

PROJETO ARCA

Suscetibilidade Epigenética do Tomate ao Cladosporium

Protocolo de Investigação Molecular e Estratégia de Resistência
utilizando Oxford Nanopore MinION como plataforma analítica

Welson Perli Pereira

Projeto ARCA | Bahia, Brasil | Junho de 2026

1. O CLADOSPORIUM E A PLANTA DE TOMATE

1.1 O Que é o Cladosporium

Cladosporium fulvum (sin. Passalora fulva) é um fungo biotrófico que causa a Pinta Preta do Tomateiro, uma das doenças fúngicas mais prevalentes em cultivos de tomate no Brasil. Ao contrário de fungos necrótrofos que matam o tecido imediatamente, o Cladosporium é biotrófico — ou seja, mantém as células vivas enquanto extrai nutrientes, o que o torna especialmente difícil de combater.

Característica	Detalhe
Nome científico	Cladosporium fulvum / Passalora fulva
Tipo	Fungo biotrófico — mantém células vivas
Sintomas	Manchas amarelas na face superior + esporos oliváceos na face inferior das folhas
Condição favorável	Umidade > 85% e temperatura entre 20–25°C
Impacto produtivo	Redução de 30–70% na produção em surtos severos
Controle convencional	Fungicidas triazóis e estrobilurinas — resistência crescente

1.2 Por Que Algumas Plantas São Suscetíveis

A suscetibilidade ao Cladosporium não é simplesmente uma questão de 'ter ou não ter o gene de resistência'. Em muitos casos, a planta possui os genes necessários para se defender — mas eles estão epigeneticamente silenciados. Isso é uma distinção fundamental:

Tipo de Suscetibilidade	Causa	Reversível com RFS?
Genética	Ausência do gene Cf (Cladosporium resistance) no DNA	Não — requer cruzamento
Epigenética	Gene Cf presente mas hipermetilado (silenciado)	✓ Sim — seleção progressiva
Induzida pelo fungo	Cladosporium secreta efetores que suprimem a defesa ativamente	✓ Sim — com pressão controlada
Ambiental	Estresse hídrico ou nutricional suprime a resposta imune da planta	✓ Sim — com manejo do solo

INSIGHT CHAVE PARA O PROJETO ARCA

A maioria das variedades crioulas de tomate do Nordeste provavelmente possui os genes de resistência ao Cladosporium – mas anos de cultivo

em condições de baixo estresse fúngico podem ter silenciado esses genes por hipermetilação. O RFS com pressão controlada do fungo pode REATIVAR essa resistência epigeneticamente ao longo de poucas gerações.

2. MECANISMO MOLECULAR DA SUSCETIBILIDADE

2.1 Os Genes de Resistência ao Cladosporium

O tomate (*Solanum lycopersicum*) possui uma família de genes Cf (*Cladosporium fulvum* resistance) que codificam proteínas receptoras capazes de reconhecer proteínas efetoras do fungo (chamadas Avr — avirulência). Quando o receptor Cf reconhece o efector Avr correspondente, dispara uma cascata de defesa que mata as células infectadas antes que o fungo se espalhe.

Gene/Proteína	Função	O que acontece se silenciado
Cf-2, Cf-4, Cf-9	Receptores NBS-LRR que reconhecem efetores Avr do fungo	Planta fica 'cega' — não detecta a infecção
PR-1 (Pathogenesis-Related 1)	Proteína antifúngica direta — marca sistêmica de defesa	Defesa química suprimida
PR-2 (β -1,3-glucanase)	Destrói a parede celular do fungo	Fungo se espalha sem barreira
PR-5 (Taumatina)	Permeabiliza membranas do fungo	Fungo sobrevive ao ataque
JAZ / COI1 (via Jasmônico)	Sinalização de resposta a fungos necrótrofos e biotrófos	Cascata de defesa não é ativada
NPR1 (via Salicílico)	Amplificador sistêmico da resposta imune	Resistência sistêmica adquirida bloqueada
WRKY22 / WRKY29	Fatores de transcrição que ativam genes PR	Genes de defesa não são transcritos

2.2 Como o Cladosporium Suprime Ativamente a Defesa

O *Cladosporium* não é passivo — ele secreta proteínas efetoras especificamente para suprimir a imunidade da planta. Entender esses mecanismos é essencial para desenvolver resistência durável:

Efector do Fungo	Alvo na Planta	Efeito
Avr2	Protease Rcr3 do tomate	Inibe enzimas de defesa da planta
Avr4	Quitina da parede do próprio fungo	Protege o fungo de quitinases da planta
Avr9	Receptor Cf-9	Manipula sinalização — provoca necrose excessiva
Ecp1, Ecp2, Ecp5	Espaço apoplástico (entre células)	Suprime resposta imune local
Ecp6	Quitina liberada durante infecção	Bloqueia reconhecimento do fungo pelo

		sistema imune
--	--	---------------

2.3 O Mapa Epigenético da Suscetibilidade

Com o MinION, é possível mapear exatamente quais genes estão silenciados por metilação em plantas suscetíveis versus resistentes. Este é o mapa esperado:

COMPARAÇÃO EPIGENÉTICA ESPERADA		
GENE	PLANTA SUSCETÍVEL	PLANTA RESISTENTE
Cf-4 / Cf-9	Hipermetilado ✗	Hipometilado ✓
PR-1	Hipermetilado ✗	Hipometilado ✓
PR-2	Hipermetilado ✗	Hipometilado ✓
PR-5	Hipermetilado ✗	Hipometilado ✓
JAZ (via JA)	Metilado – inativo ✗	Ativo ✓
NPR1 (via SA)	Metilado – inativo ✗	Ativo ✓
WRKY22/29	Silenciados ✗	Expressos ✓
Lignificação	Subexpresso ✗	Superexpresso ✓
Padrão geral: suscetível = excesso de metilação nos genes de defesa		

3. PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO COM MinION

3.1 Delineamento Experimental

O estudo compara três grupos para identificar as diferenças epigenéticas responsáveis pela suscetibilidade:

Grupo	Descrição	N amostras	O que revelar
Grupo A — Suscetível	Variedade crioula com histórico de perda por Cladosporium	10 plantas	Padrão de metilação de planta vulnerável
Grupo B — Resistente	Variedade com resistência natural conhecida (ex: Yoshimatsu)	10 plantas	Padrão de metilação de planta protegida
Grupo C — Induzida	Grupo A exposto a Cladosporium por 3 gerações (RFS)	10 plantas/geração	Evolução epigenética da resistência

3.2 Protocolo de Coleta

Material Vegetal

- Coletar folhas jovens (3ª e 4ª folha do ápice) — máxima atividade epigenética
- Coletar no mesmo horário do dia (7–9h da manhã) — ritmo circadiano afeta metilação
- Congelar imediatamente em nitrogênio líquido — preserva estado epigenético
- Para sementes: protocolo CTAB modificado conforme documentação ARCA (Maio/2026)

Inoculação Controlada com Cladosporium (Grupo C)

- Preparar suspensão de esporos: 1×10^5 conídios/mL em água destilada + 0,05% Tween 20
- Inocular por pulverização abaxial (face inferior das folhas) — porta de entrada natural
- Manter câmara úmida 48h após inoculação (umidade > 90%)
- Temperatura: 22°C — condição ótima de infecção
- Avaliar severidade 14 dias após inoculação (escala de 0–5)
- Selecionar plantas com menor severidade para próxima geração (pressão RFS)

3.3 Sequenciamento e Análise

Etapas	Ferramenta	Output
Extração DNA folhas	CTAB ou DNeasy Plant (Qiagen)	DNA $\geq 1 \mu\text{g}$, A260/A280 > 1.8

Sequenciamento	MinION + Ligation Kit SQK-LSK114	Reads longos com info de metilação
Deteção de metilação	Dorado + DeepPlant (2025)	Mapa de 5mC em todo genoma
Mapeamento	Minimap2 ao genoma SL4.0 (tomate)	Localização cromossômica das marcas
Análise diferencial	DSS ou methylKit (R)	Regiões diferencialmente metiladas (DMRs)
Visualização	IGV + R ggplot2	Gráficos de metilação por gene
Correlação fenótipo	R cor.test / linear models	Relação metilação × severidade Cladosporium

3.4 Análise do Solo Associado

Paralelamente ao perfil epigenético da planta, analisar o solo onde ela cresceu revela se a comunidade microbiana está contribuindo para a suscetibilidade ou resistência:

O que buscar no solo	Como interpretar	Ação de manejo
Alta abundância de Cladosporium spp.	Pressão inóculo do patógeno no solo	Trichoderma + biochar para supressão
Baixa abundância de Trichoderma	Ausência do supressor natural	Inoculação com T. harzianum nativo
Baixo ratio F:B (< 0.3)	Solo desequilibrado, favorece patógenos	Aumentar matéria orgânica e diversidade
Deficiência de silício disponível	Silício fortalece parede celular do tomate	Aplicar silicato de potássio foliar
Baixo pH (< 5.5)	Favorece fungos patogênicos em geral	Calagem + inoculação micorrízica

4. ESTRATÉGIA RFS PARA RESISTÊNCIA AO CLADOSPORIUM

4.1 A Lógica da Seleção Epigenética

Se a suscetibilidade é epigenética — genes de resistência silenciados por metilação —, então a exposição controlada ao Cladosporium ao longo de gerações pode progressivamente desmetilar esses genes, criando resistência herdável sem modificação genética.

MECANISMO DA SELEÇÃO EPIGENÉTICA POR PRESSÃO FÚNGICA
Geração F1 (original – suscetível) Genes PR, Cf-4, WRKY22 hipermetilados → planta não defende Cladosporium causa 60–70% de dano Selecionar as 10–20% plantas menos afetadas → sementes F2
Geração F2 (1º ciclo de pressão) Plantas selecionadas já têm leve desmetilação nos genes de defesa Cladosporium causa 40–50% de dano (redução mensurável) Selecionar novamente as menos afetadas → sementes F3
Geração F3 (2º ciclo de pressão) Desmetilação progressiva dos genes PR e Cf Cladosporium causa 20–30% de dano MinION confirma: genes de defesa mais hipometilados
Geração F4 (3º ciclo de pressão) Resistência epigenética consolidada – herdável Cladosporium causa < 15% de dano PUBLICAÇÃO: primeira variedade crioula brasileira com resistência epigenética documentada ao Cladosporium

4.2 Cronograma de Implementação

Fase	Período	Atividade	Resultado Esperado
Fase 0 — Baseline	Mês 1–2	Sequenciar F1 suscetível e resistente — mapear diferenças epigenéticas	Identificar DMRs diagnósticas de suscetibilidade
Fase 1 — Pressão	Mês 3–8	Inocular F1 com Cladosporium, selecionar sobreviventes, colher sementes F2	F2 com leve melhora de resistência
Fase 2 —	Mês 9–16	Repetir pressão em F2, sequenciar	Confirmar desmetilação

Validação		F2 com MinION, comparar com F1	dos genes alvo
Fase 3 — Consolidação	Mês 17–24	F3 com pressão, sequenciamento F3, comparação longitudinal F1 → F3	Resistência epigenética estável e publicável
Fase 4 — Expansão	Ano 3+	Escalar para outras variedades ARCA, criar banco de sementes resistentes	Portfólio de variedades com resistência documentada

4.3 Marcadores Epigenéticos para Seleção Precoce

Uma vez identificadas as DMRs (regiões diferencialmente metiladas) associadas à resistência, é possível usar o MinION como ferramenta de triagem — selecionar plantas resistentes antes de inocular o fungo, economizando tempo e recursos:

FLUXO DE SELEÇÃO PRECOCE BASEADA EM EPIGENÉTICA

1. Extrair DNA de plântulas (7–14 dias após germinação)
2. Sequenciar rapidamente com Rapid Kit (10 min de preparo)
3. Verificar status de metilação dos genes Cf-4 e PR-1
 - Hipometilado = candidata a resistente → manter
 - Hipermetilado = provável suscetível → descartar OU usar como material para pressão RFS
4. Plantar apenas as candidatas resistentes na lavoura
5. Manter as suscetíveis em protocolo de pressão controlada

Resultado: redução de 60–80% no uso de fungicida preventivo
seleção em 7–14 dias (antes do estágio de transplante)

5. CUSTOS E POTENCIAL CIENTÍFICO

5.1 Custo do Protocolo Completo

Item	Custo (USD)	Observação
MinION Mk1D (se ainda não adquirido)	\$3.150	Equipamento único
Flowcells R10.4.1 (1 por grupo × 3 gerações = 9)	\$4.500–6.300	Custo principal
Kits Ligation SQK-LSK114 (9 kits)	\$1.350	\$150 cada
Reagentes extração DNA foliar	\$300	DNeasy Plant ou CTAB
Inóculo Cladosporium (laboratório)	\$200–500	Cepa certificada ESALQ ou EMBRAPA
Câmaras de inoculação / umidificadores	\$300–600	Reutilizável
Análise bioinformática (se terceirizada)	\$500–1.500	Ou colaboração universitária
TOTAL ESTIMADO	\$10.300–14.400	Para 3 gerações completas

5.2 Publicações Científicas Potenciais

Título Potencial	Periódico Alvo	Impacto
Epigenetic Basis of Cladosporium Susceptibility in Brazilian Heirloom Tomato Varieties	Molecular Plant Pathology (IF 4.8)	Primeiro estudo epigenético de resistência fúngica em variedades crioulas BR
Progressive Epigenetic Resistance to Cladosporium fulvum Through Participatory Seed Selection	Plant Cell & Environment (IF 6.1)	Valida RFS como método de indução de resistência epigenética
Soil Microbiome Modulates Epigenetic Defense Responses Against Foliar Fungal Pathogens in Tomato	ISME Journal (IF 10.8)	Conecta metagenômica do solo com epigenômica foliar — inovação metodológica

5.3 Aplicação Prática para Agricultores da Rede ARCA

- Diagnóstico epigenético de sementes antes do plantio — R\$50–150 por análise
- Protocolo de seleção para resistência ao Cladosporium sem fungicida
- Inoculante de Trichoderma nativo adaptado ao semiárido baiano
- Calendário de manejo preventivo baseado em clima + perfil do solo
- Banco de sementes com resistência documentada e rastreável por geração

