.; Fernandes, K. D. 2009. Events of the infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves of *Coffea arabica* L. **Summa Phytopathologica**. v.35, n.4, p.273-281.
41. Fiume, F. 1994. Individuação de variedades de *Phaseolus vulgaris* L. e de *Phaseolus coccineus* L. com a resistência verso *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger. **Informatore Fitopatológico**. v. 44, p. 49-57.
42. Ford, E. J.; Bourret, J. A.; Snyder, W. C. 1967: Biologic specialization in *Calonectria rigidiuscula* in relation to green point gall of Cocoa. **Phytopathology**. v.57, n. 7, p. 710-712.
43. Fuller, K. K.; Chen, S.; Loros, J. J.; Dunlap, J. C. 2015. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic cell**. v. 14, n. 11, p. 1073-1080.
44. García-López E.; Mora-Aguilera J. A.; Hernández-Castro E.; Jiménez-Vásquez C. J.; Batista-Martínez C. M.; Serra C. 2017. First report of gall disease in mango trees caused by *Fusarium decemcellulare* in Dominican Republic. **Journal of Plant Pathology**. v. 99, n. 1, p. 287-304.
45. Garneau, J. E.; Dupuis, M. E.; Villion, M.; Romero D. A.; Barrangou R.; Boyaval, P., Fremaux, C.; Horvath, P.; Magadán, A. H., and Moineau, S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. **Nature**. v. 468, p. 67–71.
46. Gasparotto, L.; Pereira, J. C. R.; Araújo, J. C. A. 2006. Doenças de expressão econômica de culturas exploradas na Amazônia ocidental. **In: Fitopatologia Brasileira/Sociedade Brasileira de Fitopatologia**. v.1, n. 1.
47. Gonçalves, J.F. de C.; Santos-Junior, U.M. dos; Silva, J.F. da; Arruda, M.R. de; Bonates, L.C. de; Fernandes, A.V. 2006. Physiological and anatomical characteristics of leaves of two clones of guarana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 3, p. 393-398.
48. González-Lamothe, R.; Oirdi, M. E.; Brisson, N.; Bouarab, K. 2012. The Conjugated Auxin Indole-3-Acetic Acid–Aspartic Acid Promotes Plant Disease Development. **The Plant Cell**. 24, 762-777.
49. Guarro, J.; Gené, J. 1992. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. **Mycoses**. v. 35; n. 5-6; p. 109-14. doi.org/10.1111/j.1439-0507.1992.tb00830.x.

50. Guest D.; Keane P. 2007. Vascular-Streak Dieback: A New Encounter Disease of Cacao in Papua New Guinea and Southeast Asia Caused by the Obligate Basidiomycete *Oncobasidium theobromae*. **The American Phytopathological Society**. v. 97, n.12, p. 1654.
51. Gondim, C. J. E. 1978. Alguns aspectos da biologia reprodutiva do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dissertação, INPA/FUA, Manaus. 83p.
52. Grades, Z, E. 2014. Comparative studies on the infection and colonization of maize leaves by *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum* and *F. verticillioides*. Dissertação - Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz - Phytomedizin.
53. Guimarães, E.A. 2013. *Biologia Reprodutiva, Filogenia e patogenicidade de Fusarium decemcellulare*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. Brasil.
54. Guest, D.; Keane, P. 2007. Vascular-streak dieback: A new encounter disease of cacao in Papua New Guinea and Southeast Asia caused by the obligate basidiomycete *Oncobasidium theobromae*. **Phytopathology**. v. 97, p. 1654-1657.
55. Hardy, S.; Legagneux, V.; Audic, Y.; Paillard, L. 2010. Reverse genetics in eukaryotes. **Biology cellular**. v. 102, n. 10, p. 561-580.
56. IBGE, 2017. Disponível em: Acessado em maio, 2019. [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_02\\_13\\_15\\_29\\_28\\_castanha\\_de\\_caju\\_janeiro\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_13_15_29_28_castanha_de_caju_janeiro_2017.pdf).
57. IBGE, 2020. Produção de Guaraná. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/guarana/am>. Acessado em: julho/2021.
58. Imboden L.; Afton D.; Trail F. 2018. Surface interactions of *Fusarium graminearum* on barley. **Molecular plant pathology**. v. 19, n. 6, p.1332–1342.
59. Jerba, V. F.; Rodella, R. A. e Furtado, E. L. 2005. Estrutura foliar de feijoeiro e pré-infecção por *Glomerella cingulata*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.40, n.3, p.217-223.
60. Johal, G. S.; Gray, J.; Gruis, D.; Briggs, S. P. 1995. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant–fungal interactions. **Canadian Journal of Botany**. n.1, p. 468– 474.
61. Kazan, K.; Manners, J. M. 2009. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**. v. 14, n. 7, p. 373-382.
62. Kondo, S.; Ueda, R. 2013. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. **Genetics**. v. 195, n. 3, p. 715-721.
63. Kulkarni, G. B.; Sanjeevkumar, S.; Kirankumar, B.; Santoshkumar, M.; Karegoudar, T. B. 2013. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Fusarium delphinoides* Strain GPK, a Causal Agent of Wilt in Chickpea. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 169, p. 1292-1305.

64. Lagopodi, A. L.; Ram, A. F. J.; Lamers, G. E. M.; Punt, P. J.; Van den Hondel, C. A. M. J. J.; Lugtenberg, B. J. J. and Bloemberg G. V. 2002. Novel Aspects of Tomato Root Colonization and Infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Revealed by Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis Using the Green Fluorescent Protein as a Marker. **The American Phytopathological Society**. MPMI. v. 15, n. 2, p. 172–179.
65. Leite, B.; Schadeck, R. J. G. 1996. Micosporinas: a importância no processo de germinação de esporos em fungos. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília. v. 21, n. 2, p. 149 – 155.
66. Leslie & Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. **Blackwell Publishing**. Primeira edição.
67. Lima, W. P.; Carnevali, L. C. Jr.; Eder, R.; Costa Rosa, L. F.; Bacchi E. M.; Seelaender, M. C. 2005. Lipid metabolism in trained rats: effect of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clin Nutr**. v. 24, n. 6, p.1019-28.
68. Liu, R.; Chen, L.; Jiang, Y.; Zhou, Z.; Zou, G. 2015. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. **Cell Discov**. 1: 15007. doi: 10.1038/celldisc.2015.7.
69. Liu Q.; Gao R.; Li j.J.; Lin, L.; Zhao J.; Sun W. and Tian C. 2017. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. **Biotechnol Biofuels**. v. 10, n. 1. DOI: 10.1186/s13068-016-0693-9.
70. Lleras, E. 1983. Considerações distribuição geográfica e taxonômica do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) e taxa afins na Amazônia. In: Simpósio Brasileiro do Guaraná, Manaus. Anais. Manaus: EMBRAPA - UEPAE Manaus, p. 281-292.
71. Lobo, I. K. C. 2016. Análise do transcriptoma de *Fusarium decemcellulare* agente causal do superbrotamento em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, Brasil.
72. Mali, P.; Esvelt, K. M.; Church, G. M. 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nat Methods**. v. 10, n. 10, p. 957–963.
73. MA, LI-JUN et al. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**. v. 464, n. 7287, p. 367-373.
74. Mafia, R. G; Alfenas, A. C.; Ferreira, E. M.; Andrade, G. C.G.; Vanetti C. A. & Binoti, D. H.B. 2009. Effects of leaf position, surface, and entry sites on *Quambalaria eucalypti* infection in eucalypt. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 003-009.
75. Makarova, K. S.; Haft, D. H.; Barrangou, R.; Brouns, S. J.; Charpentier, E.; Horvath, P.; Van der Oost, J. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, n. 6, p. 467-477.
76. Malaguti, G.; Reyes, C. 1964. A gall disease of cacao and mango in Venezuela caused by *Calonectria rigidiuscula*. **Phytopathology**. Santin Paul, v. 54, p. 499-500.

77. Malavazi, I. 2007. Caracterização funcional de diferentes componentes das vias metabólicas de respostas ao dano ao DNA no fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. Tese (Doutorado em Biociências aplicadas a farmácia) Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas a farmácia. Universidade de Ribeirão Preto - São Paulo.
78. Martins, J.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**. v. 17, n. 337(6096), p. 816-21. doi: 10.1126/science.1225829.
79. Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. **Science**. v. 322, p. 1843–1845.
80. Matos, K. S.; de Almeida, L. B.; Nascimento, A. R.; Hanada, R. E.; da Silva, G. F. 2016. Inflorescence Oversprouting and Vascular and Rachis Necrosis Caused by *Fusarium decemcellulare* in *Anacardium occidentale* in Brazil. *Plant disease*. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-16-0015-PDN>>. Acesso em: junho/2016.
81. Meija, L. C.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Van Bael, S.; Arnold, E. A.; Hebbbar, P.; Samuels, G. J.; Robbins, N.; Herre, E. A. 2008. Endophytic as biocontrol agentes of *Theobroma cacao* pathogens. **Biocontrol**, v. 46, n. 1, p. 4-14.
82. Miao, V. P. W.; Rountree, M. R.; Selker, E. U. 1995. Ectopic Integration of Transforming DNA is Rare Among *Neurospora* Transformants Selected for Gene Replacement. **Genetics**. v.139, p.1533-154.
83. Michiles, R. 2014. A Cadeia Produtiva do Guaraná: Um Estudo com o Guaraná no Município de Maués. (Tese) Doutorado em Biotecnologia, Universidade do Estado do Amazonas-UFAM, Manaus-AM, Brasil.
84. Moradi, S.; Sanjarian, F.; Safaie, V.; Mousavi, M. and Khaniki, G. R. B. 2013. A modified method for transformation of *Fusarium graminearum*. **J. Crop Prot.** v. 2, n. 3, p. 297-304.
85. Muhammed, M.; Anagnostou, T.; Desalermos, A.; Kourkoumpetis, T. K.; Carneiro, H. A.; Glavis-Bloom, J. et al. 2013. *Fusarium* infection: report of 26 cases and review of 97 cases from the literature. **Medicine (Baltimore)**. v. 92, p. 305–16.
86. Nagy, g.; Szebenyi, C.; Csernetics, A.; Vaz, M. G.; Tóth, E. J.; Vágvölgyi, C.; Papp, T. 2017. Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. **Scientific Reports**. DOI:10.1038/s41598-017-17118-2.
87. Nascimento -Filho, F.J. do; Atroch, A. L.; Sousa, N. R.; Garcia, T.B.; Cravo, M. da S.; Coutinho, E.F. 2001. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 501-506.
88. Nascimento Filho, F. J. 2003. Interação genótipos x ambientes, adaptabilidade, estabilidade e repetibilidade em clones de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke). (Tese - doutorado). Universidade Federal de viçosa - Minas Gerais/Brasil.

89. Niehaus E-M.; Münsterkötter M.; Proctor R. H.; Brown D. H.; Sharon, A.; Idan Y.; Oren-Young L.; Sieber C. M.; Novák O.; Pěnčík. 2016. A Comparative “Omics” of the *Fusarium fujikuroi* Species Complex Highlights Differences in Genetic Potential and Metabolite Synthesis. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 11, p. 3574–3599. doi.org/10.1093/gbe/evw259.
90. Ninomiya, Y.; Suzuki, K.; Ishi I.; Chizu, I.; Inoue, H. 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. **PNAS**. v. 101, n. 33, p. 12248–12253.
91. Oliveira, E. R. N. 2010. Características morfofisiológicas e bioquímicas de clones de guaraná *Paullinia cupana* Kunt. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke cultivados sob plantio comercial na Amazônia. Tese (Doutorado em Botânica). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus-AM, Brasil.
92. Oliveira, M. L.; Luz E. D. M. N. 2005. Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil. Cap.X; Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. p. 132.
93. O'Donnell, K.; Kistler, H.C.; Cigelnik, E.; Ploetz, R. C. 1997. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Whashington, v. 95, p. 2044-2049.
94. Oren, L.; Ezrati, S.; Cohen, D.; Sharon, A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides* maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 3, p. 1695-1701.
95. Ortiz, E.; Cruz, M.; Melgarejo, L.M.; Marquínez, X.; Hoyos-Carvajal, L. 2014. Histopathological features of infections caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in purple passionfruit plants (*Passiflora edulis* Sims). **Summa Phytopathologica**, 40:134-140.
96. Pascholati, S. F.; Leite, B. 1994. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: Luz, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 2, p.1-52.
97. Peberdy, J. F.; Buckley, C. E.; Daltrey, D. C.; Moore, P. M. 1976. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 67, n.1, p. 23-26.
98. Pedrozo, R. 2009. Transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com os genes marcadores GFP and DsRed. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Lavras - UFLA.
99. Pereira, J. C. R. 2007. Avaliação da Resistência ao Superbrotamento em Clones de Guaranazeiro. In: Pereira, J. C. R.; Arruda, M. R. Eds. *Pesquisa com guaranazeiro na Embrapa Amazônia Ocidental: status atual e perspectivas*. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p. 35 - 39.

100. Ploetz, R. 1996. First Report of *Fusarium decemcellulare* as a Pathogen of Mango in the United States. **The American Phytopathological Society**. DOI: 10.1094/PD-80-1207C.
101. Ploetz, R. C. 2007. Cacao diseases: Important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**. v. 97, p. 1634-1639.
102. Poletto, I.; Muniz, M. F. B.; Ceconi, D. E.; Santin, D.; Weber, M. N. D.; Blume, E. 2006. Zoneamento e Identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguari*). **Ciência Florestal**. v. 16, n. 1, p. 1-10.
103. Queiroz, C. A. 2016. Diversidade e estrutura genética da população de *Fusarium decemcellulare* isolado de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis*). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade do Estado do Amazonas-UFAM, Manaus-AM, Brasil.
104. Queiroz, C. A.; Matos, K. da S.; Lobo, I. K. C.; Sousa, S. B.; Muniz, C. R.; Yamagishi, M. E. B.; Zocolo, G. J.; Hanada, R. E.; Gasparoto, L.; Sousa, N. R.; Andrade, E. V.; Cordeiro, I. B.; Melo, A. A. M.; Silva, G. F. 2020. Morpho-Anatomical and Molecular Characterization of the Oversprouting Symptoms Caused by *Fusarium decemcellulare* in Guarana Plants (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Tropical Plant Biology**. v. 13, p. 274–286. Doi.org/10.1007/s12042-020-09256-1.
105. Ran, F. A.; Hsu, P. D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p.2281. Doi:10.1038/nprot.2013.143.
106. Rossman, A. Y. et al., 1999. Genera of bionectriaceae and nectriaceae (Hypocreaceae, Ascomycetes). **Studies in Mycology**. Wageningen, v. 42, p.260.
107. Sarroco, S.; Falaschi, N.; Vergara, M.; Nicoletti, F.; Vannacci, G. 2007. Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots. **Journal Plant Pathology**, Pisa, v.89, n.1, p.61–68.
108. Schawartz, J.L.; Patterson, G.H. 2003. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. **Science**, v.300, n. 5616, p. 87-91.
109. Schnetzler B. N.; Teixeira S. P. and Marinho C. R. 2017. Trichomes that secrete substances of a mixed nature in the vegetative and reproductive organs of some species of Moraceae. **Acta Botanica Brasilica**. v. 31, n. 3, p. 392-402. doi: 10.1590/0102-33062016abb0293.
110. Seung-Yeol L.; Su-Jin P.; Jae-Jin L.; Chang-Gi B.; Leonid N.; Hee-Young J. 2017. First Report of Fruit Rot Caused by *Fusarium decemcellulare* in Apples in Korea. **Mycol.** v.45, n. 1, p. 54-62. doi.org/10.4489/KJM.20170006.
111. Serrato-Diaz, L. M.; Perez-Cuevas, M.; Rivera-Vargas, L. I.; Goenaga, R.; French-Monar, R. D. 2015. First Report of *Fusarium decemcellulare* Causing Inflorescence Wilt

- and Vascular and Flower Necrosis of Rambutan (*Nephelium lappaceum*), Longan (*Dimocarpus longan*), and Mango (*Mangifera indica*). **Plant disease**, v. 99, n. 8, p. 1187.
112. Sfalain, E. 2012. Caracterização morfológica e molecular de *Fusarium decemcellulare*, agente etiológico da galha - floral em cacaueiro. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, Brasil.
  113. Silva, S. D. V. M. 1997. Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacaueiro a *Crinipellis pernicioso*. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, Brasil.
  114. Silva, F. M. E.; Kress, M. R. V. Z.; Savoldi, M; Goldman, M. H. S.; Härtl, A.; Heinekamp, T.; Brakhage, A.; Goldman, G. H. 2006. The akuBKU80 mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 207–211. Doi: 10.1128/EC.5.1.207-211.
  115. Silva, A. C. B.; Brosler, E. M.; Almeida, L. B.; Reia, M. Y.; Morato, R. W. 2018. A cadeia de valor do guaraná de Maués. **IDESAM**. p. 82; ISBN 978-85-64371-34-7.
  116. Siqueira, C. S. 2009. Transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores GFP e DsRed e patogenicidade dos transformados em sementes de milho. Dissertação (Mestrado em Patologia de Sementes). Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.
  117. Somavilla, L. L.; Prestes, A. M. 1999. Identificação de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.416-421.
  118. Sook-Young P.; Min-Hye J.; Hai-Ying W.; Jung A. K.; Nan-Hee Y.; Sungbeom K.; Yong Hwa C.; Seogchan K.; Yong-Hwan L.; Jae-Seoun H. 2013. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of the Lichen Fungus, *Umbilicaria muehlenbergii*. **PLoS One**. v. 8, n. 12. doi: 10.1371/journal.pone.0083896. PMID: PMC3875497.
  119. Srivastava S.K.; Huang X.; Brar H.K.; Fakhoury A.M.; Bluhm B.H. et al. 2014. The Genome Sequence of the Fungal Pathogen *Fusarium virguliforme* That Causes Sudden Death Syndrome in Soybean. **PLoS ONE**. v. 9(1).
  120. Staswick, P. E.; Serban, B.; Rowe, M.; Tiryaki, I.; Maldonado, M. T.; Maldonado, M. C.; Suza, W. 2005. Characterization of an Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. **The Plant Cell**, 17: 616-627.
  121. Suframa – Superintendência da Zona Franca de Manaus, 2003. Projeto Potencialidades regionais de Viabilidade Econômica – Guaraná. Manaus - Am, Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio. Disponível em: <[http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj\\_pot\\_regionais/guarana.pdf](http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/guarana.pdf)>. Acessado em: junho/2019.

122. Stangarlin, J. R.; Kuhn, O. J.; Toledo, M. V.; Portz, R. L.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Pascholati, S. F. 2011. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 10, n 1, p 18-46.
123. Stephens, A. E.; Gardiner, D. M.; White, R. G.; Munn, A. L. & Manners, J. M. 2008. Phases of Infection and Gene Expression of *Fusarium graminearum* During Crown Rot Disease of Wheat. **MPMI**. v. 21, n. 12, p. 1571–1581.
124. Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Pascholati, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.
125. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol**. v. 30, n. 12, p. 2725-9. Doi: 10.1093/molbev/mst197.
126. Tavares, A. M.; Garcia, M. V.; Nascimento-Filho, F. J. 2007. Tripes do guaranazeiro: Estado atual e perspectivas. Comunicado técnico 52 Embrapa CPAA. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/64226/1/ComTec-52-2007.pdf>>. Acessado em: julho/2017.
127. Tierney, M. B.; Lamour, K. H. 2005. An Introduction to Reverse Genetic Tools for Investigating Gene Function. **The Plant Health Instructor**. DOI: 10.1094/PHI-A-2005-1025-01.
128. Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680.
129. Troncoso, C.; González, X.; Bomke, C.; Tudzynski, B.; Gong, F.; Hedden, P.; Rojas, M. C. 2010. Gibberellin biosynthesis and gibberellin oxidase activities in *Fusarium sacchari*, *Fusarium konzum* and *Fusarium subglutinans* strains. **Phytochemistry**, v. 71, p.1322–1331. Doi:10.1016/j.phytochem.2010.05.006.
130. Tsavkelova, E.; Oeser, B.; Oren-Young, L.; Israeli, M.; Sasson, Y.; Tudzynski, B.; Sharon, A. 2012. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, p. 48-57.
131. Valdez, N.; Karlovsky, P.; Dobrindt, L.; Hoque, M.; Sarker, R.; Tantau, H.; Mühlbach, H. 2013. Role of bacteria in dieback disease of dalbergia sissou roxb. **Bangladesh J. Bot.** v.42, n. 1; p. 1-16.
132. Van der Does, H. C.; Constantin, M. E.; Houterman, P. M.; Takken, F. L. W.; Cornelissen, B. J. C.; Haring, M. A.; Van der Burg, H. A.; Rep, M. 2019. *Fusarium oxysporum* colonizes the stem of resistant tomato plants, the extent varying with the R-gene present. **Eur J Plant Pathol**. v. 154, p. 55-65.

133. Visser, M.; Gordon, T. R.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M.J.; Viljoen, A. 2004. Transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causal agent of *Fusarium* wilt of banana, with the green fluorescent protein (GFP) gene. **Australasian Plant Pathology**, v.33, p. 69-75.
134. Wang, Y. X.; Chen, J. Y. 2015. First Report of Canker of *Magnolia denudata* Caused by *Fusarium decemcellulare* in Hubei, China. **Plant Disease**. v. 99, n.7, PDIS-11-14-1111
136. Wu, Lei; Wang, X.-M.; Xu, R.-Q.; Li, H.-J. 2011. Root Infection and Systematic Colonization of DsRed-Labeled *Fusarium verticillioides* in Maize. **Acta Agron Sin.** v. 37, n.5, p.793–802.
137. Xiao, R. F.; Zhu, Yu J.; Li Yan, D.; Liu Bo. 2013. Studies on vascular infection of *Fusarium f. sp. cubense* race 4 in banana by field survey and green fluorescent protein reporter. **ESci Journal of Plant Pathology**. v 02, n. 01, p 44-51.
138. Yang, S.; Zhang, Q.; Guo, J.; Charkowski, A. O.; Glick, B. R.; Ibekwe, M.; Cooksey, D. A.; Yang, C. H. 2007. Global Effect of Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis on Multiple Virulence Factors of *Erwinia chrysanthemi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1079-1088.
139. Yan-Xiang, Q.; Jin-Ji, P.; Xin Zhang; He, Z.; Ying, L.; Qun-Fang, Y.; Hui-Qiang, Z.; Yi-Xian, X. 2013. First Report of Dieback of Mango Caused by *Fusarium decemcellulare* in China. **J. Phytopathol.** v.161, p.735–738.
140. Walter, S.; Nicholson, P.; Doohan, F. M. 2009. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. **New Phytologist**. v. 185: p. 54–66. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x.
141. Wang, Y; Cheng, X.; Shan, Q.; Zhang, Yi.; Liu, J.; Ga, C. e Qiu, J.-L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**. 32, 947–951.
142. Wang F., Wang C., Liu P., Lei C., Hao W., Gao Y., et al. 2016. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. **PLoS ONE** 11: e0154027 10.1371/journal.pone.015402.
143. Zambenedetti M. E.B., Alves, E. & Araújo, D.V. 2007. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 156-160.
144. Zheng Y. M.; Lin F. L.; Gao H.; Zou G.; Zhang J. W.; Wang G.; Chen G.; Zhou Z.; Yao X. and Hu D. Development of a versatile and conventional technique for gene disruption in filamentous fungi based on CRISPR-Cas9 technology. **Scientific Reports**. v.7, p. 9250. Doi:10.1038/s41598-017-10052-3.