

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A  
*Pythium dissotocum* EM ARABIDOPSIS E TOMATE**

Ana Paula Trivilin  
Bióloga/UNISINOS

Tese apresentada como um dos requisitos  
para obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia  
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Julho de 2012



## DEDICO

*Aos meus pais, Alcides e Neiva meu eterno agradecimento pelo apoio incondicional, pelo carinho, por sempre terem acreditado em mim e pela grandeza com que souberam estar presentes valorizando cada conquista.*

*Ao Rodrigo, meu muito obrigado, quando mais precisei sua compreensão e amor preencheram meus dias de ausências necessárias. Agradeço-lhe pelo seu carinho, cumplicidade e paciência, por compartilhar dos meus sonhos e ideais. Por muitas vezes se fez presente com uma simples palavra, um gesto ou até mesmo com um olhar me fazendo perceber que sou capaz.*

*Aos meus irmãos, Daniel, Sandra e Fábio e os meus sobrinhos, Júnior, Leticia, Anthony e Júlia, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

À minha família pelo apoio em todos os momentos e o amor incondicional.

Ao professor e orientador Marcelo Gravina de Moraes pela oportunidade paciência, e pelos ensinamentos teóricos e experiências de vida.

Aos meus colegas do LFM Guilherme, Gustavo, Aline, Lourenço, Jonathas e Ricardo. Em especial à Sara e à Julie. Obrigada pelo ombro amigo, pelas longas terapias, por terem paciência comigo e por toda amizade revelada nos últimos tempos. A Sara também por toda a contribuição intelectual. Aos ex colegas e hoje amigos Johannes, Leonardo, Adriano, Fernanda, Tatiana, em especial a Mônica.

Aos membros do Núcleo de Assessoria Estatística da UFRGS por serem tão prestativos e pela excelente ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores do departamento de Fitossanidade pela ajuda e pelas respostas a muitas perguntas.

Aos funcionários do departamento de Fitossanidade.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Marisa Carvalho Bello.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À Universal Leaf Tabacos LTDA, pela disponibilização dos isolados de *Pythium* spp. da coleção do LFM, utilizados neste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Aos meus amigos de Bento, Gi, Ronaldo, Gra, Adro, Si, Ale, Keli, Sal e Fabi pelos momentos de descontração muitas vezes necessários.

A minha amiga irmã Aline e o Marcus por não terem desistido de mim, sempre me apoiando e incentivando.

A Kari pelas longas conversas e as caronas descontraídas.

A minha prima Marinácia por todo apoio antes e durante estes quatro anos.

Enfim a todos que fazem parte da minha vida e que de uma forma ou de outra contribuíram para a conquista deste projeto.

# IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A *Pythium dissotocum* EM ARABIDOPSIS E TOMATE<sup>1</sup>

Autor: Ana Paula Trivilin

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

## RESUMO

As plantas expressam diferentes mecanismos de defesa em resposta a patógenos. Em geral, ocorre o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) por receptores específicos das plantas, desencadeando as respostas de defesa através das vias de sinalização mediadas por jasmonato (JA), etileno (ET) e ácido salicílico (AS). Além disso, a descoberta de sinais endógenos como AtPep1 que regulam a expressão de genes de defesa em *Arabidopsis thaliana* tem auxiliado na compreensão dos mecanismos de defesa. No entanto, os mecanismos de defesa de plantas a patógenos necrotróficos como *Pythium* spp. são pouco conhecidos. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias para identificar e caracterizar genes de resistência à *Pythium* spp. pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de defesa, possibilitando a obtenção de cultivares resistentes. Uma das estratégias empregadas para a identificação de genes de resistência a patógenos do gênero *Pythium* consistiu na construção de uma biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos em *A. thaliana* susperexpressando *AtPROPEP1*, que são mais resistentes à *P. irregulare* e a *P. deliense*. Paralelamente, foi realizada a busca de um gene ortólogo ao *AtPROPEP1* de *A. thaliana* em diferentes espécies de solanáceas. Outra estratégia utilizada envolveu a avaliação do efeito da aplicação dos hormônios JA e AS e do regulador de crescimento etefon na resistência de plantas de tomate à *P. dissotocum*. Posteriormente foi realizado o silenciamento dos genes *CTR1*, *ERF1* e *SIPROPEP* em plantas de tomate a fim de verificar o papel dos mesmos na resistência das plantas à *P. dissotocum*. Os resultados obtidos na biblioteca subtrativa indicam que *A. thaliana* superexpressando *AtPROPEP1* pode induzir a expressão não somente da defensina *PDF1.2*, mas também de *GRP3*, outro gene envolvido na defesa de plantas contra patógenos. Através da busca de ortólogos de *AtPROPEP1* em diferentes solanáceas foi possível identificar um ortólogo em *Solanum lycopersicum* - *SIPROPEP*. O tratamento com etefon aumentou a resistência das plantas à *P. dissotocum* comparado com as plantas não tratadas. Este tratamento também induziu a expressão relativa de *SIPROPEP*, *PR-1*, *PR-5* e da defensina *DEF2*. Assim como o tratamento com etefon o silenciamento do gene *CTR1*, que atua como um regulador negativo da via de sinalização de defesa por ET aumentou a resistência das plantas à *P. dissotocum*. Enquanto que as plantas silenciadas para os genes *ERF1* e *SIPROPEP* foram mais suscetíveis. O silenciamento de *SIPROPEP* reprimiu a expressão relativa dos genes *PR-1*, *PR-5*, *ERF1*, *LOX-D* e *DEF2* envolvidos na defesa de plantas à patógenos. Estes resultados, em conjunto com o aumento da resistência nas plantas tratadas com etefon, sugerem que a via de sinalização de ET atua na resistência de tomate à *P. dissotocum* sendo que esta resistência possivelmente é mediada por *SIPROPEP*.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (129p.) Julho, 2012.

# IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RESISTANCE GENES TO *Pythium dissotocum* IN ARABIDOPSIS AND TOMATO<sup>1</sup>

Author: Ana Paula Trivilin

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

## ABSTRACT

Plants express different defense mechanisms in response to pathogens. In general, specific receptors in plants recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), triggering the response defenses by signaling pathways mediated by jasmonate (JA), ethylene (ET) and salicylic acid (SA). Furthermore, the discovery of endogenous signals, as AtPep1, which regulate defense genes expression in *Arabidopsis thaliana*, has aided the understanding of the defense mechanisms. However, the defense mechanisms of plants to necrotrophic pathogens such as *Pythium* spp. are poorly known. Thus, development of strategies to identify and characterize the resistance genes to *Pythium* spp. can help the understanding of defense mechanisms, allowing the obtainance of resistant cultivars. One of the strategies used for the identification of resistance genes to pathogens within the genus *Pythium* consisted to construct a cDNA library of differentially expressed genes in plants overexpressing *AtPROPEP1*, which are more resistant to *P. irregulare* and *P. deliense*. Simultaneously, a search for orthologous genes to *AtPROPEP1* from *A. thaliana* in different species of *Solanaceae* was performed. Another strategy used involved the evaluation of application of JA and AS and of the growth regulator ethephon on the resistance of tomato plants to *P. dissotocum*. Then, the silencing of the genes *CTR1*, *ERF1* and *SIPROPEP* was performed in tomato plants in order to check the role of the tomato resistance to *P. dissotocum*. The results obtained from subtractive cDNA library indicate that *A. thaliana* plants overexpressing *AtPROPEP1* may induce expression not only of the *PDF1.2* defensin but also the *GRP3* expression, another gene involved in plant defense against pathogens. By the search for orthologous genes to *AtPROPEP1* in different species of *Solanaceae* was possible to identify an ortholog in *Solanum lycopersicum* - *SIPROPEP*. The ethephon treatment increased resistance of plants to *P. dissotocum* compared to untreated plants. This treatment also induced the expression of *SIPROPEP*, *PR-1*, *PR-5* and *DEF2* defensin. As ethephon treatment, the silencing of *CTR1* gene, which acts as a negative regulator of defense signaling pathway by ET, increased plant resistance to *P. dissotocum*. Whereas the plants containing *ERF1* and *SIPROPEP* genes silenced were more susceptible. *SIPROPEP* silencing repressed the relative expression of the genes *PR-1*, *PR-5*, *ERF1*, *LOX-D* e *DEF2* involved in plant defense to pathogens. These results, together with increased resistance in the plants treated with ethephon, suggest that ET signaling pathway acts in tomato to resistance *P. dissotocum* and this resistance is likely mediated by *SIPROPEP*.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Agonomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (129p.) July, 2012.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	4
1.1.1 Objetivo Geral.....	4
1.1.2 Objetivos específicos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 <i>Pythium</i> sp.....	5
2.1.2 Mecanismos de patogênese em <i>Pythium</i> sp.....	7
2.2 Mecanismos de defesa de plantas contra fitopatogênicos.....	11
2.2.1 Mecanismo de defesa pré-existente.....	11
2.2.2 Mecanismo de defesa induzido.....	12
2.2.3 Defesa contra necrotróficos.....	13
2.2.4 Peptídeos endógenos amplificam sinais de defesa.....	15
2.2.5 Resposta hormonal.....	18
2.3 Análise da expressão gênica diferencial.....	22
2.4 Genômica funcional.....	24
2.4.1 Silenciamento gênico.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Identificação de genes diferencialmente expressos em plantas de <i>A. thaliana</i> superexpressando <i>AtPROPEP</i> .....	28
3.1.1 Material vegetal.....	28
3.1.2 Extração de RNA e isolamento de mRNA.....	29
3.1.3 Síntese do cDNA para amplificação por PCR.....	29
3.1.4 Amplificação do cDNA a ser subtraído.....	30
3.1.5 Hibridização subtrativa.....	32
3.1.6 Amplificação de população de cDNAs diferencialmente expressos.....	32
3.1.7 Validação da biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos.....	32
3.1.8 Clonagem dos cDNAs diferencialmente expressos no vetor pGEM-T.....	32
3.1.9 Reação de sequenciamento e análise de similaridade de sequências.....	33
3.2 Busca de ortólogos de PROPEP1 e outros genes relacionados à defesa contra necrotróficos em solanáceas.....	34
3.2.1 Seleção <i>in silico</i> dos genes relacionados à defesa.....	34
3.2.2 Identificação da família PROPEP de <i>A. thaliana</i> em solanáceas.....	35
3.2.3 Extração de DNA.....	36
3.2.4 Amplificação e clonagem dos possíveis ortólogos de <i>A. thaliana</i> .....	36
3.3 Caracterização das respostas de defesa na interação tomate x <i>Pythium</i> na presença de hormônios vegetais e indutor de crescimento.....	37

	Página
3.3.1 Material vegetal e inóculo.....	37
3.3.2 Tratamentos e inoculação.....	38
3.3.3 Extração de RNA total e tratamento com DNase.....	40
3.3.4 Síntese de cDNA.....	40
3.3.5 Análise da expressão de genes envolvidos na resistência em plantas tratadas com etefon por RT-qPCR.....	41
3.4 Silenciamento dos genes <i>PDS</i> , <i>CTR1</i> , <i>ERF1</i> e do ortólogo <i>SIPROPEP</i> .....	43
3.4.1 Material vegetal e inóculo.....	43
3.4.2 Extração de RNA total e tratamento com DNase.....	43
3.4.3 Síntese de cDNA.....	43
3.4.4 Clonagem dos genes em pGEM-T Promega.....	44
3.4.5 Extração de plasmídeos recombinantes.....	45
3.4.6 Subclonagem dos insertos no vetor de silenciamento.....	46
3.4.7 Infiltração com <i>A. tumefaciens</i> contendo os vetores virais.....	50
3.4.8 Confirmação do silenciamento dos diferentes genes .....	52
3.4.9 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	52
3.4.10 Teste de patogenicidade das plantas silenciadas para os genes <i>CTR1</i> , <i>ERF1</i> e <i>SIPROPEP</i> .....	53
3.4.10.1 Análise da expressão de genes de resistência a patógenos nas plantas TRV-SIPROPEP por RT-qPCR.....	54
3.4.10.2 Extração de DNA e quantificação de <i>P. dissotocum</i> por qPCR.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Validação da biblioteca subtrativa.....	57
4.2 Análises de similaridade das sequências.....	59
4.3 Identificação de gene ortólogo de <i>PROPEP1</i> de <i>A. thaliana</i> em solanáceas.	61
4.4 Influência das diferentes vias de sinalização de defesa em <i>S. lycopersicum</i> à infecção por <i>P. dissotocum</i> .....	67
4.5 Silenciamento do gene <i>PDS</i> em tomate.....	77
4.6 Caracterização da resposta de defesa mediada por ET através do silenciamento de <i>CTR1</i> e <i>ERF1</i> na cv. Micro-Tom.....	84
4.6.1 Silenciamento gênico induzido por vírus de <i>CTR1</i> e <i>ERF1</i> na cv. Micro-Tom .....	84
4.6.2 Desenvolvimento da doença em plantas TRV-CTR1 e TRV-ERF1 inoculadas com <i>P.dissotocum</i> .....	89
4.6.3 Quantificação do patógeno por qPCR.....	93
4.7 Caracterização do papel de <i>SIPROPEP</i> na defesa de tomate à infecção por <i>Pythium</i> .....	95
4.7.1 Silenciamento gênico induzido por vírus de <i>SIPROPEP</i> na cv. Micro- Tom.....	95
4.7.2 Desenvolvimento da doença em plantas TRV-SIPROPEP inoculadas com <i>P.dissotocum</i> .....	98
4.7.3 Quantificação do patógeno por qPCR.....	102
4.7.4 Análise da expressão gênica.....	103
5. CONCLUSÃO.....	108
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

7. APÊNDICES.....	Página 126
-------------------	---------------

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Oligonucleotídeos utilizados para construção e validação da biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos.....	30
2. Oligonucleotídeos utilizados para busca de ortólogos.....	35
3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliar níveis de transcritos nas reações de RT-qPCR .....	41
4. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de genes candidatos de tomate para clonagem e identificação dos insertos no vetor TRV2b.....	45
5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.....	53
6. Análise de similaridade dos clones de <i>E. coli</i> obtidos pela técnica de biblioteca subtrativa de cDNAs diferencialmente expressos.....	61

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Modelo proposto para a via de amplificação da sinalização de PAMPs e peptídeos <i>AtPep</i> em <i>A. thaliana</i> .....	16
2. Modelo da técnica proposta para construção de bibliotecas de cDNAs completos e diferencialmente expressos.....	31
3. Escala para avaliação dos sintomas de <i>P. dissotocum</i> em plantas de tomate cv. Micro-Tom.....	40
4. Eletroforese em gel de agarose com fragmentos amplificados de <i>AtPROPEP1</i> .....	59
5. Análise dos possíveis ortólogos a <i>AtPROPEP</i> em solanáceas.....	65
6. Expressão do gene <i>SIPROPEP</i> em diferentes tecidos de tomate cv. Micro-Tom.....	67
7. Distribuição de classes de sintomas causados por <i>P. dissotocum</i> em plantas de tomate cv. Micro-Tom sob diferentes tratamentos.....	69
8. Expressão relativa de genes envolvidos na defesa de tomate cv. Micro-Tom inoculadas com <i>P. dissotocum</i> sob efeito do tratamento com etefon.....	74
9. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos plasmídeos e das colônias de <i>A. thumefasciens</i> transformadas TRV-GFP e TRV-PDS.....	79
10. Fenótipo de foto branqueamento em cvs. de tomate agroinfiltradas com TRV-PDS.....	80
11. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do <i>PDS</i> nas raízes de tomate 7 dias após a agroinfiltração.....	81
12. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do <i>PDS</i> nas folhas jovens de tomate da cv. Micro-Tom aos 14 dias após a agroinfiltração.....	82
13. Fenótipo de foto branqueamento até o estágio reprodutivo de tomate da cv. Micro-Tom.....	83

	Página
14. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de colônias de <i>A. tumefasciens</i> transformadas com os plasmídeos TRV-CTR1 e TRV-ERF1.....	85
15. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do <i>CTR1</i> nas raízes de tomate cv. Micro-Tom 10 dias após a infiltração.....	86
16. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do <i>ERF1</i> nas raízes da cv. Micro-Tom 10 dias após a infiltração.....	87
17. Fenótipo de plantas de tomate cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-CTR1.....	88
18. Fenótipo de plantas de tomate cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-ERF1.....	88
19. Comparação de sintomas observados nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP, TRV-CTR1 e TRV-ERF1.....	91
20. Avaliação dos sintomas e sinais na cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-GFP, TRV-CTR1 e TRV-ERF1.....	93
21. Quantificação do DNA de <i>P. dissotocum</i> em plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-ERF1, três dpi.....	95
22. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de colônias de <i>A. tumefasciens</i> transformadas com os plasmídeos TRV-SIPROPEP.....	96
23. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do SIPROPEP nas raízes da cv. Micro-Tom aos 10 dias após a infiltração.....	97
24. Fenótipo de silenciamento em plantas de tomate cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP.....	98
25. Comparação de sintomas observados nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP.....	100
26. Avaliação dos sintomas e sinais na cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP.....	102
27. Quantificação do DNA de <i>P. dissotocum</i> em plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP, três dpi.....	103
28. Expressão relativa de genes envolvidos na defesa nas raízes de plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP.....	105

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Sequência do cromossomo 4 de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	126
2. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor TRV2b com os diferentes insertos com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R.....	127

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AS – ácido salicílico

AVG – aminoetoxivinilglicina

AVR – proteínas de avirulência

cDNA - DNA complementar ao mRNA

CM – Corn Meal

Ct – Ciclo limiar

CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio

dNTPs – desoxirribonucleotídeos tri-fosfato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

ET – etileno

ETI – Imunidade desencadeada pelos efetores

HR – resposta de hipersensibilidade

JA – ácido jasmônico/jasmonato

LB – meio de cultura Luria-Bertani

MeJA – metil jasmonato

MeSA- metil salicilato

mRNA – RNA mensageiro

MMLV – *Moloney Murine Leukemia Virus*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

PAMPs – padrões moleculares associados ao patógeno

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

pEGAD – vetor de superexpressão em planta

pGEM-T – vetor de clonagem

PR – preteínas relacionadas à patogênese

PTGS – silenciamento gênico pós-transcrição

PTI – Imunidade desencadeada pelas PAMPs

qPCR – PCR quantitativo

R – proteínas de resistência

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécie de oxigênio reativa

RT – transcriptase reversa

RT-qPCR - Reação da Transcrição Reversa seguida da PCR quantitativa

SDS - dodecil sulfato de sódio

SOLGENES – *SOL Genomics Network*

TAIR - *Arabidopsis Information Resource*

Taq – DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

TRV – Vírus Pedicular do Tabaco

VIGS – Silenciamento gênico induzido por vírus

v:v – volume por volume

x g – força centrífuga relativa à aceleração padrão da gravidade

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas estão continuamente expostas a um grande número de patógenos que utilizam diferentes estratégias para infectar seus tecidos e comprometer suas funções fisiológicas. No entanto, nem todos estes micro-organismos conseguem colonizar a planta e causar doença. Isto por que as plantas desenvolveram mecanismos de defesa com capacidade de reconhecer o agente patogênico na fase inicial da infecção e desencadear uma resposta de defesa que interrompe o avanço do patógeno através do tecido sadio, garantindo a sua sobrevivência. Vários mecanismos de defesa como barreiras físicas constitutivas e respostas de defesa induzida são ativados pelas plantas para resistir à infecção por diferentes patógenos.

A primeira resposta de defesa é desencadeada pela imunidade inata, pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) por receptores presentes na superfície celular que detectam PAMPs e ativam a expressão de genes responsáveis pelo espessamento da parede celular vegetal, pela inibição das enzimas microbianas e pela degradação do patógeno através de enzimas hidrolíticas.

A imunidade inata é dependente dos hormônios jasmonato (JA) e etileno (ET) e geralmente está associada com a resistência a patógenos necrotróficos. Esta classe de patógenos secretam enzimas que degradam a parede celular das plantas e / ou metabólitos tóxicos para destruir as células infectadas diretamente sob a infecção ou ainda produzem efetores reconhecidos pelas plantas que desencadearão a morte das células vegetais, que são então disponibilizadas como fonte de nutrientes permitindo o avanço da colonização do

patógeno. Ao contrário do que ocorre com os necrotróficos, a morte celular inibe o crescimento dos patógenos biotróficos, pois estes nutrem-se de tecidos saudáveis e podem ser controlados através do mecanismo gene-a-gene amplamente estudado na busca de resistência a estes patógenos e que leva à produção de ROS e resposta de hipersensibilidade. No entanto, os componentes-chave envolvidos no mecanismo de resistência contra patógenos necrotróficos são ainda pouco conhecidos.

Patógenos pertencentes a classe de patógenos necrotróficos como espécies do gênero *Pythium* ocasionam grandes perdas econômicas em cultivos agrícolas. Espécies patogênicas deste gênero causam tombamento em plântulas, podridões radiculares, amarelecimento, murcha e morte. Além disso, patógenos do gênero *Pythium* são responsáveis por grandes reduções na produtividade nas culturas de alface, pepino, tomate, fumo, milho, entre outras.

O desenvolvimento de cultivares resistentes através da incorporação de genes de defesa é uma alternativa para o controle efetivo destas espécies de patógenos. No entanto, tais cultivares ainda não estão disponíveis no mercado devido a escassez de novas fontes de resistência nos bancos de germoplasma. Além disso, outros fatores como a diversidade de hospedeiros, a falta de especificidade e a agressividade conferida as substâncias tóxicas secretadas por *Pythium* sp. têm dificultado o desenvolvimento de plantas resistentes através de métodos de melhoramento convencionais. Com isso, a busca pela resistência a estes patógenos é um dos grandes desafios para os fitopatologistas e pesquisadores de áreas afins.

A forma mais promissora para gerar culturas resistentes à doença é a manipulação dos genes alvo envolvidos nas respostas de defesa contra os agentes patogênicos. Nos últimos anos, estudos sobre mecanismos de defesa, especialmente em *Arabidopsis thaliana*, têm auxiliado à compreensão de sinais endógenos e exógenos que regulam a

expressão de genes de defesa das plantas a patógenos. Em *A. thaliana* a superexpressão do gene precursor do peptídeo AtPep1, *AtPROPEP1* induziu a expressão de genes de defesa, produzindo um fenótipo com resistência à *Pythium irregulare* e *P. deliense*. Além disso, a aplicação direta do peptídeo AtPep1 em plantas é também um mecanismo efetivo para manipular a defesa. O aumento de resistência à doença obtida através do pré-tratamento ou pela expressão constitutiva nas plantas transgênicas indica que tais métodos podem ter potencial uso no campo, especialmente se os mecanismos são conservados entre as espécies. Genes ortólogos da família PROPEP têm sido descritos em espécies de interesse agrônomico e sua função tem sido relacionada com a resistência destas culturas a patógenos. Desta forma, os genes identificados em *A. thaliana* representam um modelo para o reino vegetal, podendo ser utilizados como referência para as plantas cultivadas no desenvolvimento de cultivares resistentes.

A utilização de uma combinação de técnicas de análise de expressão gênica e análise funcional no estudo da interação entre plantas e patógenos necrotróficos é uma alternativa para estudar os mecanismos de defesa das plantas. Uma ferramenta que vem sendo amplamente utilizada para caracterização funcional *in vivo* é a técnica de silenciamento gênico induzido por vírus que permitem identificar a função de um grande número de genes com facilidade, rapidez e eficiência.

Devido à carência de conhecimentos sobre os mecanismos de resistência a patógenos do gênero *Pythium* e de cultivares resistentes, o objetivo deste trabalho é utilizar estratégias de genômica aliadas aos conhecimentos obtidos em *A. thaliana* para identificar genes potencialmente envolvidos na resistência em espécies de solanáceas nas quais são observadas perdas significativas em função da infecção por *Pythium* spp.. Desta forma, esta pesquisa poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na defesa de

plantas a *Pythium* spp. e através das ferramentas biotecnológicas prover o conhecimento necessário para o desenvolvimento de cultivares resistentes.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Identificar e caracterizar genes de plantas que estão envolvidos na resistência à *Pythium* spp.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

Identificar genes de defesa em plantas de *A. thaliana* superexpressando *PROPEP1*.

Selecionar por análise *in silico* genes envolvidos com a resistência à *Pythium* spp. e outros patógenos necrotróficos.

Identificar ortólogos de genes de defesa contra patógenos de *A. thaliana* em solanáceas.

Verificar o envolvimento das vias de sinalização de defesa mediada por AS, JA e ET na resistência de plantas de *Solanum lycopersicum* a *Pythium dissotocum*.

Validar o método VIGS em tomate, fazendo uso do vetor viral TRV e do gene *PDS* como alvo do silenciamento.

Caracterizar os genes envolvidos na defesa de *S. lycopersicum* quanto a sua funcionalidade *in vivo* através de silenciamento gênico por VIGS, comparando as plantas silenciadas e não silenciadas quanto à resistência a *P. dissotocum*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Pythium* sp.

As espécies do gênero *Pythium* pertencem à família Pythiaceae, ordem Pythiales, classe Oomycetes (van West *et al.*, 2003). Este gênero foi estabelecido por Pringsheim em 1858 (Hendrix & Campbell, 1973) e atualmente é composto por mais de 200 de espécies que podem ser encontradas em todo o mundo (Kong *et al.*, 2004). No início do século 20, o isolamento destes microrganismos associados a doenças radiculares evidenciou seu caráter fitopatogênico (Hendrix & Campbell, 1973). Os oomicetos causam danos severos em várias culturas de importância agrônômica acarretando perdas econômicas significativas em todo mundo. Entre os oomicetos são encontrados patógenos biotróficos como o míldio (ex: *Bremia lactucae*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Plasmopara viticola*) e a ferrugem branca (*Albugo* spp.), os patógenos hemibiotróficos (ex: *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*) e os patógenos necrotróficos (*Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* spp.).

Espécies de *Pythium* apresentam crescimento saprofítico e quando as condições ambientais não são favoráveis para a colonização ou, quando o hospedeiro não está presente, sobrevivem no solo através de estruturas de resistência denominadas oósporos, as quais apresentam paredes espessas e podem se manter viáveis por mais de 12 anos (Hendrix & Campbell, 1973). A dispersão ocorre via zoósporos com dois flagelos e é favorecida em ambientes úmidos ou em solos mal drenados (van West *et al.*, 2003; Hardham, 2007).

Estruturas como os zoósporos, oósporos e fragmentos de hifa, podem ser consideradas fontes potenciais de inóculo, atuando no processo de infecção dos hospedeiros. O zoósporo é considerado o inóculo inicial (primário) e uma das principais estruturas de disseminação do patógeno na cultura hidropônica (Stanghellini *et al.*, 1996; Owen-going *et al.*, 2003).

Espécies do gênero *Pythium* podem ser encontradas na água e no solo e causam uma diversidade de doenças em plantas, principalmente nas raízes. As infecções causadas por *Pythium* são geralmente limitadas a extremidades meristemáticas, epiderme, região do colo, córtex das raízes e frutos (Vijayan *et al.*, 1998), mas o patógeno pode penetrar o tecido da planta e atingir o seu sistema vascular, causando infecções mais severas.

Espécies fitopatogênicas de *Pythium* são comuns na rizosfera e em outros tecidos da planta que estão em contato ou próximos ao solo (Kucharek & Mitchell, 2000). Estas espécies apresentam uma ampla gama de hospedeiros e podem causar podridões em sementes, frutos, raízes e caules e o tombamento pré ou pós-emergência de plântulas, sendo que os tecidos jovens e tenros são preferencialmente infectados (Plaats-Niterink, 1981).

A incidência de podridões radiculares e no colo das plântulas causadas por espécies do gênero *Pythium* é favorecida pela alta umidade presente em sistemas protegidos de produção de mudas de diversas culturas, como o fumo, o tomate e a alface e apresenta dificuldades no controle da doença (Lopes *et al.*, 2005). O tombamento de plântulas causado por *Pythium* spp. é muito comum e importante para o cultivo hidropônico de plantas, em particular nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas (van West *et al.*, 2003). Quando sementes de plantas suscetíveis são plantadas em solos com a presença do patógeno e são infectadas, elas falham na germinação e acabam apodrecendo (Lopes *et al.*, 2005). Estes mesmo autores observaram que plântulas jovens podem ser infectadas

antes da emergência em qualquer parte da planta, ocorrendo a rápida colonização e, dessa forma, as células invadidas colapsam levando a morte da plântula.

Em plântulas emergidas, a infecção ocorre geralmente nas raízes e no caule próximo à linha do solo. Raízes infectadas apresentam podridões moles e úmidas, geralmente na região do colo, devido à liberação de enzimas pectolíticas e celulolíticas que facilitam a colonização do tecido vegetal pelo patógeno através da desintegração do tecido do hospedeiro. As áreas colonizadas tornam-se intumescidas e hialinas, a parte basal do caule das plântulas torna-se mole e muito mais fino que as partes não infectadas acima dele, as plântulas caem sobre o solo caracterizando o tombamento (Kucharek & Mitchell, 2000; Lopes *et al.*, 2005). À medida que a planta se desenvolve, a lignificação do tecido vegetal dificulta a penetração do patógeno no hospedeiro (Hendrix & Campbell, 1973).

No caso de podridões em plantas adultas, a infecção é restrita a tecidos periféricos ou imaturos (Kamoun *et al.*, 1999). A parte aérea das plantas que se desenvolveram na presença do patógeno apresenta sintomas indiretos, devido ao bloqueio do movimento de água e nutrientes a partir do solo, causados pela podridão radicular. Pode haver amarelecimento das folhas, murchas e diminuição do crescimento. Quanto mais jovem for o hospedeiro no momento da infecção, mais severos serão os sintomas. Plantas que sobrevivem à infecção causada pelo patógeno apresentam diminuição na produção de grãos ou frutos (Hendrix & Campbell, 1973).

### **2.1.2 Mecanismos de patogênese em *Pythium* sp.**

A infecção das raízes por *Pythium* ocorre através de aberturas naturais como hidatódios, estômatos ou lenticelas, de ferimentos ocasionados por práticas agrícolas, por insetos e nematóides e/ou de penetração direta na superfície do hospedeiro através das estruturas do oomiceto. Neste processo os zoósporos liberados no ambiente são atraídos

por quimiotaxia e eletrotaxia em direção a planta hospedeira (Appiah *et al.*, 2005; Hardham, 2007). Os zoósporos são atraídos por moléculas presentes nos exudatos das raízes, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos, além de íons cálcio (Donaldson & Deacon, 1993; Deacon, 1996; Islam & Tahara, 2001; Tyler, 2002). Segundo van West *et al.* (2003), esse mecanismo de atração é inespecífico, guiando os zoósporos em direção a plantas hospedeiras ou não. Além deste mecanismo, mudanças eletrostáticas também podem ser um importante estímulo sensorial para que os zoósporos nadem (Van West *et al.*, 2002).

Em seguida, ocorre o encistamento dos zoósporos na superfície do hospedeiro, sua adesão por meio da liberação de material adesivo produzido pelo patógeno, a produção do tubo germinativo e o desenvolvimento da colônia. Geralmente, as pontas das raízes, os locais de emergência dos pêlos radiculares, as zonas de alongação das raízes, raízes jovens e a região do colo das plantas, são os locais preferenciais para a adesão dos zoósporos e a penetração através das estruturas do oomiceto, o que pode ser facilitado pela liberação de enzimas pelo patógeno como as pectinases e outras enzimas como hemicelulases, celulases e proteinases (Plaats-Niterink, 1981; Gold & Stanghellini, 1985; Sutton *et al.*, 2006). Por se tratar de um micro-organismo necrotrófico, uma vez que a epiderme do hospedeiro foi penetrada, as hifas invadem as células vegetais, adquirindo os nutrientes necessários para a sobrevivência do patógeno a partir das células mortas (Hardham, 2007).

Espécies de *Pythium* sob condições de alta umidade, formam zoósporos flagelados que ativamente nadam em direção ao hospedeiro e invadem a planta usando penetração mecânica via formação do apressório (Okubara e Paulitz, 2005). Colonização subsequente e a maceração do tecido são realizadas por toxinas, enzimas e vários elicitores levando a morte celular.

Poucas moléculas potencialmente envolvidas na patogenicidade de *Pythium* spp. foram isoladas e caracterizadas até o momento. No entanto, em vista dos efeitos causados pela infecção por *Pythium* spp. em plantas acredita-se que esses patógenos contenham um arsenal de enzimas que degradam a parede celular vegetal como endocelulases, 1,3- $\beta$ -glucanases,  $\beta$ -glucosidases, cutinases, galactanases e endopoligalacturonases, as quais atuam na penetração no tecido do hospedeiro e na patogênese (Campion et al., 1997; van West et al., 2003).

A atividade de enzimas hidrolíticas é necessária para ultrapassar a barreira exercida pela parede celular do hospedeiro e permitir a penetração das hifas do patógeno nas células vegetais. Diversos autores já verificaram a presença dessas enzimas em oomicetos causadores de podridão. MacDonald *et al.* (2002) verificaram que a pressão exercida pelas hifas de *P. graminicola* não é suficiente para penetrar nas células da epiderme de gramíneas, sendo essencial a atuação de enzimas que degradam a parede celular. Gotesson *et al.* (2002) encontraram 17 genes que codificam poligalacturonases, enzimas que degradam pectinas, através de uma biblioteca genômica de *Phytophthora cinnamomi*, um fitopatógeno também pertencente à família Pythiales.

Análises de microscopia conduzidas por Boudjeko *et al.* (2006) sobre a interação entre *P. myriotylum* e *Xanthosoma sagittifolium* indicaram que o patógeno causou desintegração das pectinas da parede celular vegetal, provavelmente através da ação de enzimas hidrolíticas. Além disso, Champion *et al.* (1997) verificaram que *P. sulcatum*, *P. ultimum* e *P. violae*, diferiram em relação à produção de enzimas hidrolíticas e também na velocidade em que essas enzimas são liberadas. A espécie que apresentou a maior atividade enzimática, *P. sulcatum*, foi a que apresentou sintomas menos severos em raízes de cenoura.

Elicitinas são proteínas secretadas em cultura pelas espécies do gênero *Phytophthora* e algumas espécies do gênero *Pythium*. Essas proteínas possuem um papel duplo na interação planta-patógeno podendo atuar como indutores de respostas de defesa da planta ou como fatores de patogenicidade (Tyler, 2002; Qutob *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 2009). Veit *et al.* (2001) purificaram uma proteína elicitora de *P. aphanidermatum*, a PaNie<sub>234</sub>. O cDNA correspondente a essa proteína foi isolado e expresso em grandes quantidades em folhas de *A. thaliana*, provocando necrose e formação de calose, sintomas estes também observados em fumo e tomate. Outras elicitinas identificadas foram Vex<sub>1</sub> e Vex<sub>2</sub> isoladas de *P. vexans* (Huet *et al.*, 1995), a oligandrina isolada de *P. oligandrum* (Picard *et al.*, 2000) e a silvaticina isolada de *P. sylvaticum* (Lascombe *et al.*, 2007).

Recentemente o sequenciamento do genoma de *P. ultimum* revelou que este patógeno e possivelmente outras espécies do mesmo gênero apresentam um mecanismo de patogenicidade diferenciado e um repertório específico de efetores YxSL(RK) (Lévesque *et al.*, 2010). Por outro lado, os autores verificaram que *P. ultimum* não codifica para nenhuma classe de proteínas efetoras RXLR, as quais são abundantes em outros oomicetos (Hass *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2008). A ausência de efetores RXLR em *P. ultimum* pode ser funcionalmente associada com a ampla gama de hospedeiros deste patógeno e também por estes efetores desencadearem a resistência gene-a-gene a qual não é efetiva contra *Pythium* sp. devido ao fato deste ser um patógeno necrotrófico (Lévesque *et al.*, 2010).

## **2.2 Mecanismos de defesa de plantas contra fitopatógenos**

### **2.2.1 Mecanismos de defesa pré-existent**

As plantas evoluíram de modo a serem capazes de se defender de diversas situações de estresse, tanto bióticos quanto abióticos. Em geral, as plantas são imunes a maior parte dos microrganismos patogênicos devido à presença de mecanismos pré-existent ou pré-

formados que proporcionam proteção não específica contra uma ampla gama de patógenos (Thatcher *et al.*, 2005). Esse tipo de imunidade está baseado nas características estruturais das plantas, na presença de substâncias inibitórias aos patógenos, ou ainda na disponibilidade limitada de nutrientes (Heitefuss, 2001).

Diversas barreiras estão presentes na superfície do tecido vegetal, sendo um dos seus propósitos impedir a entrada de microrganismos patogênicos. Essas barreiras incluem características físicas da planta como a presença de ceras epicuticulares, a cutina, tricomas e a parede celular. Kobayashi *et al.* (1997) observaram que os microfilamentos de actina também podem impedir a penetração de patógenos nas plantas. Plantas de cevada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), pepino (*Cucumis sativus*) e fumo (*Nicotiana tabacum*) foram submetidas ao tratamento com um inibidor da polimerização da actina, a citocalasina, levando à perda da resistência não-hospedeira contra a entrada de diversos fungos nas plantas (Kobayashi *et al.*, 1997).

Além de barreiras físicas, a infecção por microrganismos patogênicos pode ser impedida pela ação de metabólitos secundários expressos constitutivamente pelas plantas. Esses metabólitos incluem compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, terpenóides e alcalóides, entre outros (Osbourn, 1996a; Yazaki, 2005). Entre os alcalóides, as saponinas avenacina, presente na aveia (*Avena sativa*), e  $\alpha$ -tomatina, presente no tomate, são exemplos de compostos com atividade antimicrobiana (Osbourn, 1996b).

### **2.2.2 Mecanismos de defesa induzido**

Caso as barreiras de defesa pré-formadas sejam ultrapassadas pelos patógenos, as plantas induzem diversas respostas adicionais, a fim de suprimir ou limitar o crescimento do patógeno. Uma resposta de defesa bem sucedida depende da rápida ativação de uma série de genes que atuam na produção de compostos antimicrobianos (fitoalexinas) e de

espécies de oxigênio reativas, lignificação da parede celular e produção de enzimas que degradam a parede celular do patógeno (van Loon *et al.*, 2006). A diferença entre suscetibilidade e resistência não necessariamente está ligada às respostas desencadeadas, e sim com a velocidade e a magnitude que são induzidas e por quanto tempo elas são mantidas (Tao *et al.*, 2003).

O tipo de resposta desencadeada pela planta dependerá dos mecanismos e substâncias que o patógeno utiliza durante o ataque. Patógenos biotróficos caracterizam-se por induzirem alterações no metabolismo do hospedeiro para favorecer seu próprio crescimento, sem que haja morte das células vegetais infectadas. Em contraste, patógenos necrotróficos precisam matar as células do hospedeiro para metabolizar seu conteúdo e obter nutrientes (Ferrari *et al.*, 2003). As diferenças nos mecanismos de patogênese entre biotróficos e necrotróficos determinaram a evolução do sistema de defesa de modo que as plantas desenvolveram mecanismos distintos, porém interligados, de resposta aos diferentes patógenos.

As primeiras respostas induzidas após a percepção do hospedeiro ocorrem no ponto de entrada do patógeno pela deposição de papilas ricas em calose e a lignificação da parede celular, formando uma barreira contra a disseminação do patógeno. Em geral, esses mecanismos são desencadeados tanto contra patógenos necrotróficos quanto contra biotróficos (Flors *et al.*, 2005).

Juntamente com a formação de barreiras físicas, ocorre indução da produção de fitoalexinas, compostos de baixo peso molecular sintetizados após o ataque do patógeno (Hammerschmidt, 1999; Hüchelhoven, 2007). Experimentos *in vitro* revelaram que esses compostos possuem atividade antimicrobiana. Um estudo realizado por Thomma *et al.* (1999), demonstrou que plantas de *A. thaliana* deficientes na produção de camalexina, um tipo de fitoalexina, tornaram-se mais suscetíveis à infecção por *Alternaria brassicicola*.

### 2.2.3 Defesa contra necrotróficos

Patógenos necrotróficos utilizam enzimas hidrolíticas para ultrapassar as barreiras físicas impostas pela planta e colonizar o tecido vegetal. Para desencadear um processo de defesa a planta deve reconhecer o patógeno por meio da percepção de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) por receptores presentes na membrana plasmática do hospedeiro ou pela detecção de fragmentos da cutícula e da parede celular vegetal (Chisholm *et al.*, 2006; Hückelhoven, 2007). Os PAMPs são moléculas conservadas que são associadas com várias classes de patógenos e ativam as respostas imunes (Ausubel, 2005; Boller & Felix, 2009) como por exemplo, polissacarídeos, flagelina de bactérias e a quitina de fungos, ou proteínas secretadas pelos mesmos, como as elicinas liberadas por espécies do gênero *Phytophthora* (Hückelhoven, 2007; Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2009).

A detecção do patógeno ativa mecanismos de resistência basal, a qual é também denominada imunidade desencadeada por PAMPs – PTI e é a primeira linha de defesa que os patógenos enfrentam para colonização dos tecidos das plantas (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2008). Segundo Adie *et al.* (2007b) o reconhecimento de *P. irregulare* e a ativação da defesa em *A. thaliana* pode iniciar por um receptor denominado ERECTA, devido a sua similaridade estrutural com receptores tipo quinases. Além disso, através de estudos com mutantes de *A. thaliana* foi possível verificar que a ação do gene *PEN2*, que codifica uma glicosil hidrolase, é necessária para evitar a penetração de patógenos necrotróficos como *P. irregulare* e *Plectosphaerella cucumerina* (Lipka *et al.*, 2005; Adie *et al.*, 2007b).

Em resposta ao ataque de patógenos, as plantas possuem uma segunda linha de defesa na forma de proteínas de resistência (R) sendo que seu produto interage direta ou

indiretamente com os efetores (proteínas de avirulência - AVR) e confere imunidade aos patógenos que suprimem PTI. Na imunidade desencadeada por efetores - ETI ocorre a co-evolução molecular de patógenos e hospedeiros, assim efetores evoluem para driblar a detecção dos patógenos e as proteínas R evoluem para estabelecer e manter a defesa da planta (Jones & Dangl, 2006). Com este objetivo as plantas sintetizam proteínas relacionadas à patogênese (PR) cujas funções principais são enfraquecer a parede celular do patógeno e inibir as enzimas hidrolíticas liberadas pelo mesmo (Hückelhoven, 2007). Dentre as famílias de proteínas PR, destacam-se as quitinases (PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11), glucanases (PR-2), tioninas (PR-13), osmotinas (PR-5) e defensinas (PR-12), entre outras (van Loon *et al.*, 2006). Estas evidências apontam para a existência de duas fases da imunidade em plantas, o que é proposto pelo modelo zigzag: PTI desencadeada pelas PAMPs e posteriormente a ETI é desencadeada pelos efetores, com o paradigma que a ativação das respostas imunes ocorre mais rapidamente, de forma mais prolongada e robusta que por PTI (Tao *et al.*, 2003; Jones & Dangl, 2006; Tsuda & Katagiri, 2010). Dentro deste modelo, os hormônios de planta AS e JA são mensageiros secundários envolvidos na regulação das vias de sinalização que são envolvidas na imunidade desencadeada pelos PAMPs e a imunidade desencadeada pelos efetores (Jones & Dangl, 2006; van Loon *et al.*, 2006; Bent & Mackey, 2007; Zipfel, 2009).

Novas moléculas têm sido descobertas por ativar o sistema imune em plantas. Huffaker *et al.* (2006) isolaram um peptídeo elicitor de *A. thaliana*, o qual foi denominado AtPep1. O estudo mostrou que este peptídeo ativa a transcrição de uma defensina responsável pela resistência basal, a PDF1.2 (PR-12), a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a expressão de uma proteína, denominada PROPEP1. Além disso, a superexpressão de *AtPROPEP1* conferiu resistência de *A. thaliana* contra *P. irregulare* (Huffaker *et al.*, 2006).

A sinalização das respostas de defesa induzida pelos PAMPs compartilha muitos elementos da sinalização mediada pelos peptídeos endógenos (Ryan *et al.*, 2007). Peptídeos endógenos de plantas têm sido identificados por atuarem na defesa contra herbívoros e patógenos (Pearce *et al.*, 1991; Pearce & Ryan, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2006; Huffaker *et al.*, 2011), e peptídeos derivados de patógenos como elicitores de fungos Pep13 (Nürnberg *et al.*, 1994; Ligterink *et al.*, 1997; Kroj *et al.*, 2003; Halim *et al.*, 2004; Halim *et al.*, 2009), AVR9 e elicinas (Hahlbrock *et al.*, 1995; Kamoun, 2001; Navarro *et al.*, 2004), e elicitores de bactérias NPP1, flg22 e elf13 (Kunze *et al.*, 2004). No entanto, peptídeos endógenos e hormônios de defesa induzem um ao outro para amplificar as respostas de defesa, enquanto que as PAMPs são elicitores exógenos e não retroalimentam a via de sinalização de defesa (Huffaker & Ryan, 2007; Krol *et al.*, 2010; Huffaker *et al.*, 2011).

#### **2.2.4 Peptídeos endógenos amplificam sinais de defesa**

Elicitores endógenos nas plantas são tipicamente fragmentos oligossacarídeos, derivados da parede celular das plantas e produzidos pela infecção de patógenos ou por enzimas endógenas das plantas que são sintetizadas em resposta à infecção de patógenos (Orozco-Cárdenas & Ryan, 2003).

A recente identificação e caracterização de uma família de peptídeos endógenos elicitores, chamados de peptídeos AtPep (Huffaker *et al.*, 2006) e do seu receptor (Yamaguchi *et al.*, 2006) contribui para uma melhor compreensão das vias de sinalização para a resposta imune contra patógenos e suas PAMPs, as quais podem ser diferencialmente amplificadas.

AtPep1 é derivado de uma proteína precursora (PROPEP1) cujo gene é expresso em resposta a ferimentos, jasmonato e etileno. O gene *AtPROPEP1* é também expresso pela aplicação de AtPep1 exógeno (Huffaker *et al.*, 2006).

A expressão do gene *AtPROPEP1* em um promotor forte como o 35S em *A. thaliana* resultou em um fenótipo que expressou constitutivamente *PDF1.2* e exibiu um aumento na resistência ao oomiceto *P. irregulare* (Huffaker *et al.*, 2006). *AtPROPEP1* é um membro de uma pequena família de genes que codificam precursores que contêm sequências homólogas ao AtPep1 na sua região C-terminal (Huffaker & Ryan, 2007). Alguns destes genes são expressos em respostas a PAMPs e produzem peptídeos AtPep que amplificam a sinalização de defesa através das vias JA/Et e AS (Figura 1).

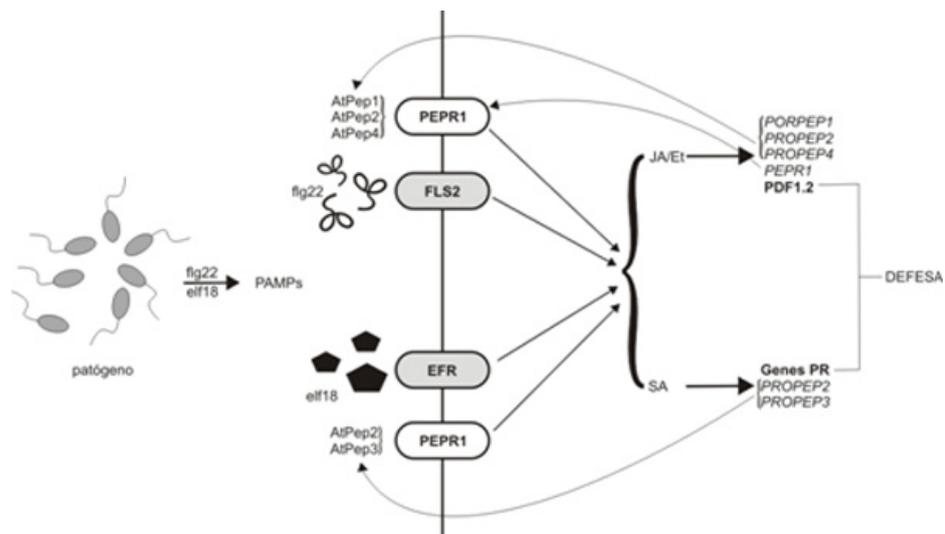


FIGURA 1. Modelo proposto para a via de amplificação da sinalização de PAMPs e peptídeos *AtPep* em *A. thaliana* (adaptado de Huffaker e Ryan, 2007).

Plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *AtPROPEP1* expressaram genes de defesa como *PDF1.2*, *PR-1*, *PR-3* e *PR-4*, indicando a relação de *AtPROPEP1* com estes genes, regulando a sua expressão através de múltiplas vias de sinalização, um fenômeno observado durante a indução de genes de defesa através da PAMP flg22 (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Zipfel *et al.*, 2004).

A expressão de *AtPROPEP1* em resposta a ferimentos e a metil jasmonato (MeJA) sugerem que este gene pode ser um sinalizador de defesa similar as sisteminas que são encontradas na família Solanaceae como sinalizador de defesa local e sistêmica contra o ataque de herbívoros (Pearce *et al.*, 2006).

Huffaker *et al.* (2006) constataram que *AtPROPEP1* pertence a uma família de genes com 7 membros em *A. thaliana*, identificados no GenBank, dos quais um gene não é detalhado. Os parálogos: At5g64890 (*AtPROPEP2*), At5g64900 (*AtPROPEP1*), At5g64905 (*AtPROPEP3*), At5g09980 (*AtPROPEP4*), At5g09990 (*AtPROPEP5*) e o gene não detalhado (*AtPROPEP7*) são encontrados no cromossomo V, enquanto que At2g22000 (*AtPROPEP6*) é encontrado no cromossomo II. Adicionalmente, ortólogos de *AtPROPEP1* estão presentes em diferentes espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas, como arroz, milho, trigo, cevada, canola, soja, batata, uva entre outras.

Ortólogos de *AtPep1* foram identificados em soja pela sua capacidade de alcalinização do meio de células em suspensão, uma característica geralmente associada com peptídeos de defesa. Os peptídeos GmPep914 e GmPep890 induziram a expressão de genes de defesa como genes envolvidos na síntese de fitoalexinas e quitinase. Além disso, plantas de soja tratadas com MeSA apresentaram um aumento da expressão das proteínas precursoras de ambos os peptídeos. No entanto, quando as plantas foram tratadas com MeJA e Etefon, apenas a expressão da proteína precursora de GmPep914 aumentou (Yamaguch *et al.*, 2011).

GmSubPep é outro peptídeo identificado em soja que é derivado de um gene que é predito por codificar uma subtilase. Células tratadas com GmSubPep induziram a expressão de genes relacionados com a defesa. Porém, em contraste com os genes para pro-sisteminas e PROPEP os quais são induzidos por MeJA e por ferimento as plantas de soja tratadas com MeJA, MeSA e Etefon não induziram a expressão da proteína precursora

deste peptídeo. Os autores sugerem que a subtilase codificada pelo gene precursor é ativada sob a infecção por patógenos ou por ferimentos através de um mecanismo pós-transcricional (Pearce *et al.*, 2010).

Recentemente foi encontrado um ortólogo funcional de AtPep1 em milho, ZmPep1. O ortólogo ZmPep1 assim como em *A. thaliana* apresenta características conservadas na região C terminal do peptídeo elicitor que permite que o peptídeo seja funcionalmente ativo e envolvido nas respostas de sinalização de defesa através das vias de JA e ET. Além disso, folhas de milho tratadas com o peptídeo ZmPep1 apresentaram uma redução no tamanho das lesões bem como na morte celular quando desafiadas com *Cochliobolus heterostrophus* e *Colletotrichum graminicola* (Huffaker *et al.*, 2011).

AtPep e seus ortólogos são os primeiros peptídeos endógenos que sinalizam a defesa identificados em planta (Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker *et al.*, 2011). A descoberta de genes ortólogos no reino vegetal sugere que esta família de genes pode ter um papel fundamental na amplificação das respostas de defesa das plantas associada com a resistência.

### **2.2.5 Resposta hormonal**

O papel chave de vários hormônios e vias de sinalização nos mecanismos de defesa em plantas tem sido amplamente investigado. Os fitohormônios atuam modulando respostas a estresse e sua ação pode ser sinérgica ou antagonista dependendo da interação (Campos *et al.*, 2009). Assim, diferentes hormônios são envolvidos nas respostas à estresse, cada um desencadeando uma resposta específica (O'Donnell *et al.*, 2003).

Estudos sobre a atuação dos hormônios vegetais como o ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico em interações entre plantas e patógenos frequentemente utilizam *A. thaliana* como modelo, devido à existência de diversas coleções de mutantes defectivos em

genes específicos. O estudo dessas linhas mutagenizadas auxilia na compreensão das vias de defesa de plantas tanto a patógenos biotróficos, quanto a necrotróficos, incluindo os genes responsáveis por essas respostas (revisado em Glazebrook, 2005). Em geral, acredita-se que respostas reguladas por ET e JA são requeridas para indução de respostas de defesa contra patógenos necrotróficos, enquanto que o AS atua na defesa contra biotróficos, sendo que as vias de JA/ET são consideradas antagonistas a via de AS (Glazebrook *et al.*, 2003). Entretanto, Adie *et al.* (2007b) verificaram que em *A. thaliana*, apesar do JA ser o principal sinal para a ativação da defesa contra *P. irregulare*, os hormônios vegetais AS, ET e ácido abscísico também contribuem, possivelmente otimizando a resposta contra o patógeno.

Na natureza estas vias não são independentes, elas podem ocorrer de forma integrada com o objetivo de defender as plantas da entrada de patógenos. Por exemplo, AS e JA não atuam independentemente para conferir resistência contra patógenos, mas operam em redes complexas entre várias outras vias de sinalização de fitohormônios (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Spoel & Dong, 2008; Grant & Jones, 2009; Verhage *et al.*, 2010). A aplicação em baixas concentrações de ambos AS e JA leva ao aumento da expressão de genes em resposta a JA comparado apenas com a aplicação de JA (Mur *et al.*, 2006). NPR1 (Non expressed Pathogen Related 1) é caracterizado por ser um regulador da supressão de JA mediada por AS (Spoel *et al.*, 2003; Ndamukong *et al.*, 2007). Além desta integração, recentemente foi verificado que ET modula o antagonismo entre AS e JA que é mediado por NPR1 (Leon-Reyes *et al.*, 2009).

Quando os estudos foram ampliados para diferentes patossistemas, observou-se que o papel desempenhado por hormônios vegetais varia de acordo com a interação em questão. Por exemplo, a resistência contra o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* é regulada por AS em tomate e por ET em plantas de fumo (Geraats *et al.*, 2002; Achuo *et al.*, 2004).

Os fito hormônios de plantas de maior relevância na regulação de respostas de defesa são JA e ET (Anderson *et al.*, 2004; Melotto *et al.*, 2008). A sinalização dependente destes hormônios é caracterizada pelo aumento das sínteses de jasmonato e ET em resposta ao ataque de patógenos, bem como o aumento da expressão de genes marcadores de defesa, tais como o gene *PDF 1.2* de *A. thaliana* (Glazebrook, 2005). Embora eles atuem como moléculas de sinalização de defesa contra a infecção de patógenos necrotróficos, JA/ET podem apresentar um papel dual e levar a suscetibilidade dos mesmos, dependendo das espécies de planta e patógeno (Asai *et al.*, 2000; Devadas *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004; Egusa *et al.*, 2009; Onkokesung *et al.*, 2010).

O ET atua em diversos processos fisiológicos e do desenvolvimento das plantas como na emergência de plântulas, na senescência, no amadurecimento de frutos e na abscisão de órgãos (van Loon *et al.*, 2006). Em relação às respostas de defesa, o ET atua na regulação de processos como a indução de oclusões do xilema e reforço da parede celular, na produção de fitoalexinas e na expressão de diferentes classes de genes PR (*PR-2*, *PR-3*, *PR-4* e *PR-12*) (Adie *et al.*, 2007a). Geraats *et al.* (2002) demonstraram que plantas de fumo transgênicas insensíveis ao ET (Tetr) tornaram-se mais suscetíveis à infecção causada por *Pythium* spp. que as plantas não transgênicas. Um aumento similar da suscetibilidade foi também observado com outros patógenos necrotróficos, tais como *B. cinerea* e *Cercospora nicotianae*, mas não com os biotróficos *Oidium neolycopersici* e *Peronospora tabacina* (Geraats *et al.*, 2003). Além disso, a atuação do ET na defesa contra *Pythium* spp. foi demonstrada em mutantes de *A. thaliana* (*ein2-1*, *ein2-5*) insensíveis a ET, as quais apresentaram maior suscetibilidade a infecções causadas por *Pythium* spp. (Adie *et al.*, 2007b).

O JA desempenha papel crucial na resposta de plantas a herbivoria (Wasternack *et al.*, 2006), além de atuar na defesa de plantas a patógenos necrotróficos (Broekaert *et al.*,

2006; Glazebrook, 2005; Kunkel & Brooks, 2002; Shah, 2005; Browse, 2009). Plantas de *A. thaliana* mutantes insensíveis (*jar1*) ou deficientes (mutante triplo *fad3-2 fad7-2 fad8*) na síntese desse hormônio foram mais suscetíveis aos fitopatógenos necrotróficos *P. irregulare* e *P. mastophorum* (Staswick *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998). Além disso, plantas mutantes de *A. thaliana* deficientes na síntese de JA foram incapazes de expressar *LOX2*, envolvido na via de síntese desse hormônio, e *PDF1.2*, uma defensina induzida por JA e ET (Vijayan *et al.*, 1998).

Em geral a sinalização de defesa por JA é combinada com ET que é coordenada através da indução de genes que codificam fatores de transcrição. *ERF1* é um dos cinco fatores de resposta ao etileno (ERFs) em *A. thaliana*. Esse gene expressa um fator de transcrição que conecta as vias de defesa mediadas por ET e JA, sendo que ambos são necessários para ativação de *ERF1* e posterior expressão de genes relacionados à defesa contra patógenos (Lorenzo *et al.*, 2003). *ERF1* é um fator de transcrição que integra os sinais para expressão de genes cujos produtos protegem as plantas da infecção por patógenos necrotróficos como *P. jasmonium*, *A. brassicicola* (Vijayan *et al.*, 1998), *B. cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002) e *F. oxysporum* (Berrocal-Lobo & Molina, 2004).

Em tomate quando genes da via de sinalização de defesa mediada por ET como *EIN2* e *ERF3*, bem como o gene *ACO* da via de biossíntese foram silenciados, as plantas silenciadas foram mais suscetíveis à infecção com *Ralstonia solanacearum* apresentando um aumento significativo na proliferação da bactéria (Chen *et al.*, 2009). Além disso, a superexpressão de *TSRF1* (tomato stress responsive factor 1), uma proteína da família ERF em tomate ativa a expressão de genes PR e aumenta a resistência das plantas transgênicas a murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* fornecendo fortes evidências da

importância do papel do ET em mediar as respostas de defesa nessa interação (Zhang *et al.*, 2004).

### **2.3 Análise da expressão gênica diferencial**

O final do século 20 foi marcado pela utilização de variadas técnicas de biologia molecular com o objetivo de identificar e clonar genes diferencialmente expressos em situações específicas, como para diferenciar tipos celulares, fases de desenvolvimento ou um estado de doença de um estado normal. Estudos baseados em análises de expressão diferencial constituem o primeiro passo no sentido de identificar genes e entender o papel desempenhado por um gene específico em determinada situação (Cramer *et al.*, 2006).

Dentre as técnicas de análise de expressão diferencial, podemos citar: “Differential Display - Transcriptase Reversa PCR” (DDRT-PCR) (Liang & Pardee, 1992), sequenciamento de sequências-alvo expressas (EST - Adams *et al.*, 1995), análise representativa das diferenças (RDA - Lisitsyn *et al.*, 1993), análise serial da expressão gênica (SAGE - Velculescu *et al.*, 1995), microarranjos de DNA (Schena *et al.*, 1995), uma técnica combinando cDNA com polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (cDNA-AFLP - Vos *et al.*, 1995), e hibridização subtrativa supressiva (SSH - Diatchenko *et al.*, 1996).

A técnica de hibridização subtrativa supressiva está baseada na amplificação seletiva de sequências expressas diferencialmente permitindo o isolamento de diferenças na composição de produtos gênicos expressos em duas amostras de tecidos ou células contrastantes (Diatchenko *et al.*, 1996). Desta forma, denomina-se de cDNA “tester” o cDNA do qual se quer isolar sequências diferencialmente expressas enquanto que o cDNA controle é denominado “driver”, o qual será subtraído. Esta técnica possui várias aplicações potenciais incluindo a identificação de genes de defesa, de desenvolvimento,

tecido-específicos e uma infinidade de outros genes diferencialmente expressos. Entre as vantagens da técnica de SSH incluem-se: a detecção de genes diferencialmente expressos pouco abundantes, a supressão da amplificação de genes altamente expressos, a identificação de genes sem conhecimento prévio de suas sequências e o uso de técnicas comuns da biologia molecular (Sagerström *et al.*, 1997).

A técnica de SSH é amplamente utilizada em diferentes espécies para a identificação de genes envolvidos em estresses bióticos e abióticos. Através do uso de SSH, Ros *et al.* (2005) obtiveram 393 clones de bibliotecas provenientes de plantas de batata moderadamente resistentes a *Phytophthora infestans*, dos quais 36 estavam relacionados à defesa e/ou estresse. Além disso, através de análises de microarranjos os autores observaram que apenas 3 % de 182 sequências selecionadas não exibiram padrões de expressão diferencial em relação aos controles não infectados.

No entanto, devido à grande quantidade de fragmentos de PCR gerados e uma excessiva redundância destes fragmentos, identificados como produto de um mesmo gene, esta técnica tem sofrido variações. Modificações na técnica de hibridização subtrativa de cDNA baseado em PCR foi proposta por Mishra *et al.* (2005). Tais modificações demonstraram a eficiência da técnica quando os autores sequenciaram aleatoriamente 12 clones diferencialmente expressos e obtiveram 10 genes completos e apenas 2 genes truncados.

## **2.4 Genômica funcional**

Com o advento do sequenciamento dos genomas o maior desafio está na descoberta de métodos para associar funções biológicas aos genes sequenciados. O termo genômica funcional é descrito por Hieter e Boguski (1997) como o desenvolvimento e a aplicação de métodos experimentais de capacidade de análise em grande escala em nível genômico para

avaliar a função dos genes. Os avanços das estratégias de análise funcional podem ser verificados através de técnicas de análise *in vitro* de acumulação de mRNAs e técnicas de análise genética direta e reversa *in vivo* (Rensink & Buell, 2004). Desta forma, ferramentas como marcadores moleculares, silenciamento gênico, inativação de genes por inserção de elementos genéticos móveis, indução de mutagênese através da transferência de T-DNA, transformação genética e ensaios de localização de proteínas de fusão utilizando métodos baseados em genes marcadores de fluorescência, além da superexpressão de proteínas em plantas constituem mecanismos para o descobrimento da função biológica das sequências geradas (Waterhouse, 2002; Waterhouse & Helliwell, 2003; Jones *et al.*, 2004).

Neste contexto, destaca-se com especial relevância para este trabalho a técnica de silenciamento gênico pós-transcrição (PTGS), o qual permite o direcionamento da supressão de um gene-alvo, sendo uma ferramenta eficiente, rápida e específica na detecção da função gênica (Tyagi *et al.*, 2004).

#### **2.4.1 Silenciamento Gênico**

O silenciamento em nível de RNA ocorre naturalmente como uma forma de proteger os organismos contra infecções virais e contra a mobilização de elementos genéticos móveis. O silenciamento ou RNA de interferência ocorre em vários organismos. Em plantas, a infecção por vírus aciona um mecanismo de defesa mediado por RNA, denominado de silenciamento de genes pós-transcrição (PTGS). Tal mecanismo consiste na degradação de fitas dupla de RNAs, que a planta identifica como um organismo estranho e desencadeia a degradação destes RNAs, através da ativação da enzima Dicer-like (DCL). Os dsRNAs são processados pela Dicer em pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNAs) fita dupla com tamanho variando de 21 a 26 nucleotídeos (Horiguchi, 2004; Miki *et al.*, 2005).

Napoli *et al.* (1990) observaram o silenciamento pela primeira vez em plantas superexpressando o gene codificante da chalcona sintase, pois algumas plantas transformadas apresentaram perda na coloração das flores. Os autores relacionaram este fato ao envolvimento da enzima na pigmentação em petúnias. Análises da acumulação de mRNA de chalcona sintase em petúnias, revelaram que o nível de transcritos era baixo, mostrando ter havido perda na atividade tanto do gene endógeno quanto do transgene, motivo pelo qual o fenômeno foi denominado co-supressão (Lecellier & Voinnet, 2004).

Avanços no conhecimento sobre o mecanismo de silenciamento de mRNA estimularam sua utilização como uma ferramenta na genômica funcional. Sua aplicação tem sido estudada extensivamente e aprimorada para facilitar a investigação de diferentes fenômenos na biologia vegetal e auxiliar na análise funcional dos genes, através do fenótipo produzido pela perda de função do gene na planta hospedeira. (Baulcombe, 2002; Horiguchi, 2004).

Na genômica funcional o PTGS pode ser obtido por diferentes métodos, como: pela transformação estável utilizando vetores que expressam dsRNA com repetições invertidas, formando um RNA em forma de grampo (hpRNA) (Miki *et al.*, 2005); pela introdução de transgenes com promotores fortes, pois, segundo Mello e Conte Jr. (2004), um alto nível de expressão do transgene acarreta defeitos no processamento do mRNA, como por exemplo, a falta da cauda de poli-A; pela introdução direta de dsRNAs ou hpRNA exógenos à planta produzidos *in vitro* ou em bactérias (Brummell *et al.*, 2003); ou ainda através da infecção direta de vetores virais, mais conhecido por silenciamento genético induzido por vírus (VIGS) (Watson *et al.*, 2005). Este último método envolve a infecção de uma planta com o vetor viral contendo um fragmento da sequência do gene do hospedeiro (Watson *et al.*, 2005).

Através da técnica de silenciamento gênico induzido por vírus, um fragmento gênico de interesse é inserido em um vetor viral para formar o RNA de dupla fita (dsRNA), dando início ao processo de silenciamento (Unver & Budak, 2009). Após a formação do dsRNA, este é clivado em fragmentos de 21 a 26 nucleotídeos pela DICER, uma enzima com domínios de RNase III. Estes fragmentos resultantes, denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs), são incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que degrada os RNAs mensageiros (mRNAs) que possuam identidade com a sequência do siRNA (Baulcombe, 2004; Unver & Budak, 2009) resultando no silenciamento efetivo de genes endógenos das plantas hospedeiras.

VIGS tem sido empregado com sucesso para estudar o papel de genes em vários aspectos funcionais da planta incluindo defesa de doenças (Ekengren *et al.*, 2003), respostas abióticas (Yoshioka *et al.*, 2003; Senthil-Kumar *et al.*, 2007a), e no desenvolvimento (Ahn *et al.*, 2006).

Vários vírus foram desenvolvidos para uso como vetores VIGS, dentre os quais: TMV (Vírus do Mosaico do Tabaco) (Kumagai *et al.*, 1995), PVX (Vírus X da Batata) (Ruiz *et al.*, 1998; Dalmay *et al.*, 2000), TGMV (Vírus do Mosaico Dourado do Tomate) (Kjemtrup *et al.*, 1998) e TRV (Vírus Pedicular do Tabaco) (Ratcliff *et al.*, 2001).

Entre os sistemas estabelecidos para VIGS, vetores baseados em TRV são os mais usados por apresentarem características especiais. Primeiramente, os sintomas induzidos por TRV em planta em geral são sutis e assim não distorcem as alterações fenotípicas causadas pelo silenciamento dos genes alvo. Em segundo lugar, TRV possui a capacidade de infectar a maioria dos tecidos e células das plantas, incluindo os meristemáticos (Liu *et al.*, 2002). Por fim, a eficiência do sistema TRV-VIGS parece ir além da gama de hospedeiros conhecidos (revisado em Ekengren *et al.*, 2003). Devido estas características, o sistema TRV-VIGS tem sido usado para estudos de genética funcional realizados em uma

gama de espécies e, em particular, em solanáceas (Ekengre *et al.*, 2003; Senthil-Kumar *et al.*, 2007).

Utilizando um vetor baseado no TRV, Liu *et al.* (2002) demonstraram um eficiente sistema de VIGS em *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. Os autores estabeleceram o silenciamento do gene endógeno fitoeno desaturase (*PDS*). Além deste trabalho, muitos outros relatam o sucesso do silenciamento de genes, em espécies do gênero *Solanum*, através da utilização do vetor TRV (Hartl *et al.*, 2008; Brigneti *et al.*, 2004; Jablonska *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Identificação de genes diferencialmente expressos em plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *AtPROPEP1*

##### 3.1.1 Material vegetal

Plantas de *A. thaliana* transgênicas superexpressando o gene *AtPROPEP1* e plantas transgênicas pEGAD (controle, sem a superexpressão de *AtPROPEP1*) (Trivilin, 2008) foram utilizadas para a construção de uma biblioteca subtrativa, onde as plantas superexpressando *AtPROPEP1* foram utilizadas como amostras “tester” – PROPEP1 e as plantas transgênicas pEGAD foram utilizadas como amostras “driver” - CONTROLE.

As sementes de ambas as plantas transgênicas foram submetidas à quebra de dormência pela sua submersão em água destilada e exposição das mesmas a uma temperatura de 4°C durante quatro dias.

A assepsia das sementes foi realizada em cabine de fluxo laminar horizontal através da imersão das sementes em etanol 96% durante 30 s, seguida de 5 min de imersão em hipoclorito de sódio 1% acrescido de Tween-20 0,1%. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril. Após a assepsia, as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo aproximadamente 20 ml de meio Murashige e Skoog (MS), com 8 g L<sup>-1</sup> de Ágar e 100 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina. As placas foram mantidas em câmara de crescimento sob temperatura de 20 ± 2°C e fotoperíodo de 16 h de luz.

Após 20 dias, as plantas de ambos transgenes foram coletadas e armazenadas imediatamente em nitrogênio líquido.

### **3.1.2 Extração de RNA e isolamento do mRNA**

Plântulas de *A. thaliana* transgênicas foram submetidas a extração de RNA total, 100 a 200 mg de tecido foi triturado na presença de nitrogênio líquido de acordo com o método de Bugos *et al.* (1995). A qualidade e quantidade de RNA foram estimadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. O mRNA foi obtido através do sistema PolyA Tract mRNA Isolation System II (Promega), conforme instruções do fabricante.

### **3.1.3 Síntese do cDNA para amplificação por PCR**

Com o objetivo de obter uma biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos o cDNA de PROPEP1 foi sintetizado a partir do mRNA extraído de plantas transgênicas superexpressando *AtPROPEP1* e a síntese do cDNA da amostra controle foi realizada a partir do mRNA extraído de plantas transgênicas pEGAD (sem a superexpressão de *AtPROPEP1*). A síntese dos cDNAs das plantas com e sem a superexpressão do gene *AtPROPEP1* foi realizada em reações independentes utilizando o oligonucleotídeo P1 dT para síntese do cDNA da amostra controle e o oligonucleotídeo P2 dT para síntese do cDNA PROPEP1 utilizando a enzima ImPromII<sup>®</sup> (Promega) segundo instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos P1 dT e P2 dT são compostos de 18 nucleotídeos de timina no 3' final e uma sequência aleatória, porém conhecida na região 5' para posterior reconhecimento com os adaptadores (Tabela 1). Após a transcrição os adaptadores P1 e P2- foram ligados ao 3' final das primeiras fitas de cDNAs sintetizadas pelos

oligonucleotídeos P1 dT e P2 dT, respectivamente, utilizando a enzima T4 RNA Ligase (Promega) segundo as instruções do fabricante (Figura 2).

TABELA 1. Oligonucleotídeos utilizados para construção e validação da biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos.

Nome	Sequência (5' – 3')
P1dT <sup>a</sup>	GTAATACGACTCACTATAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Adaptador P1 <sup>a</sup>	P – CCTTTAGTGAGGGTTAATTTTC- NH
P1 – direto <sup>a</sup>	Biotina – GAAATTAACCCTCACTAAAGGG
P1 – reverso <sup>a</sup>	GTAATACGACTCACTATAGGGTT
P2 dT <sup>a</sup>	TATAGATCTGCGGCCGCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Adaptador P2 <sup>a</sup>	P – GCTAGCATATGGGCCCGAATTCC - NH
P2 – direto <sup>a</sup>	GGAATTCGGGCCCCATATGCTAGC
P2 – reverso <sup>a</sup>	TATAGATCTGCGGCCGCAAGCTT
Gapdh – F	GAAATGCATCTTGCACTACCAACTGTCTTGC
Gapdh – 2R	CCCGTTGAGTTTTTCCTTTGA
PROPEP1 – F	TAGAATTCATGGAGAAATCAGATAGACG
PROPEP1 – R	ATAAGCTTCTAATTATGTTGGCCAGGAC
M13 – F <sup>b</sup>	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13 – R <sup>b</sup>	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

<sup>a</sup>oligonucleotídeos baseados em Mishra *et al.* (2005)

<sup>b</sup>oligonucleotídeos baseados na sequência do vetor de clonagem pGEM-T© Promega®

### 3.1.4 Amplificação do cDNA a ser subtraído

A população da primeira fita de cDNA do controle foi amplificada de acordo com Reddy *et al.* (2002) utilizando oligonucleotídeos P1 direto, biotilado na posição 5' e P1 reverso (Tabela 1). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µl, contendo Tampão 1x; 0,2 mM de dNTPs; 2mM MgCl<sub>2</sub> 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 5 U da enzima Taq DNA polimerase, e 2 µl cDNA ligado ao adaptador como amostra. A reação foi realizada sob as seguintes condições: 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (3 min) por 30 ciclos. A biotina foi introduzida ao 5' final da fita senso da população de cDNA

amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeo P1 direto biotilado (Figura 2). Posteriormente, a dupla fita do cDNA foi imobilizada em microesferas magnéticas ligadas a estreptavidina (Promega). A fita antisenso complementar foi desnaturada pós a incubação com 0,15 M de NaOH por 10 min a temperatura ambiente e com o auxílio de um ímã separada das microesferas. Após a separação magnética, a fita senso biotilada (segunda fita) foi imobilizada nas microesferas magnéticas pela ligação com estreptavidina. A fita senso dos cDNAs imobilizados, bem como as microesferas, foram lavadas 2x com 0,15 M de NaOH e posteriormente foram lavadas 3x com tampão de PCR 1x e foram utilizadas para uma rodada de subtração do cDNA.

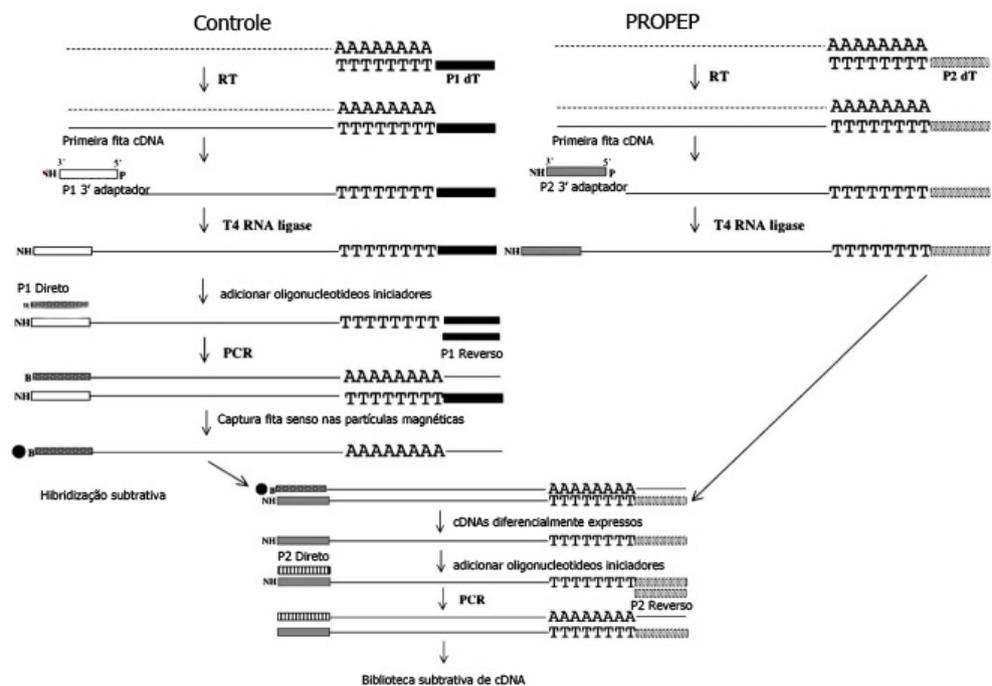


FIGURA 2. Modelo da técnica proposta para construção de bibliotecas de cDNAs completos e diferencialmente expressos (Mishra *et al.*, 2005). As linhas pontilhadas indicam o mRNA e as linhas sólidas indicam o cDNA. Os retângulos representam os oligonucleotídeos utilizados em cada etapa do desenvolvimento da biblioteca subtrativa. O círculo sólido menor representa a biotina e o círculo sólido maior representa as esferas magnéticas ligadas a estreptavidina.

### **3.1.5 Hibridização subtrativa**

A primeira fita do cDNA obtida a partir das plantas PROPEP1 foi hibridizada com a fita senso do cDNA amplificado por PCR da amostra controle. Este material foi imobilizado nas microesferas magnéticas com estraptavidina em tubos Eppendorf contendo 100 µL de tampão de PCR 1x por 5 h à 65°C em um forno de hibridização sob leve agitação dos tubos para manter as microesferas em suspensão. Os híbridos entre a fita senso do cDNA controle e a fita de cDNA antisense complementar do PROPEP1, bem como as microesferas, foram separadas da solução por colunas magnéticas (Promega). Os cDNAs diferencialmente expressos em resposta a superexpressão do gene *AtPROPEP1* permaneceram na solução de hibridização.

### **3.1.6 Amplificação da população de cDNAs diferencialmente expressos**

A população de cDNA diferencialmente expressos não subtraída das plantas PROPEP1 foi amplificada por PCR com os oligonucleotídeos P2 direto e P2 reverso. A PCR foi realizada conforme descrito no item 3.1.4.

### **3.1.7 Validação da biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos**

A biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos foi validada por PCR com oligonucleotídeos do gene constitutivo (*GAPDH* – nº de acesso no GenBank: M64114) e do gene induzido (*PROPEP1* nº de acesso no GenBank: NM\_125888), em reações independentes e nas condições citadas anteriormente.

### **3.1.8 Clonagem dos cDNAs diferencialmente expressos no vetor pGEM-T**

Uma vez validada, a biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos foi inserida no vetor de clonagem pGEM-T<sup>®</sup> Promega<sup>®</sup> conforme as orientações descritas pelo

fabricante. O vetor pGEM-T contendo os cDNAs diferencialmente expressos foi inserido em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* XL-1 (Stratagene, CA, USA) com auxílio do eletroporador MicroPulser® BIO-RAD de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do aparelho. As células foram transferidas para tubos de ensaio e incubadas por 1 h a 37°C sob agitação de 225 rpm. Após este período, uma alíquota de 100 µL da cultura foi cultivada em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) contendo 1,4% de ágar, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,5 (Sambrook *et al.*, 1989), acrescido de 50 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina, 15 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina, 40 µg mL<sup>-1</sup> de IPTG e 80 µg mL<sup>-1</sup> de X-gal. As bactérias foram incubadas a 37°C por 12h.

Após o cultivo das células transformadas foi realizada PCR com as colônias recombinantes para identificação das colônias que apresentavam o inserto. Nesta reação, foi utilizado tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo M13 F e M13 R (Tabela 1), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume de 20 µL. A reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 40 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 min, pareamento a 50°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, permitindo a identificação de fragmentos com tamanho superior à 250 pb indicando a inserção de uma sequência da biblioteca de cDNA no vetor.

### **3.1.9 Reação de sequenciamento e análise de similaridade das sequências**

Os produtos de PCR que apresentaram um tamanho superior a 250 pb visualizados através de eletroforese foram enviados para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS),

utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer*. Aos produtos de PCR foi adicionado 4,5 pmol do oligonucleotídeo M13 reverso para identificar as sequências da biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos inseridas no vetor de clonagem.

Os eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento foram analisados através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd.), comparando as sequências obtidas no sequenciamento com as sequências depositadas no GenBank: National Center of Biology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), através do programa BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul *et al.*, 1997)].

### **3.2 Busca de ortólogos de *PROPEP1* e outros genes relacionados à defesa contra necrotróficos em solanáceas**

#### **3.2.1 Seleção *in silico* dos genes relacionados à defesa**

Foram realizadas buscas nas bases de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), TAIR (Arabidopsis Information Resource), SOLGENES (SOL Genomics Network), entre outras, além de uma ampla revisão bibliográfica com o objetivo de identificar genes envolvidos nas vias de resposta de defesa de plantas da família Solanaceae contra patógenos necrotróficos e que apresentem características semelhantes aos genes relacionados à defesa contra *Pythium* sp. em *A. thaliana*. A partir dos genes selecionados foram projetados oligonucleotídeos baseados nas sequências conservadas entre as espécies através do alinhamento das sequências protéicas pelo programa Genomatix DiAlign ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) e das sequências nucleotídicas pelo BLASTN (Altschul *et al.*, 1997). Para os genes da família *PROPEP*, os oligonucleotídeos reverso foram projetados na região conservada C-terminal, onde é encontrado o peptídeo

responsável por amplificar a via de sinalização de defesa contra *Pythium* sp em *A. thaliana* (Tabela 2).

Ortólogos dos membros da família PROPEP foram descritos previamente por Huffaker *et al.*, 2006 em diversas espécies, entre elas destaca-se a solanácea *Solanum tuberosum* (nº de acesso no GenBank CV505388). A partir deste acesso foram realizadas análises *in silico* para busca de um ortólogo de PROPEP em base de dados de solanáceas.

Com base nesta busca foram projetados oligonucleotídeos a fim de identificar o provável ortólogo de PROPEP em espécies de solanáceas nativas como *Solanum americanum*, *S. mauritianum*, *S. atropurpureum*, *S. quitoense*, *S. variable*, *S. viarum*, *S. macrocarpum*, *S. sisymbriifolium*, e três *Solanum* sp., além de *Physalis angulata*, *Nicotina tabacco*, *N. benthamiana* e *Solanum lycopersicum* cultivar Gaúcho e cv. Micro-Tom, as quais serviram de base para o desenvolvimento deste experimento.

TABELA 2. Oligonucleotídeos utilizados para busca de ortólogos

Nome	Acesso*	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
<b>PROPEP1</b>	NM_125888	ATTTAATTAAATGGAGAAATCAGATAGACG	TAGGATCCCTAATTATGTTGGCCAGGAC
<b>PROPEP2</b>	NM_125887	ATTTAATTAAATGGAGAAATTAGATAAACG	TAGGATCCTTAATCCTCCTATAAACTT
<b>PROPEP3</b>	NM_125889	ATTTAATTAAATGGAGAATCTCAGAAATGG	TAGGATCCCTAATTGTGTTTGCCTCCTT
<b>PROPEP4</b>	NM_121035	ATTTAATTAAATGGAGAGAGGAGTTTCTTA	TAGGATCCCTAAAACGGCTTCTTGTGG
<b>PROPEP5</b>	NM_121036	ATTTAATTAAATGCAGCAAGAGAGAGATCA	TAGGATCCTTACATGTCGTAGTCGTAA
<b>PROPEP6</b>	NM_127769	ATTTAATTAAATGGAAGTTAATGGAGAAGA	TAGGATCCTCAATTGTTTTGACCAGGTC
<b>SIPROPEP</b>	AK325093	ATGGAAGAGAAAAAGAGAGTAGATCATCAGT	TCTGAGGAGGAGGTCCACTACCAAC

\*Número de acesso no GenBank

### 3.2.2 Identificação dos ortólogos da família PROPEP de *A. thaliana* em solanáceas

Após a prospecção dos oligonucleotídeos foram realizadas reações de PCR para amplificação das sequências alvo nas diferentes espécies de solanáceas. Para identificação

dos genes ortólogos foi utilizada a metodologia descrita a seguir.

### **3.2.3 Extração de DNA**

O DNA foi extraído pelo método CTAB adaptado de Murray e Thompson (1980) a partir de folhas de plântulas das diferentes espécies de solanáceas. Aproximadamente 100 mg de tecido vegetal foram coletados e triturados na presença de nitrogênio líquido em tubo de microcentrífuga (1,5 mL). Em seguida, foram adicionados 750 µL de tampão de extração CTAB (CTAB, 55 mM; Tris, 100 mM pH 8,0; EDTA, 10 mM; NaCl, 0,7 M) e 15 µL de 2-mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 2 min, incubada a 65°C durante 15 min e, posteriormente, acrescentados 520 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v:v). A mistura foi novamente homogeneizada vigorosamente por 1 min e centrifugada por 10 min a 13.000 rpm em temperatura ambiente. A fase líquida sobrenadante foi transferida para um novo tubo, na qual foi adicionado igual volume de isopropanol (500 µL) e 50% do volume de acetato de amônio 7,5 M (250 µL). Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 13.000 rpm em temperatura ambiente. A fase sobrenadante foi desprezada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% por duas vezes, centrifugado por 5 min a 13.000 rpm, seco a 65°C e solubilizado em 100 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura. O material extraído foi armazenado a – 20°C.

### **3.2.4 Amplificação e clonagem dos possíveis ortólogos de *A. thaliana***

O DNA extraído foi submetido à PCR com utilização dos pares de oligonucleotídeos descritos na Tabela 2. A PCR foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 25 mM KCl; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen); 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi realizada sob as

seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C (2 min), seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C (30 s), pareamento a 58°C (30 s) e extensão a 72°C (60 s) e uma etapa final de extensão a 72°C durante 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2%. Os fragmentos foram estimados pela comparação com o perfil eletroforético do marcador de massa molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Os produtos amplificados foram inseridos em vetor pGEM-T (Promega), conforme instruções do fabricante. As colônias recombinantes foram identificadas conforme detalhado no item 3.1.8. Posteriormente os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento, conforme descrito no item 3.1.9, com oligonucleotídeo reverso M13-R. As sequências resultantes do sequenciamento, foram submetidas a análises *in silico* para determinar a similaridade entre as sequências dos genes de *A. thaliana* e seus ortólogos nas bases de dados de solanáceas KaFTom (Aoki *et al.*, 2010 - <http://www.pgb.kazusa.or.jp/kaftom/>) e SOL Genomic network (Bombarely *et al.*, 2011 - <http://solgenomics.net/>) e no GenBank (Benson *et al.*, 2011 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

### **3.3 Caracterização das respostas de defesa na interação tomate x *Pythium* na presença de hormônios vegetais e indutor de crescimento.**

#### **3.3.1 Material vegetal e inóculo**

Os experimentos com os tratamentos hormonais e de silenciamento gênico foram conduzidos com *S. lycopersicum* cultivar Micro-Tom, gentilmente cedidas por Lázaro Eustáquio Pereira Peres, ESALQ – USP. Esta cultivar caracteriza-se por apresentar um porte anão e um ciclo completo entre 70 e 90 dias. Além disso, a cv. Micro-Tom é considerada uma planta modelo para estudos genéticos no gênero *Solanum*.

A assepsia das sementes de *S. lycopersicum* foi realizada em cabine de fluxo laminar horizontal através da imersão das sementes *S. lycopersicum* em etanol 70%

durante 1 min, seguida de 20 min de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% acrescido de Tween-20 0,1%. Em seguida, as sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada estéril.

As plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento com temperatura de  $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16h, em copos plásticos (50 mL) utilizando como substrato inerte a vermiculita expandida fina tratada a  $900^{\circ}\text{C}$  (Carolina Soil do Brasil Ltda., Vera Cruz -RS).

O isolado 123 utilizado para os testes de incidência e severidade da doença pertence a espécie *P. dissotocum* e faz parte da coleção do Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFRGS. O isolado foi identificado por Jeferson Mateus Dariva a partir das raízes de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) com sintomas de amarelecimento foliar e podridão radicular. Os isolados da coleção foram mantidos em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Corn Meal - CM, composto por  $17\text{ g L}^{-1}$  de farinha de milho e  $15\text{ g L}^{-1}$  de ágar acrescido de  $100\text{ mg L}^{-1}$  do antibiótico ampicilina. As placas foram armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Sete dias antes da inoculação do isolado nas plantas da cv. Micro-Tom, um bloco de meio de cultura (5 mm x 5 mm) contendo micélio de *P. dissotocum* foi repicado para uma placa contendo meio CM acrescido de ampicilina ( $100\text{ mg L}^{-1}$ ). As placas foram incubadas durante três dias no escuro a  $28^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente, blocos de meio de cultura CM (5 mm x 5 mm) contendo micélio de *P. dissotocum* foram utilizados como inóculo.

### 3.3.2 Tratamentos e inoculação

As plântulas foram submetidas a tratamentos com dois hormônios vegetais, metil jasmonato (MeJA), ácido salicílico (AS) e o regulador de crescimento vegetal etefon (24%, princípio ativo do produto Ethrel<sup>®</sup>, Bayer). Os tratamentos consistiram na inoculação das

plântulas da cv. Micro-Tom com *P. dissotocum* 10 dias após o aparecimento das folhas cotiledonares, seguido da aplicação de um dos seguintes compostos: AS (4 mM, Díaz *et al.*, 2002), JA (100 µM, Yu *et al.*, 2009) ou etefon (ET, 7mM, Sivasankar *et al.*, 2000). Cada copo recebeu 10 mL de um dos compostos utilizados para os tratamentos e um bloco de meio de cultura CM (5 mm x 5 mm) contendo micélio de *P. dissotocum* como inóculo aproximadamente 2 cm do colo das plântulas. Os controles consistiram de plântulas inoculadas e não submetidas aos tratamentos, e plântulas submetidas aos tratamentos, mas não inoculadas, além de plântulas não inoculadas e não tratadas, nas quais foram aplicados 10 mL de água destilada e esterilizada. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 14 h de luz durante três dias. Cada tratamento consistiu de 12 plântulas. O tratamento com etefon foi realizado em duas repetições, de modo que foram avaliadas 24 plântulas neste tratamento.

A incidência da doença foi avaliada em plântulas de tomate com 10 dias de crescimento.

A incidência da doença foi avaliada quanto à presença ou ausência de sintomas de necrose na região do colo das plântulas 3 dias após a inoculação. Enquanto que a severidade da doença foi avaliada por meio de uma escala de sintomas causados por *P. dissotocum* no colo das plantas baseada na quantidade e no tamanho das manchas necróticas (Figura 3).



FIGURA 3. Escala para avaliação dos sintomas de *P. dissotocum* em plantas de tomate cv. Micro-Tom baseada na quantidade e tamanho de manchas necróticas, sendo 0 = ausência de manchas necróticas e 4 = abundância de manchas necróticas que coalescem e constringindo o colo da planta. Os valores intermediários 1, 2 e 3 correspondem a quantidades crescentes de manchas necróticas no colo das plântulas.

### 3.3.3 Extração de RNA total e tratamento com DNase

O RNA total foi extraído de aproximadamente 100 mg de tecido macerado na presença de nitrogênio líquido. Ao tecido macerado foi adicionado 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> reagente (Ambion) e a extração foi procedida conforme as instruções do fabricante.

A concentração do RNA total foi estimada em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 1X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2 mM de EDTA], sendo utilizado como marcador 500 ng de  $\lambda$ HindIII. O gel permaneceu em contato com uma solução de tampão TBE 1X com 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de brometo de etídio por 15 min. Em seguida, o gel foi exposto a luz UV e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado (Loccus Biotecnologia). Todas as demais separações de ácidos nucleicos por eletroforese seguiram estes mesmos procedimentos para análise de gel. Posteriormente, o RNA extraído foi submetido à reação com a enzima DNase I (RQ1 RNase-Free DNase – Promega) de acordo com o protocolo do fabricante.

### 3.3.4 Síntese de cDNA

A reação de síntese de cDNA foi composta de aproximadamente 250 ng de RNA total tratado com DNase I; tampão 1X da GoScript<sup>™</sup>; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM de cada

dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen); 1,3  $\mu$ M de oligo(dT) (5'- TTT TTT TTT TTT TTT T - 3'); 6 U de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) e 48 U de GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), totalizando um volume de 6  $\mu$ L que foi submetido às seguintes condições: 5 min a 25°C, 1 h a 42°C e 15 min a 70°C.

### 3.3.5 Análise da expressão de genes envolvidos na resistência em plantas tratadas com etefon por RT-qPCR

O acúmulo de mRNA de genes que estão envolvidos na resistência de plantas à patógenos necrotróficos foi determinado por meio de RT-qPCR nas raízes das plantas tratadas com etefon. Para tanto, foram selecionados os seguintes genes: fator de resposta ao etileno 1 (*ERF1*), lipoxigenase D (*LOXD*), proteína relacionada à patogênese 1 (*PR-1*), proteína semelhante à osmotina (*PR-5*), a defensina *DEF2*, além do possível ortólogo de *A. thaliana* *SIPROPEP* (Tabela 3).

TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliar níveis de transcritos nas reações de RT-qPCR.

Nome	Acesso*	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
<b>SIPROPEP</b>	AK325093	TCTTCATCCTCGTCGTCCTC	GCTGGAGGGTCATTTTCGTA
<b>PR1<sup>a</sup></b>	X71592	GGACGATGGTCTAGCAGCCTATG	CAGCACCAGCAGCGTTTAGC
<b>PR5<sup>a</sup></b>	AJ277064	TTGTGGTGGAGTCCTGGATTGC	TGGCTGTGCATTGAATTGGATGAC
<b>LoxD<sup>a</sup></b>	U37840	GGCTTGCTTTACTCCTGGTC	ACACAACCTTGATGCCACAT
<b>DEF2<sup>b</sup></b>	U20591	CCATGGCTCGTTCCATTTTCTTC	TTACTCCATCATAATCTCTTCTCAAG
<b>UBI3<sup>c</sup></b>	X58253	TGCAGATCTTCGTGAAAACC	AGCGAGCTTAACCTTCTTCT

\* Número de acesso no GenBank, <sup>a</sup> oligonucleotídeos descritos por Medeiros, 2008; <sup>b</sup> Stoz *et al.*, 2009; <sup>c</sup> Chen *et al.*, 2009.

A determinação do padrão de expressão dos genes selecionados foi realizada pelo método de quantificação relativa usando PCR em tempo real. Para tanto o cDNA das raízes de plantas de tomate inoculadas com *P. dissotocum* e plantas inoculadas com *P.*

*dissotocum* e tratadas com etefon foram analisadas com os oligonucleotídeos referentes aos genes selecionados (Tabela 3). Desta forma, as reações de amplificação consistiram de 4 µL de cDNA diluído 40 vezes; tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; SYBR® Green (Invitrogen) diluído 10000X; 0,2 µL de ROX (Invitrogen); 0,25 U de Platinum® *Taq* e 3,05 µL de água ultrapura para completar o volume de 10 µL. Todas as reações em tempo real foram executadas em um sistema de detecção de sequência modelo 7300 Applied Biosystems com as seguintes condições de termociclagem: 2 min a 50°C; 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Ao final destes ciclos foi realizada a etapa de dissociação que consistiu de 15 s a 95°C; 1 min a 60°C; 15 s a 95°C; 15 s a 60°C.

A especificidade de cada reação de amplificação foi verificada em gel de agarose e também pela curva de dissociação. O limiar de fluorescência foi automaticamente estabelecido. Os valores de ciclo limiar (Ct) de cada reação foram calculados pelo programa “7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4” (Applied Biosystem). Posteriormente, os valores foram exportados para o programa “Excel” (Microsoft). Os níveis de quantificação relativa do gene de interesse em relação ao gene endógeno *UBI* (Ubiquitina) foram determinados pela diferença entre os valores de Ct do gene endógeno pelo CT do gene alvo pela função  $\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{gene endógeno}}$ . A média de quatro plantas inoculadas com *P. dissotocum* sem tratamento foi utilizada como padrão de comparação com as plantas inoculadas e tratadas com etefon. Sendo assim, foi utilizada a função  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{plantas inoculadas com } P. \text{ dissotocum} \text{ tratadas com etefon}) - \Delta Ct (\text{plantas inoculadas com } P. \text{ dissotocum} \text{ sem tratamento})$ . Finalmente, a abundância de transcritos de cada gene de interesse foi determinada por meio da fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas com a aplicação do teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **3.4 Silenciamento dos genes *PDS*, *CTR1*, *ERF1* e do ortólogo *SIPROPEP***

A fim de caracterizar o ortólogo funcional de *AtPROPEP1* de *A. thaliana* em tomate, bem como identificar se as vias de sinalização de defesa mediada por ET/JA estão envolvidas na defesa das plantas de tomate à infecção por *Pythium*, foi realizado o silenciamento de genes *CTR1*, *ERF1* e do ortólogo *SIPROPEP*. As condições e procedimentos necessários para a conclusão do silenciamento em tomate foram estabelecidas utilizando o gene fitoeno desaturase (*PDS*). O presente método fez uso de um vetor de silenciamento baseado no vírus TRV (Valentine *et al.*, 2004) e foi validado para as cultivares de tomate Micro-Tom e Gaúcho. Após a validação do método VIGS em tomate, os mesmos procedimentos empregados no silenciamento do *PDS* foram utilizados para o silenciamento dos demais genes.

#### **3.4.1 Material vegetal e inóculo**

O material vegetal assim como o inóculo de *P. dissotocum* foram obtidos conforme item 3.3.1.

#### **3.4.2 Extração de RNA total e tratamento com DNase**

Para obtenção da sequência codificante dos genes *PDS*, *CTR1*, *ERF1*, *EIN2*, *ERF3*, *TSRF1*, *ETR1*, *MPK1*, *NIMI* e *SIPROPEP* foi realizada a extração do RNA total de plântulas da cv. Micro-Tom seguida do tratamento com DNase e síntese de cDNA, conforme detalhado no item 3.3.3.

#### **3.4.3 Síntese de cDNA**

A reação de síntese de cDNA foi realizada conforme o item 3.3.4.

#### 3.4.4 Clonagem dos genes em pGEM-T© Promega®

Em sequência, o cDNA foi utilizado como molde para a amplificação do *PDS* por PCR em que foram empregados oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *HpaI*, no oligonucleotídeo direto, e *EcoRI*, no oligonucleotídeo reverso (Tabela 4), permitindo a posterior inserção direcional do *PDS* no vetor de silenciamento. A PCR foi composta de tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de  $MgCl_2$ ; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5  $\mu M$  de cada oligonucleotídeo iniciador PDS-direto e PDS-reverso (Tabela 4) 1 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) e 1  $\mu L$  de cDNA, sendo o volume final ajustado com água ultrapura para 20  $\mu L$ . A reação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, pareamento a 55°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min, seguida de uma extensão final a 72°C por 5 min. O tamanho do fragmento amplificado foi estimado em gel de agarose a 2%. Uma vez confirmado o tamanho previsto com a análise da sequência *in silico*, o fragmento foi inserido no vetor de clonagem pGEM-T© Promega® conforme indicação do fabricante. Os fragmentos de cDNA de *CTR1*, *ERF1*, *EIN2*, *ERF3*, *TSRF1*, *ETR1*, *MPK1*, *NIM1* e *SIPROPEP*, um possível ortólogo em tomate foram amplificados com os oligonucleotídeos indicados na Tabela 4 em reações independentes e clonados no vetor pGEM.

TABELA 4. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de genes candidatos de tomate, clonagem e identificação dos insertos no vetor TRV2b.

Nome	Acesso*	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
<b>CTR1</b>	AF110518	TGGTTAACGGAGGTCATGTTGTTCTGC	ATGAATTCGTTGCAATTATGAAGCGGTT
<b>EIN2</b>	DQ409173	TGGTTAACTGGAAATGTCCCTGTA	ATGAATTCCCCATCATCTTGCCTA
<b>ERF1</b>	AY192367	TGGTTAACCGTCCGAGGAAGTGAAACT	ATGAATTCCCGACTCGTAAGTTCCAAGC
<b>ERF3</b>	AY192369	TGGTTAACTCATCATCGCCGTTAGATCT	ATGAATTCCTCCGGTGGAGGAAAAGTTGA
<b>TSRF1</b>	AF494201	TGGTTAACCAAGGAGAAGTCGTACCGA	ATGAATTC AACGGTCTCCACTGGAAA
<b>ETR1</b>	U47279	TGGTTAACTGCTGGCACTGGACTTGGCC	ATGAATTC TTTGCAGGCAATCCGGCCGT
<b>MPK1</b>	AY261512	TGGTTAAC CAGATTGTTGCAGGTTTGATC	ATGAATTC CAGTCTAAAATAAAAATCCACCCCAT
<b>NIM1</b>	AY640378	TGGTTAACTGCACAAGTTGATGGCACGTCTGA	ATGAATTCAGAGCCCTAAGCCGATTCAAGTGCT
<b>PDS</b>	S36691	TGGTTAACGGCACTCAACTTTATAAACC	ATGAATTCCTCAGTTTTCTGTCAAACC
<b>SIPep1</b>	AK325093	TGGTTAACAGGAGGGGAAGACCACCATCAAG	ATGAATTC TCTGAGGAGGAGGTCCACTACCAAC
<b>TRV<sup>a</sup></b>		GAGCATAATTATACTGATTT	CGAGAATGTCAATCTCGTAGG

\* Número de acesso no GenBank. As sequências em destaque representam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI* inseridos nos oligonucleotídeos iniciadores.<sup>a</sup> oligonucleotídeos desenvolvidos por Jane Shaw e Christophe Lacomme, comunicação pessoal.

O produto de ligação entre o inserto (*PDS*, *CTR1*, *ERF1*, *EIN2*, *ERF3*, *TSRF1*, *ETR1*, *MPK1*, *NIM1* ou *SIPROPEP*) e o vetor pGEM-T foi inserido em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* XL-1 e as células transformadas que apresentavam o inserto foram confirmadas por PCR conforme detalhado no item 3.1.8. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, permitindo a identificação das colônias pGEM-PDS, pGEM-CTR1, pGEM-ERF1, pGEM-EIN2, pGEM-ERF3, pGEM-TSRF1, pGEM- pGEM-ETR1, pGEM-MPK1, pGEM-NIM1 e pGEM-SIPROPEP.

### 3.4.5 Extração de plasmídeos recombinantes

As colônias de *E. coli* identificadas por PCR como portadoras dos plasmídeos recombinantes pGEM-PDS ou os insertos supra citados tiveram seu DNA plasmidial extraído por meio da técnica baseada no trabalho de Brasileiro e Carneiro (1998). Sendo assim, as colônias foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido contendo tetraciclina

(15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ampicilina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após o crescimento da cultura por 16 h a 37°C sob agitação (220 rpm), as células foram recuperadas por centrifugação a 4.000 x g por 5 min, sendo o precipitado ressuscitado em 200  $\mu\text{L}$  de solução contendo RNase 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e EDTA 10 mM. Sobre esta mistura foram acrescentados e homogeneizados 200  $\mu\text{L}$  de solução contendo NaOH 200 mM e SDS 1%, promovendo a lise celular. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução de acetato de potássio 3 M, pH 5,5 e após a uma nova homogeneização o material foi centrifugado a 16.000 x g por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo no qual foram adicionados aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v). Após a agitação da mistura, foi realizada uma centrifugação a 16.000 x g por 2 min a 4°C. Para a precipitação do DNA plasmidial, a fase aquosa foi mais uma vez transferida para um novo tubo onde foi acrescentado 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol e 10% de acetato de sódio a 3 M (pH 5,2). Esta nova mistura foi mantida durante 2 h a -20°C. Subsequentemente, foi realizada uma centrifugação a 16.000 x g durante 15 min a 4°C. O precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a 16.000 x g por 5 min a 4°C e ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. A concentração dos plasmídeos foi estimada em gel de agarose a 0,8%, sendo utilizado como marcador 500 ng de  $\lambda\text{HindIII}$  (Invitrogen).

#### **3.4.6 Subclonagem dos insertos no vetor de silenciamento**

O vetor viral TRV foi cedido gentilmente por Jane Shaw e Christophe Lacomme do Instituto de Pesquisa Agrícola da Escócia, Dundee, UK. Este vetor é dividido nos plasmídeos pTRV1 e pTRV2b-GFP. O primeiro plasmídeo contém as sequências que codificam para a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável pela replicação; a proteína ligada ao movimento viral (MP) e a proteína 1b ou 16K, que parece atuar como um supressor fraco do silenciamento (Valentine *et al.*, 2004; Martín-Hernández

& Baulcombe, 2008). Este plasmídeo não é manipulado, sendo apenas inserido e multiplicado em bactérias. O pTRV2b-GFP codifica para a proteína responsável pela produção do capsídeo (CP) e para a proteína 2b ligada ao movimento para raiz, além de conter o sítio múltiplo de clonagem. Esta última região possui os sítios de restrição das enzimas *HpaI* e *EcoRI*, entre os quais se localiza a GFP, que deve ser removida do plasmídeo para inserção das sequências que serão silenciadas quando infiltradas na planta. Para que esta inserção seja possível, estes sítios também estão presentes nos insertos.

Para a realização da subclonagem dos insertos no vetor de silenciamento, os plasmídeos pGEM- inserto e pTRV2b-GFP foram digeridos com as enzimas *HpaI* e *EcoRI*. A reação de digestão para cada plasmídeo consistiu de 550 ng de DNA plasmidial, tampão da *EcoRI* 1X, 10 U de *EcoRI*, 5 U de *HpaI* e água ultrapura para completar o volume final de 50 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 2 h. Imediatamente após o período de incubação, as reações passaram por uma re-extração para inativar a atividade das enzimas. Sendo assim, o volume dos produtos das digestões foi ajustado para 500 µL, ao qual foi acrescentado igual volume de fenol. Após a homogeneização da mistura foi realizada uma centrifugação a 16000 x g por 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi acrescentado 1/2 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A nova mistura foi homogeneizada e centrifugada a 16000 x g por 2 min à temperatura ambiente. Novamente a fase aquosa foi transferida para outro tubo onde foi procedida a etapa de precipitação, a qual difere de acordo com o tamanho do fragmento que se deseja recuperar. No caso do produto de digestão do pTRV2b-GFP a precipitação realizada favoreceu a recuperação de moléculas grandes, ou seja, do vetor pTRV2b. Já o método de precipitação realizado para o produto de digestão do pGEM-PDS e dos demais plasmídeos visou otimizar a recuperação de fragmentos pequenos, ou seja, dos insertos *PDS*, *CTR1*, *ERF1*, *EIN2*, *ERF3*, *TSRF1*, *ETR1*, *MPK1*,

*NIMI* ou *SIPROPEP*. Dessa forma, o primeiro método, de precipitação para recuperação de moléculas grandes, consistiu na adição de 2,5 volumes de etanol absoluto e mais 10% do volume inicial de acetato de amônio (7,5 M) sobre a fase aquosa. A mistura foi homogeneizada e incubada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação a  $16000 \times g$  por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo realizada uma última centrifugação a  $16000 \times g$  por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Por fim, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuspenso em 25  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

O outro método de precipitação, que visou a recuperação de fragmentos pequenos, consistiu na adição de 2 volumes de etanol absoluto sobre a fase aquosa, homogeneização e incubação a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Subsequentemente, a mistura foi centrifugada a  $16000 \times g$  por 30 min a  $3^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 95%. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a  $16000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspenso em 25  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Logo após a etapa de precipitação, a concentração das moléculas digeridas foi estimada em gel de agarose a 0,8% utilizando o  $\lambda\text{HindIII}$  como marcador de massa molecular.

Vale ressaltar que, após as reações de digestão, não foi realizada a purificação dos insertos e do vetor de silenciamento pTRV2b, existindo assim a possibilidade de ocorrerem ligações indesejadas além das ligações de interesse com os insertos. Para a reação de ligação foi utilizado tampão para ligações rápidas 1X (Promega), 100 ng de plasmídeo pTRV2b (12300 pb) e aproximadamente 10 ng de inserto *PDS* (420 pb), 3 U de T4 DNA ligase (Promega) e água ultrapura para completar o volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Esta reação foi incubada a  $4^{\circ}\text{C}$  por 16 h. A ligação de pTRV2b com os demais insertos ocorreu em reações independentes variando a quantidade do inserto em cada uma das reações, 6ng

de *CTR1* (236 pb), 5 ng de *ERF1* (210 pb), 12ng de *EIN2* (568 pb), 4ng *ETR1* (180 pb), 8ng *ERF3* (300 pb), 5ng de *TSRF1* (198 pb), 3ng *NIM1* (138 pb), 4ng *MPK1* (183 pb) ou 1,5 ng de *SIPROPEP* (55 pb), obedecendo a proporção de inserto/vetor de 3:1. A partir deste momento o produto das ligações assim como o vetor pTRV2b-GFP serão denominadas de TRV-GFP, TRV-PDS, TRV-CTR1, TRV-ERF1, TRV-EIN2, TRV-ERF3, TRV-TSRF1, TRV-ETR1, TRV-MPK1, TRV-NIM1 e TRV-SIPROPEP.

Os produtos das ligações foram utilizados para a transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* XL1, com auxílio do eletroporador MicroPulser® BIO-RAD de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do aparelho. As células foram então transferidas para tubos de ensaio e incubadas por 1 h a 37°C sob agitação de 225 rpm. Uma alíquota de 100 µL da cultura de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido, acrescido de 15 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina e 100 µg mL<sup>-1</sup> de canamicina. As bactérias foram mantidas em estufa a 37°C por 12 h.

Parte das colônias que se desenvolveram no meio de cultura acima descrito foram avaliadas por PCR, possibilitando a identificação de colônias contendo o plasmídeo de interesse. A PCR destas colônias foi composta de tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador TRV direto e TRV reverso ( Tabela 4) 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume de 20 µL. As reações foram submetidas às seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 45 s, pareamento a 45°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%. As colônias que apresentaram tamanho correspondente ao inserto ligado no vetor pTRV2b foram empregadas nas etapas que compõem a extração de plasmídeo conforme o item 3.4.5 e sequenciamento. Este último procedimento foi realizado pela empresa ACTGene Análises

Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer*. As amostras enviadas para sequenciamento foram compostas de 100 ng DNA plasmidial acrescido de 4,5 pmol do oligonucleotídeo iniciador TRV-reverso.

### **3.4.7 Infiltração com *A. tumefaciens* contendo os vetores virais**

Uma vez confirmada a obtenção dos plasmídeos TRV com os insertos, estes foram inseridos em células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*, sendo o mesmo realizado para os vetores virais TRV1 e TRV-GFP. As células de *A. tumefaciens* GV3101 utilizadas nesta etapa foram gentilmente fornecidas por José Antônio Peters do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Os plasmídeos contendo os cDNAs dos genes de interesse foram então inseridos em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101 com auxílio do eletroporador MicroPulser® BIO-RAD de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do aparelho. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 1 mL de meio LB líquido, transferidas para tubos de ensaio e incubadas por 3 h a 28°C sob agitação de 190 rpm. Após este período, uma alíquota de 200 µL de cada cultura de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido, acrescido de 100 µg mL<sup>-1</sup> de rifampicina e 100 µg mL<sup>-1</sup> de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 28°C até a visualização das colônias transformadas (aproximadamente 48 h). As colônias obtidas da transformação com TRV-GFP, bem como as obtidas da transformação com TRV-PDS e com os demais insertos, foram submetidas a mesma PCR de colônia detalhada no item 3.4.6, confirmando a presença dos respectivos plasmídeos.

A infiltração da *A. tumefaciens* contendo o vetor viral foi conduzida de acordo com o método descrito por Liu *et al.* (2002b). Para tanto, as colônias de *A. tumefaciens*,

transformadas com TRV1, TRV-GFP, TRV-PDS e TRV-com os demais insertos foram separadamente transferidas para 3 mL de LB líquido contendo  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de rifampicina e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de canamicina. Após o cultivo das colônias a  $28^\circ\text{C}$  por 16 h sob rotação de 190 rpm, 400  $\mu\text{L}$  de cada cultura bacteriana foram adicionados a 20 mL de LB líquido contendo mesma concentração dos antibióticos, 10 mM de MES e 20  $\mu\text{M}$  de Acetoseríngona. As culturas foram novamente submetidas às condições acima mencionadas por 18 h. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro ( $\text{O.D.}_{600\text{nm}}$ ) das seis diferentes culturas bacterianas que foram então transferidas para tubos Falcon e centrifugadas por 10 min a 5000 g. Após a precipitação das células as mesmas foram ressuspensas em uma solução de infiltração composta de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM de MES e 200  $\mu\text{M}$  de Acetoseríngona, sendo a O.D. das culturas ajustada para 2.

As células ressuspensas foram mantidas por 3 h a temperatura ambiente. Antes da infiltração, foi realizada a mistura na proporção 1:1 (v:v) das culturas TRV1 e TRV-GFP (controle), e também das culturas TRV1 e TRV-PDS, TRV1 e TRV- com cada um dos diferentes insertos.

O procedimento de agroinfiltração neste trabalho é assim denominado devido à infiltração da *A. tumefaciens* contendo o vetor viral e o gene a ser silenciado. Desta forma, a agroinfiltração foi realizada na superfície abaxial das folhas cotiledonares de plântulas de tomate (5 a 7 dias após a emergência) utilizando uma seringa de 1 mL. Plantas de tomate cultivar Micro-Tom foram cultivadas em copos plásticos de 50 mL contendo vermiculita e receberam 10 mL da solução nutritiva Viahidroponia dois dias antes da agroinfiltração. Esta solução nutritiva é composta de  $169,4 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$ ,  $16 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4$ ,  $54,1 \text{ mg L}^{-1}$  de P,  $223,3 \text{ mg L}^{-1}$  de K,  $138,7 \text{ mg L}^{-1}$  de Ca,  $35,2 \text{ mg L}^{-1}$  de Mg,  $39,1 \text{ mg L}^{-1}$  de S,  $0,510 \text{ mg L}^{-1}$  de B,  $0,050 \text{ mg L}^{-1}$  de Cu,  $2,470 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe,  $0,427 \text{ mg L}^{-1}$  de Mn,  $0,108 \text{ mg L}^{-1}$  de Mo e  $0,147 \text{ mg L}^{-1}$  de Zn. Para cada um dos eventos de silenciamento 24 plantas foram

agroinfiltradas. Além disso, TRV-PDS foi empregado em todas as repetições dos experimentos de silenciamento para o controle das condições de cada novo experimento, os quais foram sempre realizados em câmara de crescimento a  $23 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 14 h.

### 3.4.8 Confirmação do silenciamento dos diferentes genes

A confirmação do silenciamento do PDS foi realizada pela visualização do fenótipo de fotobranqueamento 14 dias após a infiltração (14 dpi) de TRV-PDS nas plantas, bem como pela quantificação do acúmulo de mRNA por meio de PCR quantitativo em tempo real - RT-qPCR. Aos 8 dpi, os acúmulos de mRNA do *PDS* e dos demais genes silenciados foram quantificados por meio de RT-qPCR e comparados entre as plantas controle, infiltradas com TRV-GFP e as plantas infiltradas com cada um dos genes inseridos no vetor TRV2b conforme descrito a seguir.

### 3.4.9 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

O nível de silenciamento foi estimado pela quantificação do acúmulo de mRNA por meio de RT-qPCR nas raízes das plantas silenciadas. Para tanto, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores que amplificam uma sequência externa a sequência silenciada dos genes (Tabela 3 a 5). As reações de amplificação foram realizadas conforme item 3.3.5. Os níveis de quantificação relativa do gene de interesse em relação ao gene endógeno *UBI* (Ubiquitina) foram determinados pela diferença entre os valores de Ct do gene endógeno pelo CT do gene alvo pela função  $\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{gene endógeno}}$ .

A média de oito plantas infiltradas com TRV-GFP foi utilizada como padrão de comparação com as plantas silenciadas PDS e demais genes silenciados. Sendo assim, foi utilizada a função  $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{TRV-PDS ou outro gene silenciado}) - \Delta CT (\text{TRV-GFP})$ .

Finalmente, a abundância de transcritos de cada gene de interesse foi determinada por meio da fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Os resultados foram submetidos a análise de variância, seguida da utilização do teste Tukey para comparação das médias ( $p < 0,05$ ).

TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.

Nome	Acesso*	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
<b>SICTR1</b>	AF110518	GCCGGAGCTGGTGTAGTGCC	CCAGCTCCTTGCCACCGACG
<b>SIEN2</b>	DQ409173	GCCCCATTCTCCGACGAGCC	CTGCAGTGCCCGTTCGTCCC
<b>SIERF1</b>	AY192367	ACAGTGGCTCCAGCGGCTTTG	AGCGAGTGGCGTTCCTCAG
<b>SIERF3</b>	AY192369	GGACTGCGGCCACGTTCTGC	AGCCTGCAACAGACACCGGC
<b>SITSRF1</b>	AF494201	ACCGGCGAAGGAGAAGTCGT	GCGCCACTACAGGGGAGCAA
<b>SIETR1</b>	U47279	TGCTGGCACTGGACTTGCC	TTTGCAGGCAATCCGGCCGT
<b>SIMPK1</b>	AY261512	GCGCCACTACAGGGGAGCAA	GCAGCTGGGTTTACATGCGGGA
<b>SINIM1</b>	AY640378	CGTCTGCGCCGGATTTGACT	GCGAGCACACTGACCACGGC
<b>ACS</b>	X59139	ATCCACCTTGTTGTGACGA	TGTTTCATCGAGGATTCAGC

\* Número de acesso no GenBank

#### 3.4.10 Teste de patogenicidade das plantas silenciadas para os genes *CTR1*, *ERF1* e *SIPROPEP*.

Buscando caracterizar a função dos genes *CTR1*, *ERF1* e *SIPROPEP* na defesa de plantas de tomate infectadas por *P. dissotocum* e seu envolvimento na via de sinalização mediada por ET. Plantas de tomate foram cultivadas conforme detalhado no item 3.3.1. Aos cinco dias após a emergência, plântulas uniformes foram selecionadas e agroinfiltradas TRV-GFP (controle) e com TRV-CTR1, TRV-ERF1 e TRV-SIPROPEP. Cinco dias após a agroinfiltração as plantas foram inoculadas com um bloco de meio de CM (5mm x 5mm) contendo micélio de *P. dissotocum*. O tratamento controle consistiu no cultivo das plantas silenciadas sem a presença do patógeno.

O experimento foi conduzido com três repetições para cada um dos genes em questão. Cada lote de silenciamento consistiu de 16 plântulas, com três repetições, sendo

que 8 plântulas foram inoculadas com o patógeno e 8 plântulas não foram expostas à presença do patógeno. A incidência da doença foi avaliada quanto a presença ou ausência de sintomas de necrose na região do colo das plântulas 3 dias após a inoculação. Enquanto que a severidade da doença foi avaliada por meio de uma escala de sintomas (Figura 3).

Uma amostra de quatro raízes das plântulas foram submetidas à análise de microscopia para observar as estruturas de *P. dissotocum*. Para tanto pequenas porções das regiões infectadas foram coradas com azul de trypan e visualizadas em microscópio óptico.

Para posterior análise de expressão gênica, as raízes das plântulas silenciadas inoculadas e não inoculadas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -70°C até o momento da extração de RNA total e de DNA.

#### **3.4.10.1 Análise da expressão de genes de resistência a patógenos nas plantas TRV-SIPROPEP por RT-qPCR**

O acúmulo de mRNA de genes que estão envolvidos na resistência de plantas à patógenos necrotróficos foi verificado por meio de RT-qPCR nas raízes das plantas silenciadas. Os genes selecionados *ACS*, *ERF1*, *LOXD*, *PR-1*, *PR-5* e *DEF2* foram analisados neste experimento. O padrão de expressão dos genes selecionados foi verificado pelo método de quantificação relativa usando PCR em tempo real. Para tanto o cDNA das raízes de plantas TRV-SIPROPEP e plantas TRV-GFP foram analisadas com os oligonucleotídeos referentes aos genes selecionados (Tabela 3 e 5) conforme reação realizada no item 3.3.5.

### 3.4.10.2 Extração de DNA e quantificação de *P. dissotocum* por qPCR

Para investigar se a redução ou aumento dos sintomas causados por *P. dissotocum* nas plantas silenciadas para os genes *CTR1*, *ERF1* e *SIPROPEP* estão relacionados com a colonização do patógenos nos tecidos das plantas foi realizada a quantificação de *P. dissotocum* nas raízes das plantas TRV-CTR1, TRV-ERF1 e TRV-SIPROPEP e das plantas controle TRV-GFP inoculadas com o isolado 123 de *P. dissotocum*, através de PCR quantitativo por “real time” utilizando os oligonucleotídeos iniciadores DC-6 direto - GAGGGACTTTTGGGTAATCA (Cooke *et al.*, 2000) e ITS-4 reverso - TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990).

O DNA do patógeno foi isolado das raízes das plantas agroinfiltradas e inoculadas com *P. dissotocum* junto a interfase e a camada de fenol-clorofórmio salvas da fase de separação do RNA seguindo o protocolo do TRIzol<sup>®</sup> reagente (Ambion) e a extração foi procedida conforme as instruções do fabricante.

A quantificação de *P. dissotocum* foi realizada por qPCR em tempo real. Para tanto o DNA das raízes de quatro plantas de tomate silenciadas TRV-CTR1, TRV-ERF1 e TRV-SIPROPEP inoculadas com *P. dissotocum* e plantas TRV-GFP inoculadas com *P. dissotocum* foram analisadas com os oligonucleotídeos DC-6 direto e ITS-4 reverso. Desta forma, as reações de amplificação consistiram de 4 µL de DNA diluído 10 vezes; tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; SYBR<sup>®</sup> Green (Invitrogen) diluído 10000X; 0,2 µL de ROX (Invitrogen); 0,25 U de Platinum<sup>®</sup> *Taq* e 3,05 µL de água ultrapura para completar o volume de 10 µL. Todas as reações em tempo real foram executadas em um sistema de detecção de sequência modelo 7300 Applied Biosystems com as seguintes condições de termociclagem: 2 min a 50°C; 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Ao

final destes ciclos foi realizada a etapa de dissociação que consistiu de 15 s a 95°C; 1 min a 60°C; 15 s a 95°C; 15 s a 60°C.

A especificidade de cada reação de amplificação foi verificada em gel de agarose e também pela curva de dissociação. O limiar de fluorescência foi automaticamente estabelecido. Os valores de ciclo limiar (Ct) de cada reação foram calculados pelo programa “7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4” (Applied Biosystem). Posteriormente, os valores foram exportados para o programa “Excel” (Microsoft). Os níveis de quantificação relativa do gene de interesse em relação ao gene endógeno *UBI* (Ubiquitina) foram determinados pela diferença entre os valores de Ct do gene endógeno pelo CT do gene alvo pela função  $\Delta Ct = Ct_{ITS} - Ct_{UBI}$ . A média de quatro plantas inoculadas com *P. dissotocum* sem tratamento foi utilizada como padrão de comparação com as plantas inoculadas e tratadas com etefon. Sendo assim, foi utilizada a função  $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  (plantas silenciadas - CTR1, ERF1 ou SIPROPEP inoculadas com *P. dissotocum*) -  $\Delta CT$  (plantas TRV-GFP inoculadas com *P. dissotocum*). Finalmente, a abundância de transcritos de cada gene de interesse foi determinada por meio da fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas com a aplicação do teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Validações da biblioteca subtrativa

Com o objetivo de obter uma biblioteca de genes diferencialmente expressos para identificação de genes induzidos pela superexpressão de *AtPROPEP1* e envolvidos na defesa de plantas à infecção por patógenos foi realizada a hibridização subtrativa do cDNA de plantas de *A. thaliana* transformada com vetor pEGAD utilizadas como amostra controle e *A. thaliana* superexpressando *AtPROPEP1*, amostra a ser testada.

Para a construção da biblioteca de genes diferencialmente expressos foi utilizada a técnica de hibridização subtrativa de cDNAs baseado em PCR proposta por Mishra *et al.* (2005). Esta técnica apresenta modificações na síntese dos cDNAs das amostras controle e superexpressando *AtPROPEP1* nos quais foi acrescentado uma sequência conhecida na região 5' nos oligonucleotídeos P1dT e P2dT, permitindo a posterior amplificação da amostra controle com o oligonucleotídeo P1 reverso e a amplificação dos cDNAs diferencialmente expressos com o oligonucleotídeo P2 reverso (Figura 2). Além disso, foi ligado um adaptador com uma sequência conhecida na região 3' do cDNA de ambas amostras que permitiram a amplificação dos cDNAs das amostras controle pelo pareamento com o oligonucleotídeo P1 direto e da amostra superexpressando *AtPROPEP1* com P2 direto. Outra adaptação do método foi o uso da interação biotina-estreptavidina aliada à tecnologia de microesferas magnéticas para eficiente remoção das populações comuns de cDNAs durante a hibridização subtrativa. Reduzindo desta forma, a

complexidade dos cDNAs antes da PCR para o enriquecimento dos genes diferencialmente expressos a partir da população de cDNA diferencial.

A técnica de hibridização subtrativa de cDNAs foi validada por PCR com oligonucleotídeos do gene constitutivo *GAPDH* e do gene induzido *AtPROPEP1* (Figura 4). Pode-se verificar que o produto amplificado de *GAPDH* é mais intenso na amostra controle do que na amostra *AtPROPEP1*, pois a amostra controle foi amplificada a fim de aumentar o material inicial a ser subtraído (Figura 2 e 4A). Além disso, quando foi analisado o produto de PCR com as esferas magnéticas, onde ocorre a hibridização das amostras controle e *PROPEP1*, ainda observou-se a presença do gene endógeno mas não o produto da amplificação de *GAPDH* após a hibridização (Figura 4A). Já quando foi analisado o produto amplificado do gene *AtPROPEP1* nas amostras controle e superexpressando *AtPROPEP1*, observou-se que a intensidade na amostra controle é menor que a intensidade na amostra amplificada superexpressando *PROPEP1* (Figura 4). Diferentemente do que ocorreu com o produto referente ao *GAPDH*, a maior intensidade observada na amostra *PROPEP1* se deve à superexpressão do gene nesta amostra. Neste caso, verificou-se que o produto amplificado de *AtPROPEP1* após a hibridização aumentou de intensidade (Figura 4B). Este resultado comprova que ocorreu uma diminuição na intensidade do produto amplificado de *GAPDH* da amostra da biblioteca diferencial em relação a um aumento da expressão do gene induzido *AtPROPEP1*. Desta forma, o efeito subtrativo da biblioteca foi verificado. E foi possível dar continuidade nas etapas de digestão e posterior clonagem dos cDNAs diferencialmente expressos no vetor pGEM-T.

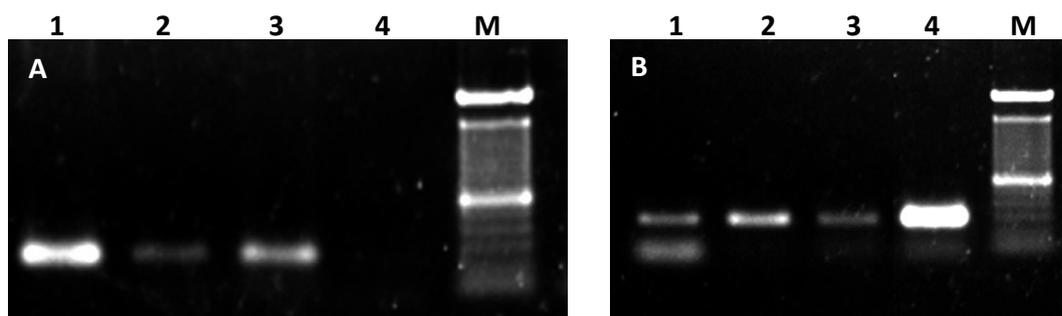


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose com fragmentos amplificados de *AtPROPEP1*. (A) Produto da amplificação de RT-PCR obtido de cDNA de *A. thaliana* com os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R de *A. thaliana* transformada com vetor pEGAD (controle) (1); de *A. thaliana* superexpressando *PROPEP1* (PROPEP1) (2); de esferas magnéticas contendo o híbrido controle X *PROPEP1* (3); do produto da hibridização controle x *PROPEP1* (4). (B) Produto da amplificação de RT-PCR obtido de cDNA de *A. thaliana* com os oligonucleotídeos *PROPEP1*-F e *PROPEP1*-R de *A. thaliana* transformada com vetor pEGAD (controle) (1); de *A. thaliana* superexpressando *AtPROPEP1* (PROPEP1) (2); esferas magnéticas contendo o híbrido controle X *PROPEP1* (3); Produto amplificado da hibridização controle x *PROPEP1* (4). M – marcador de massa molecular 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen).

#### 4.2 Análises de similaridade das seqüências

A clonagem da biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos no vetor pGEM-T teve como objetivo identificar os cDNAs através de análise de similaridade das seqüências obtidas pelo sequenciamento.

A eletroporação da biblioteca de cDNAs no vetor pGEM-T produziu 153 colônias recombinantes das quais após a reação de PCR com os oligonucleotídeos M13 direto e reverso foram selecionadas para sequenciamento 55 amostras que apresentaram produto de PCR com tamanho entre 400 e 1000 pb indicando que ocorreu a inserção de uma seqüência da biblioteca de cDNA. O restante das amostras foram considerados falsos positivos por apresentarem fragmentos de tamanho igual ou muito próximo ao fragmento de 250 pb do vetor pGEM-T sem a presença de inserto. A análise dos resultados do sequenciamento possibilitou a identificação de 12 fragmentos com identidade superior a 95% com as

sequências depositadas no NCBI (tabela 6). Os demais fenogramas apresentaram valor de E Blast não significativo para a maioria dos fragmentos de cDNA ou não foi encontrada nenhuma similaridade no banco de dados com *A. thaliana*. Embora tenha sido verificada uma alta identidade nos fragmentos analisados não foram identificados sequências de cDNAs completos (tabela 6). Este fato impossibilitou a clonagem dos fragmentos no vetor pEGAD e a transformação de *A. thaliana*. Porém, a comparação das sequências dos fragmentos diferencialmente expressos de cDNA com as depositadas no NCBI permitiu identificar: uma proteína “zinc finger”, uma provável nuclease dependente de Ca, uma subunidade do fotossistema I, uma subunidade do fotossistema II, uma provável subunidade regulatória do proteossoma 26S, uma proteína rica em glicina, cinco proteínas “simporter” (sódio:soluto), uma proteína do tipo hidrolase e três proteínas hipotéticas (tabela 6). Embora os genes identificados através destes cDNAs estejam envolvidos nos processos fisiológicos e de desenvolvimento da planta pouco é conhecido sobre suas funções na resistência de plantas aos patógenos. No entanto a construção da biblioteca de cDNAs contribuiu para identificar pelo menos um gene previamente descrito na defesa de plantas a patógenos. A identificação do gene que codifica para uma proteína rica em glicina GRP3 é expressa mediante estímulos externos como ferimento, hormônios, infecção por patógenos, estresse hídrico e luz (de Oliveira *et al.*, 1990; He *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001). Além disso, este gene foi encontrado em diferentes espécies e possui ortólogos em fumo e petúnia (Hooft Van Huijsduijnen *et al.*, 1988; Linthorst *et al.*, 1990). Este resultado juntamente com a descoberta de um possível ortólogo de *AtPROPEPI* em batata (Huffaker *et al.*, 2006) sugere que os mecanismos de defesa em *A. thaliana* e solanáceas podem ser preservados entre estas espécies.

Desta forma, para estudar os mecanismos de defesa à *Pythium* spp. em solanáceas torna-se importante buscar genes relacionados à defesa aos ortólogos de *A. thaliana*.

TABELA 6. Análise da similaridade dos clones de *E.coli* obtidos pela técnica de biblioteca subtrativa de cDNAs diferencialmente expressos.

Identificação	Tamanho total (pb) /sequência similar (pb)*	Características da sequência	Nº de Acesso no GenBank	I** (%)
Proteína da família “zinc finger”	1596/229	Envolvida na regulação da transcrição e na ligação de íons zinco	NM_105523	100
Nuclease dependente de Ca <sup>2+</sup>	1290/407	Envolvida na ligação de ácidos nucleicos, e em atividade de nuclease e hidrolase	NM_201920	99
Subunidade O do fotossistema I	703/380	Envolvida na resposta a estresse salino e fotossíntese	NM_100711	95
Proteína da família “simporter” – DUR3	2526/249	Envolvida no transporte transmembrana de uréia, atividade “simporter” sódio:soluto e nas respostas celulares á falta de nitrogênio	NM_123906	99
Proteína rica em glicina-GRP3	710/322	Envolvida nas respostas a estímulos por etileno, ABA, AS e dissecação	NM_126575	99
Subunidade regulatória do proteassoma 26S	1266/404	Envolvida na resposta a estresse salino e processos catabólicos de proteínas dependente de ubiquitina	NM_122261	99
Subunidade R do fotossistema II	720/229	Envolvida na construção estável do fotossistema II, regula a transferência de elétrons e a concentração de íons	NM_106555	100
Proteína da família das hidrolases	1114/353	Envolvida na atividade de hidrólise, na atividade catabólica e nos processos metabólicos	NM_128774	100
Proteína hipotética	1348/450	Encontrada no cromossomo 1, função desconhecida – ligada a Actina	NM_105658	99
Proteína hipotética	1586/352	Clone RAFL04-15-F17, encontrada no cromossomo 4 - proteína associada à membrana	NM_118894	99
Proteína hipotética	642/332	Clone GSLTSIL27GZ12 de sfiliquas de <i>A.thaliana</i>	BX821232	99

\* Tamanho total da sequência depositada no GenBank em pares de base/nº de bases similares do clone sequenciado.

\*\*Percentual de identidade da sequência obtida pelo sequenciamento com relação à sequência depositada no GenBank.

### 4.3 Identificação do gene ortólogo de *PROPEP1* de *A. thaliana* em solanáceas

Baseado na observação de que muitos genes são conservados entre as espécies, o objetivo deste estudo foi identificar um gene ortólogo de *AtPROPEP1* de *A. thaliana* em

solanáceas e desta forma, transferir os conhecimentos obtidos em *A. thaliana* para uma espécie de importância agrícola. Espécies de solanáceas, incluindo algumas de grande importância agrícola, como fumo e tomate enfrentam sérias perdas na produção de mudas devido à infecção com *Pythium* ssp. (Sutton *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2011). Devido à importância de estudos na resistência de patógenos necrotróficos e da identificação de um possível ortólogo de *PROPEP1* de *A. thaliana* em *Solanum tuberosum* (Huffaker *et al.*, 2006), buscou-se verificar a presença de ortólogos de *PROPEP* em diferentes solanáceas. Para tanto, foram projetados oligonucleotídeos na região conservada C-terminal dos diferentes membros da família *PROPEP* em *A. thaliana*, a qual compreende o peptídeo *AtPep*, responsável pela amplificação das respostas de defesa contra patógenos (Huffaker *et al.*, 2006) e também na região C-terminal do possível ortólogo de *S. tuberosum*.

Inicialmente foram realizadas reações independentes de PCR com cada um dos pares de oligonucleotídeos dos membros da família *PROPEP* para as espécies de solanáceas do banco de sementes do Laboratório de Fitopatologia Molecular. Dezesesseis amostras das espécies de solanáceas foram analisadas com os oligonucleotídeos dos seis membros da família *PROPEP*. Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T e 42 amostras foram enviadas para sequenciamento com o oligonucleotídeo M13 reverso. Através da análise de sequenciamento identificou-se cinco clones e cDNAs de sequências relacionadas com *S. lycopersicum*, duas sequências apresentaram similaridade com sequências de *A. thaliana* e somente uma sequência apresentou similaridade com o clone de *S. tuberosum* o qual é descrito na literatura como ortólogo aos membros da família *PROPEP* de *A. thaliana*.

A partir do clone de *S. tuberosum* encontrado através do sequenciamento, foi identificado *in silico* uma sequência nucleotídica em *S. lycopersicum* (GenBank: AK325093) com 86% de identidade com a sequência descrita por Huffaker *et al.*, 2006

como um possível ortólogo de PROPEP em *S. tuberosum* (GenBank: CV505388). A sequência de *S. lycopersicum* foi identificada em uma biblioteca de clones de cDNAs completos de *S. lycopersicum* depositada na base de dados do NCBI. Esta biblioteca foi construída a partir da mistura de RNAs extraído de folhas de Micro-Tom. As plantas foram expostas a diferentes estímulos como patógenos biotróficos, necrotróficos e aos hormônios AS e JA (Aoki *et al.*, 2010).

As sequências proteicas oriundas das sequências nucleotídicas de *S. tuberosum* e *S. lycopersicum* foram preditas através do programa ORF Finder do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Através de análises *in silico* foi possível verificar que o cDNA correspondente à *SIPROPEP* pertence ao cromossomo 4 de *S. lycopersicum* e que este gene possui um íntron com 1355 pb (apêndice 1). Quando foram comparadas as proteínas deduzidas a partir das regiões codificantes de *S. tuberosum* e *S. lycopersicum* verificou-se que estas apresentam 77% de identidade, sendo que a região C-terminal, onde se encontra o peptídeo elicitor da via de sinalização de defesa em plantas, apresentou 96% de identidade (Figura 5). Embora a identidade entre a sequência de aminoácidos de *AtPROPEP1* e *SIPROPEP* seja de apenas 14%, ambas dividem motivos estruturais característicos dos membros da família PROPEP. Quando a *SIPROPEP* foi comparada com a sequência proteica dos diferentes membros da família *PROPEP1* observou-se que parte do domínio conservado na região C-terminal (SSG(R/K)xGxxN) presente em todos os parálogos da família PROPEP e em parte nos seus ortólogos (Narváez-Vásquez & Orozco-Cárdenas, 2008) está presente na sequência de tomate (Figura 5A e B). Além disso, também foi confirmada a presença de um resíduo de glicina na posição 17 (Gly-17) na região C-terminal característica encontrada em todos os homólogos e ortólogos de PROPEP (Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker *et al.*, 2011), bem como um resíduo de asparagina (N). Estes resíduos são essenciais para a atividade de

AtPep1 e sua ligação com o receptor (Pearce *et al.*, 2008, Huffaker *et al.*, 2011). Como AtPep1 e ZmPep1, um ortólogo funcional de AtPep1 recentemente identificado em milho, a porção N-terminal de SlPep é rica em resíduos básicos contendo quatro resíduos de arginina (R) e um resíduo de lisina (K) comparado com cinco resíduos de lisina e um resíduo de arginina localizado no N-terminal de AtPep1(Huffaker *et al.*, 2006) e cinco resíduos de arginina em ZmPep1(Huffaker *et al.*, 2011). Além disso, o resíduo de lisina encontrado em SlPep está na mesma posição no N-terminal de AtPep1 (Figura 5B). Pearce *et al.* (2008) sugere que a porção N-terminal do peptídeo pode ser importante para acessar o receptor localizado na membrana plasmática pela parede celular e a região C-terminal é responsável pela ligação no receptor e sua sinalização para o interior da célula.

Diversas características estruturais em comum entre os peptídeos foram observadas, indicando que a sequência de tomate identificada na biblioteca de cDNA depositada no NCBI pode ser um ortólogo funcional ao *PROPEP1* de *A. thaliana*.

**A****AtPROPEP1**

MEKSDRRSEESHLEWIPQLQCLDQTLRAILKCLGLFHQDSPTTSSPGTSKQPKEEKEDVTMEKEE  
VVVTSR**ATKVKAKQRGKEKVSSGRPGQHN\***

**StPROPEP**

MFYLQEGIKAILKCLGFESSKLVHQASSSSSSSSMSDINKNEEESEKQEQCFLVQEDGNKQ  
GSDSTNDNYKNDPPVENDDPPQSETIL**PTERRGRPPSRPKVGS**GPPQNN\*

**SIPROPEP**

MEEKKESRSSVYDEVITKNPFFYLQEGIKAILKCLGFESSKLVHQASSSSSSSSSSSSSSSSSSSM  
LGTNNKKEEESEKQEQCFLFHEDGKKQGSSTNDNYENDPPAETNDEDPTLIL**ATDRRGR**  
**PPSRPKVGS**GPPQNN\*

**B**

**AtPep1** ATKVKAKQRGKE**KVSSGRPGQHN\***

**StPep1** **PTERRGRPPSRPKVGS**GPPQNN\*

**SIPep1** **ATDRRGRPPSRPKVGS**GPPQNN\*

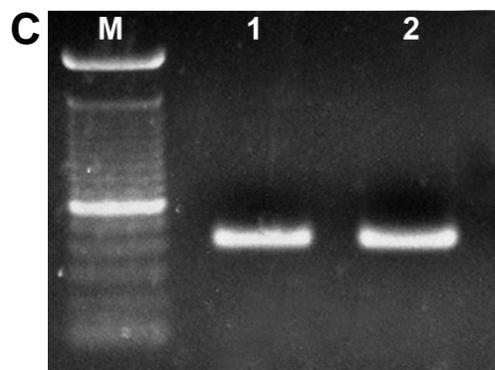


FIGURA 5. Análise dos possíveis ortólogos a *AtPROPEP* em solanáceas. (A) Comparação das proteínas codificadas por *AtPROPEP1*, *StPROPEP* e *SIPROPEP*. Em vermelho a sequência do peptídeo Pep1. (B) Comparação das características conservadas do peptídeo AtPep1 e dos possíveis ortólogos StPep1 e SIPep1. Em vermelho estão representados as sequências conservadas entre os peptídeos de solanáceas e *A. thaliana*. Em azul estão representados os resíduos básicos. Em verde estão representados as sequências conservadas entre os peptídeos de *S. tuberosum* e *S. lycopersicum* (C) Eletroforese em gel de agarose com fragmentos amplificados do possível ortólogo de *PROPEP1*. Produto da amplificação de DNA de *S. lycopersicum* com os oligonucleotídeos SIPROPEP1-F e SIPROPEP1-R (1) *S. lycopersicum* cv. Gaúcho (2) *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom; M – marcador de massa molecular 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen);

Com base nas análises *in silico* que apontaram o início da transcrição na sequência do possível ortólogo de tomate foram projetados oligonucleotídeos e posteriormente

realizadas reações de PCR com o DNA de plântulas das diferentes solanáceas para verificar se este gene está presente em alguma das espécies analisadas.

As cultivares Gaúcho e Micro-Tom de *S. lycopersicum* apresentaram produto amplificado (Figura 5C). A grande diferença encontrada entre a sequência dos membros da família PROPEP, mesmo na região C-terminal, pode ser um dos motivos da dificuldade de amplificação nas diferentes solanáceas. Além disso, este resultado sugere que existe uma diversidade entre as espécies de solanáceas e pelo fato da amplificação ser em uma região específica não foi possível à amplificação do fragmento. Após amplificação, os fragmentos gênicos foram purificados e sequenciados. Através da comparação das sequências obtidas do o sequenciamento com aquelas previamente descritas para este gene no GenBank, foi identificado um possível ortólogo ao gene *AtPROPEP1* de *A. thaliana* em solanáceas, que será referido deste momento em diante como *SIPROPEP* – gene codificante da proteína precursora e SIpep – peptídeo, localizado na região C-terminal.

A expressão basal do gene *SIPROPEP* foi medida nos diferentes tecidos da planta. Para tanto, o acúmulo de mRNA foi quantificado por RT-qPCR a partir do cDNA de raiz, caule, folha, flor e fruto de tomate cv. Micro-Tom. O gene foi expresso em todos os tecidos da planta (Figura 6). Os níveis mais baixos foram obtidos nas raízes. Em função disso, o acúmulo do mRNA de *SIPROPEP* obtido nas raízes foi utilizado para comparação entre os outros tecidos da planta e verificou-se que *SIPROPEP* é três vezes mais expresso no caule e nas flores (Figura 6). Segundo Huffaker *et al.* (2006) *PROPEP1* foi expresso em todos os tecidos da planta e apresentou grande importância para amplificação das respostas de defesa contra *P. irregulare*.

Visto que este é o primeiro relato que identifica estruturalmente um possível ortólogo de *AtPROPEP1* e seu peptídeo de *A. thaliana* em tomate buscou-se caracterizar o papel de *SIPROPEP* nas respostas de defesa a patógenos necrotróficos.

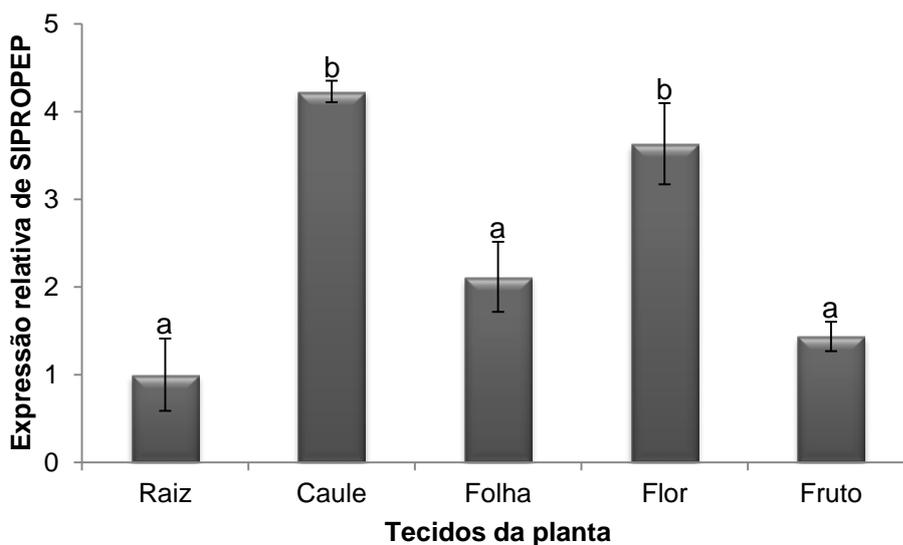


FIGURA 6. Expressão do gene *SIPROPEP* em diferentes tecidos de tomate cv. Micro-Tom. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do gene endógeno (Ubiquitina). Os valores de expressão representam o número de vezes que a expressão de *SIPROPEP* aumenta ou diminui comparado com a expressão relativa nas raízes. Os valores são médias de três plantas, cada uma sendo considerada uma repetição. As médias que receberam as mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 Influências das diferentes vias de sinalização de defesa em *S.*

##### *lycopersicum* à infecção por *P. dissotocum*.

As plantas respondem ao ataque de patógenos ativando a expressão de uma série de genes envolvidos nos mais diversos processos de defesa. Uma das respostas induzidas pelas plantas é a ativação de vias de defesa mediadas por hormônios vegetais. Entre esses, o etileno e o ácido jasmônico são comumente associados à defesa contra patógenos necrotróficos, enquanto o ácido salicílico está mais relacionando com a defesa a patógenos biotróficos (Glazebrook *et al.*, 2005). Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi verificar a influência dos hormônios AS, JA ou ET na resposta das plantas de Micro-Tom a infecção por *P. dissotocum*. Para tanto foram realizados experimentos com plântulas de tomate simultaneamente inoculadas com *P. dissotocum* e submetidas aos tratamentos AS,

MeJA e ET. Cabe ressaltar que o hormônio vegetal etileno foi usado na forma de etefon, o qual se decompõe em etileno, fosfato e íons cloreto em soluções aquosas (Yang, 1969; citado por Goudey *et al.*, 1987).

A avaliação foi realizada três dias após a inoculação e verificou-se que todas as plantas inoculadas com *P. dissotocum* apresentaram sintomas de necrose na base do caule e nas raízes, independente do tratamento. Neste caso, verificou-se que nenhum tratamento inibiu completamente a infecção das plantas pelo patógeno. No entanto, as plantas tratadas com etefon desenvolveram sintomas menos severos da doença, indicando que o tratamento pode restringir ou retardar a colonização do patógeno (Figura 7).

A ocorrência de maior ou menor severidade na doença provocada por diferentes espécies do gênero *Pythium* depende tanto da virulência de cada patógeno, quanto da resposta da planta aos mesmos (Medeiros, 2008; Trivilin, 2008). Desta forma, torna-se importante avaliar a severidade da doença na interação de tomate com *P. dissotocum* nos diferentes tratamentos.

Diferentemente da quantificação das doenças causadas por patógenos foliares a quantificação dos sintomas em plantas inoculadas com patógenos radiculares é mais difícil. Isto porque na interação com *Pythium* spp. as raízes de plantas jovens são o alvo de infecção do patógeno e muitas vezes o tecido necrosado torna-se encharcado e mole misturando-se ao substrato. Patógenos do gênero *Pythium*, além de necrose nas raízes, causam manchas necróticas no colo das plantas infectadas, as quais em grande número podem coalescer provocando a constrição do colo e posterior tombamento das plantas. Assim, a severidade dos sintomas nos experimentos foi estimada através de uma escala de notas de acordo com o tamanho e no número de manchas necróticas no colo das plântulas (Figura 7A).

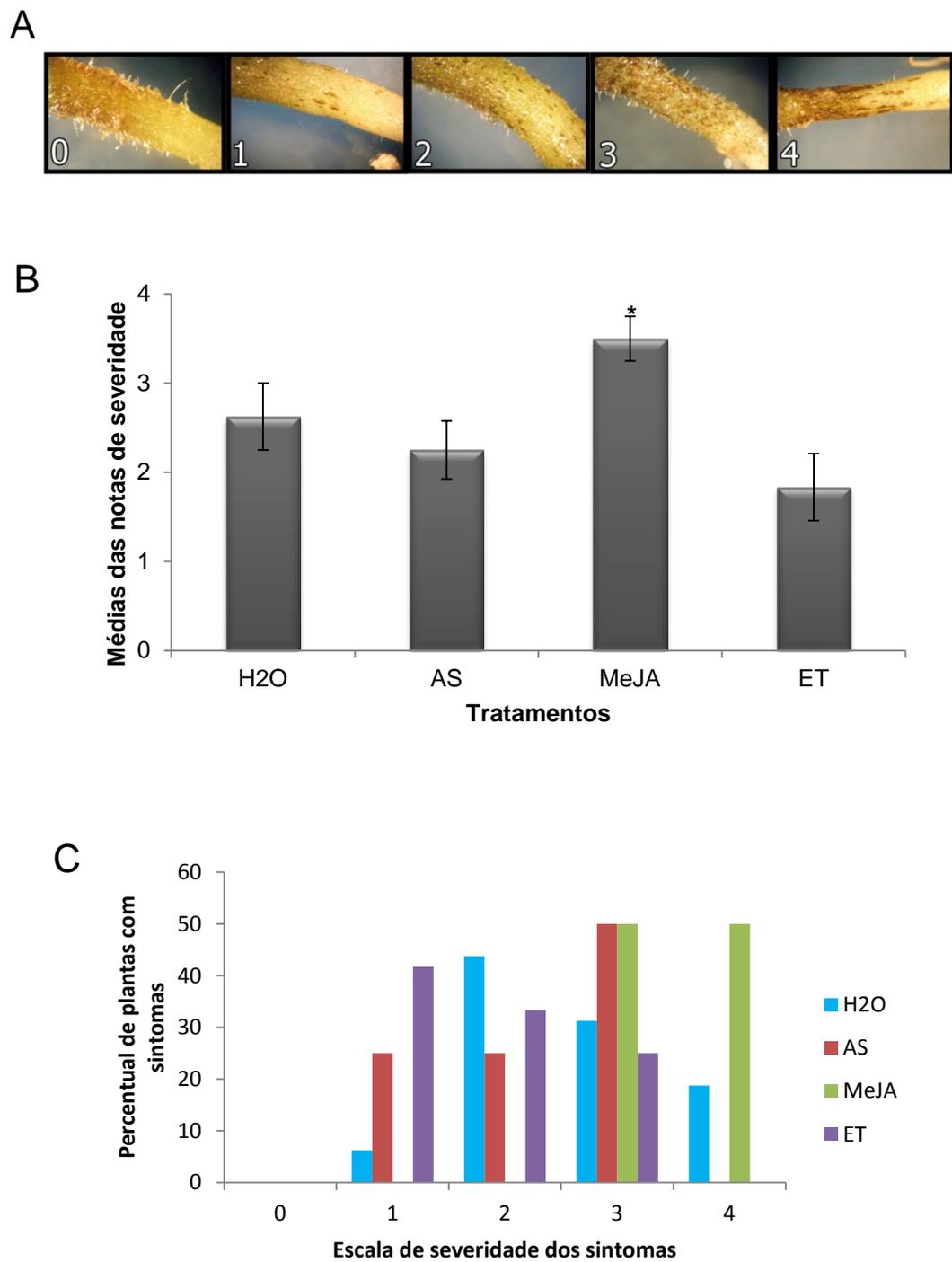


FIGURA 7. Distribuição de classes de sintomas causados por *P. dissotocum* em plantas de tomate cv. Micro-Tom sob diferentes tratamentos. Escala de severidade dos sintomas observados em tomate cv. Micro-Tom (A). Média das notas da escala de severidade dos sintomas observados em 12 plantas inoculadas com *P. dissotocum* expostas aos seguintes tratamentos: controle (H<sub>2</sub>O), Ácido salicílico (AS), Metil jasmonato (MeJA) e Etefon (ET) (B). \* Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Comparação da severidade dos sintomas observados em tomate inoculadas com *P. dissotocum* expostas aos diferentes tratamentos (C).

Na avaliação da média das notas das plantas inoculadas e submetidas aos diferentes tratamentos somente o tratamento com MeJA diferiu das plantas controle, ou seja, somente inoculado com *P. dissotocum* (H<sub>2</sub>O). A severidade da doença em plantas inoculadas com *P. dissotocum* aumentou significativamente de 2,6 nas plantas controle para 3,5 no tratamento com MeJA (Figura 7A e B). No tratamento com MeJA foram observados os casos mais severos da doença, com manchas necróticas grandes e numerosas que coalescem formando a constrição no colo das plântulas, características da nota 4 na escala de severidade da doença (Figura 7C).

Em *A. thaliana*, a importância do fito-hormônio JA na resistência de plantas a *Pythium* spp. tem sido descrita pelo uso de mutantes *fad* e *jar1* os quais foram suscetíveis a *P. mastophorum* e *P. irregulare* (Vijayan *et al.*, 1998; Staswick *et al.*, 1998). Além disso, a aplicação exógena de MeJA promoveu a resistência dos mutantes a níveis próximos ao das plantas não mutantes (Vijayan *et al.*, 1998). No entanto, no presente trabalho as plantas de tomate tratadas com MeJA foram mais suscetíveis à *P. dissotocum* que as plantas controle. Indicando que JA pode não ser importante para sinalização de defesa na interação de tomate com *P. dissotocum*. Porém foi realizada apenas uma repetição deste experimento e mais repetições devem ser realizadas para uma conclusão a respeito do envolvimento de JA nesta interação.

Em contraste, a adição de ET reduziu a média das notas da escala de severidade da doença de 2,6 nas plantas controle para 1,8 (Figura 7B). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas comparado com as plantas controle inoculadas com o patógeno nas plantas inoculadas e tratadas com etefon não foram observados sintomas severos e mais de 70% das plantas apresentaram poucas manchas necróticas e em menor número (nível 1 e 2 na escala de severidade de doença). Estes resultados apontam para um

efeito benéfico do tratamento com ET evitando a colonização do patógeno nos tecidos da planta (Figura 7C). Ainda que tenha ocorrido infecção nas plantas tratadas com ET, o nível de severidade da doença foi muito menor.

Em diversos trabalhos, foi verificado que o tratamento com etefon, assim como etileno induziu respostas de defesa como proteínas PR e a biossíntese de fitoalexinas (Hong *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 2004; Belhadj *et al.*, 2008) e também aumentaram a resistência de diferentes plantas a patógenos biotróficos e necrotróficos (Knoester *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2002; Belhadj *et al.*, 2008; Abdel-Monaim, 2012).

O papel do etileno na defesa de plantas contra *Pythium* spp. tem sido demonstrado em plantas transgênicas de fumo (Tetr) e mutantes de *A. thaliana* (*etr1-1*, *ein2-1*, *ein2-5*) insensíveis a etileno, as quais apresentaram maior suscetibilidade à infecções causadas por *Pythium* spp. (Geraats *et al.*, 2002; van Loon *et al.*, 2006; Adie *et al.*, 2007). Além disso, Medeiros (2008) observou que a adição de etefon levou a ausência de sintomas nas plantas de tomate inoculadas com diferentes espécies de *Pythium*. Enquanto o tratamento com o inibidor da síntese de etileno, AVG, provocou um aumento no número de plantas com necrose nas plântulas inoculadas com *P. inflatum*, mas não nas plantas inoculadas com *P. ultimum* e *P. deliense*, comparado com as plantas não tratadas e inoculadas com os respectivos patógenos. Estes resultados sugerem que o etileno desempenha um papel diferencial na resposta de tomate a *Pythium* spp.

No tratamento com AS aproximadamente 50% das plântulas inoculadas com *P. dissotocum* apresentaram uma grande quantidade de manchas necróticas no colo (Figura 7C). Além disso, quando comparado com as plantas controle verificou-se que a aplicação exógena de AS não reduziu significativamente a necrose causada por *P. dissotocum*. Embora as vias de sinalização de AS, JA, ET e ácido absísico tenham sido reportadas por

ativar respostas de defesa de plantas contra *Pythium* spp. (Staswick *et al.*, 1998; Adie *et al.*, 2007), a aplicação exógena de AS em plantas de pepino não induziu resistência sistêmica à podridão radicular causada por *P. aphanidermatum* (Chen *et al.*, 1999). Em contraste, a adição desse hormônio em plântulas de tomate inoculadas com *P. deliense* e *P. ultimum* resultou em reduções significativas na incidência da doença, retardando o crescimento do patógeno (Medeiros, 2008). Além disso, o pré-tratamento de raízes de açafrão com AS aumentou a atividade de peroxidases e do inibidor de proteinase contribuindo para a resistência das plantas de açafrão a *P. aphanidermatum* (Radhakrishnan & Balasubramanian, 2009).

As diferentes respostas de defesa das espécies de *Pythium* em plantas podem estar associadas tanto a diversidade de hospedeiros para as diferentes espécies, quanto às diferenças de virulência encontradas entre as espécies.

Os resultados obtidos neste trabalho juntamente com os dados da bibliografia demonstram que as respostas de defesa em plantas a *Pythium* spp. envolvendo hormônios não apresentam um padrão comum e são dependentes de interações específicas que devem ser estudadas a fim de caracterizar o mecanismo de defesa.

Devido a menor suscetibilidade das plantas tratadas com etefon a *P. dissotocum* o mecanismo de defesa envolvido nesta interação foi caracterizado pela quantificação da expressão de genes que possuem papel na defesa de plantas. O critério para seleção dos genes foi o de identificar genes cujos produtos se expressam durante o ataque de patógenos e sejam potencialmente envolvidos com a resistência aos mesmos, com ênfase nas interações envolvendo patógenos necrotróficos com características semelhantes à *Pythium* spp. e estejam envolvidos com a via hormonal em questão. Desta forma, os seguintes genes foram selecionados para comparação da quantificação do acúmulo de mRNA nas plantas inoculadas com *P. dissotocum* e plantas inoculadas com *P. dissotocum* e tratadas com

etefon: fator de resposta ao etileno 1 (*ERF1*), lipoxigenase D (*LOXD*) que é envolvida com a biossíntese de JA, proteína relacionada à patogênese 1 (*PR-1*), proteína semelhante à osmotina (*PR-5*), ambas PRs associadas a resposta de defesa mediada por AS, a defensina *DEF2* e *SIPROPEP*.

A verificação do padrão de expressão dos genes selecionados foi realizada pelo método de quantificação relativa usando PCR em tempo real. Para tanto, o cDNA das raízes de plantas da cv. Micro-Tom inoculadas com *P. dissotocum* e plantas inoculadas com *P. dissotocum* e tratadas com etefon foram analisadas com os oligonucleotídeos referentes aos genes selecionados.

Os resultados da análise por RT-qPCR mostram que o tratamento com etefon nas plantas inoculadas provocou um aumento da expressão relativa dos genes *PR-1*, *PR-5*, *DEF2* e de *SIPROPEP*, sendo que os aumentos mais expressivos são encontrados em *DEF2* e *SIPROPEP* (Figura 8). A expressão relativa de *DEF2* foi 2,7 e de *SIPROPEP* foi 2,4 vezes maior do que a encontrada nas plantas inoculadas com o patógeno sem o tratamento com etefon (amostra controle). Seguido pelo aumento da expressão relativa de *PR-1* e *PR-5* que foram aproximadamente 2 vezes maiores do que na amostra controle. Por outro lado, observou-se menor acúmulo de mRNA dos genes *ERF1* e *LOXD* (Figura 8), ambos envolvidos na sinalização via ET e JA.

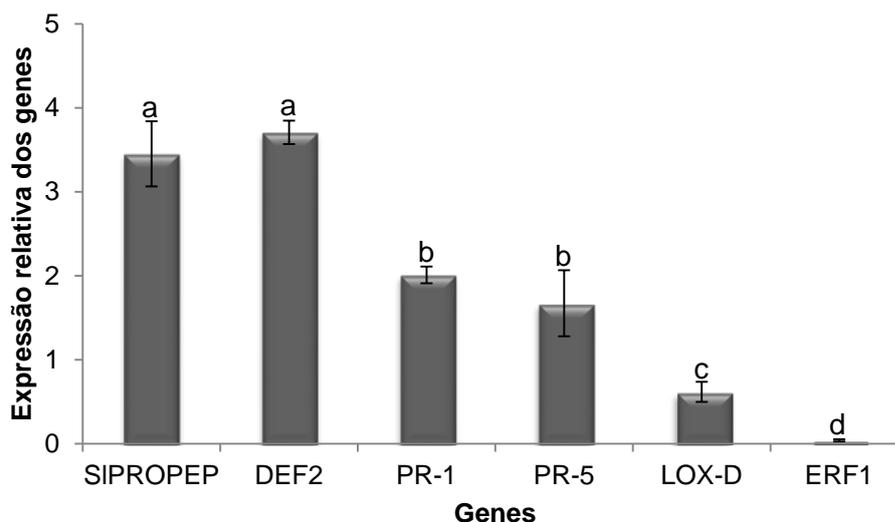


FIGURA 8. Expressão relativa de genes envolvidos na defesa de tomate cv. Micro-Tom inoculadas com *P. dissotocum* sob efeito do tratamento com etefon. Todos os valores de Cts foram normalizados pelos Cts do controle endógeno *UBI3* ( $\Delta Ct$ ). Os valores de expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação às plantas da cv. Micro-Tom inoculadas ( $2^{-\Delta Ct}$ ), cujo valor de expressão relativa é 1,0. Os valores de expressão relativa representam a média de quatro repetições biológica e triplicata técnica. As médias que receberam as mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Observou-se que a aplicação de etefon reprimiu *ERF1*, este gene é um fator de transcrição que pertence à família de proteínas que se ligam a elementos que respondem ao etileno (EREBP), e cujos membros atuam como reguladores de genes envolvidos nas vias de sinalização mediadas por ET e JA (Lorenzo *et al.*, 2003; Hongxing *et al.*, 2005). Em *A. thaliana*, os efeitos da aplicação de etileno e de etefon na indução de *ERF1* foram analisados por RT-qPCR e foi verificado que em um período de até 8 horas ambos tratamentos induziram *ERF1*. No entanto, após 12 horas as plantas tratadas com etefon apresentaram uma drástica diminuição de *ERF1*, enquanto as plantas tratadas com etileno continuavam a induzir *ERF1* (Zhang & Wen, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Devido ao fato do experimento conduzido no presente trabalho ter sido coletado 72 horas após a aplicação do tratamento, esta é uma possível explicação para a diminuição de *ERF1*.

Já a repressão de *LOXD* pode estar associada aos resultados biológicos obtidos no tratamento com MeJA, onde as plantas da cv. Micro-Tom foram mais suscetíveis à *P. dissotocum*, o que sugere que esta via de sinalização de defesa pode não ser efetiva na interação de tomate com *P. dissotocum*. Outra hipótese é que a aplicação de etefon pode ter inibido a indução do gene *LOXD*. Faurie *et al.* (2009) verificaram que células de *Vitis vinifera* tratadas com etefon não apresentaram alteração no perfil de expressão do gene *LOX* comparado com as células controle. Os autores verificaram ainda que etefon inibiu a expressão de *LOX* em células previamente tratadas com MeJA.

Apesar da indução da atividade de proteínas PR-1 e PR-5 por AS ser descrita na literatura (Thomma *et al.*, 1998), verificou-se um aumento no acúmulo de mRNAs codificantes de ambas proteínas em plântulas tratadas com etefon. Em tabaco, MeJA aumentou os níveis de AS e induziu a expressão de *PR-1* (Xu, Y. *et al.*, 1994). Além disso, a combinação de MeJA com ET induziram ambos, *PR-1* e *PR-5* (Brederode *et al.*, 1991). Hammond-Kosack e Jones (2000) observaram que a ação sinérgica do ET e AS também promoveu a indução da expressão de genes PR. Além da indução por hormônios os genes codificantes de PRs também são induzidos por patógenos (Huffaker *et al.*, 2006; Medeiros, 2008; Trivilin, 2008). O tratamento de plantas de tomate com AS ou ET inoculadas com diferentes espécies do gênero *Pythium* também apresentou um aumento no acúmulo de mRNA de *PR-1* e *PR-5* (Medeiros, 2008). Estes genes ainda estão associados à resposta de hipersensibilidade, que consiste na morte celular localizada, observada na resistência de plantas contra patógenos biotróficos (Glazebrook, 2005; Guinetti-Gonzalez *et al.*, 2007; Királi *et al.*, 2007). Assim, a maior abundância dos transcritos de *PR-1* e *PR-5* observada nas plantas inoculadas com o patógeno e submetidas aos tratamentos com ET pode estar associada não somente a sinalização hormonal, mas também à morte celular induzida pelo patógeno.

Ao contrário dos genes PRs, pouco é conhecido sobre a defensina *DEF2*. Esta defensina foi isolada de plantas de tomate e sua função está associada com o desenvolvimento floral e na resistência foliar contra *B. cinerea* (Stotz *et al.*, 2009). De modo geral, as defensinas exibem atividade antifúngica à vários patógenos (Osborn *et al.*, 1995). Neste contexto, o aumento da expressão relativa de *DEF2* nas plantas de tomate tratadas com etefon, as quais foram mais resistentes a *P. dissotocum*, indicam que assim como a defensina *PDF1.2* de *A. thaliana* estes genes são induzidos nas respostas de defesa das plantas à diferentes patógenos.

Um possível ortólogo ao gene *AtPROPEP1* de *A. thaliana* foi descrito no presente trabalho e verificou-se que houve um acúmulo de mRNA de *SIPROPEP* em função do tratamento com etefon em plantas de tomate inoculadas com *P. dissotocum*. Em *A. thaliana*, a expressão constitutiva de *AtPROPEP1* apresenta altos níveis de expressão da defensina *PDF1.2* e do gene *PRI* e aumenta a resistência das plantas ao patógeno necrotrófico *P. irregulare* e *P. deliense* (Huffaker *et al.*, 2006; Trivilin, 2008). Além disso, outro ortólogo de *AtPROPEP1* foi identificado em milho. *ZmPROPEP* é induzido pelo fungo *C. heterostrophus*. Além disso, o pré-tratamento de folhas de milho com o peptídeo *ZmPep* promoveu a produção dos hormônios JA e ET e induziu a expressão de genes de defesa como PR-4 (Huffaker *et al.*, 2011).

Uma vez que a aplicação de etefon reduziu os sintomas causados pela inoculação com *P. dissotocum* em plantas de tomate e induziu uma defensina e proteínas PR sugere-se que a via de sinalização mediada por ET atua na resistência de plantas de tomate a infecção por *P. dissotocum*. No entanto, devido às proteínas PRs atuarem também na via de AS, o envolvimento desta via de sinalização de defesa na interação de tomate com *P. dissotocum* não pode ser descartado. Além disso, a indução de *SIPROPEP* revela que este gene pode exercer um papel importante nas respostas de defesa nesta interação. Deste modo, outros

estudos devem ser conduzidos a fim de avaliar o efeito de genes específicos da via do ET e *SIPROPEP* na resistência de plântulas de tomate à *P. dissotocum*.

#### 4.5 Silenciamento do gene *PDS* em tomate

O gene *PDS* atua na biossíntese de carotenoides e protege a clorofila da foto-oxidação nos tecidos em desenvolvimento. A redução dos níveis de RNA do *PDS* leva ao foto branqueamento, um fenótipo facilmente distinguível para monitorar a eficiência de VIGS (Baulcombe, 1999; Liu *et al.*, 2002). O sistema baseado em VIGS utilizando o vetor TRV tem sido amplamente utilizado para estudar mecanismos de defesa de doenças foliares (Ekengren *et al.*, 2003), doenças vasculares (Chen *et al.*, 2009; Pantelides *et al.*, 2010) e doenças radiculares causadas por nematoides (Valentine *et al.*, 2004; Bhattarai *et al.*, 2007) em tomate. No entanto, devido à natureza dos patógenos de gênero *Pythium*, os quais possuem uma janela de infecção restrita aos estádios iniciais das plântulas e à medida que a planta se desenvolve a lignificação dos tecidos do hospedeiro dificulta sua penetração (Hendrix & Campbell, 1973), foi necessário uma otimização do método de silenciamento visando principalmente à redução no tempo de infiltração e ação do silenciamento para posterior desafio das plantas silenciadas com *P. dissotocum*.

Neste trabalho *PDS* foi primeiramente utilizado visando o estabelecimento da metodologia e das condições experimentais necessárias para o desenvolvimento do silenciamento de *SIPROPEP*, *CTR1* e *ERF1*, posteriormente o uso deste gene foi mantido em todos os ensaios como controle do funcionamento da técnica.

A clonagem de um fragmento do *PDS* foi realizada a partir do cDNA de plantas de tomate cv. Micro-Tom. O fragmento amplificado foi de 420 pb, o qual foi inserido no vetor viral TRV-GFP, originando a construção de silenciamento TRV-PDS. As colônias de *Agrobacterium* transformadas com o vetor TRV-GFP que receberam o inserto de *PDS*

foram identificadas por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores TRV-F e R, os quais amplificam uma sequência com aproximadamente 1000 pb nos plasmídeos TRV-GFP e 670 pb nos plasmídeos TRV-PDS (Figura 9). A autenticidade dos clones foi confirmada pelo sequenciamento.

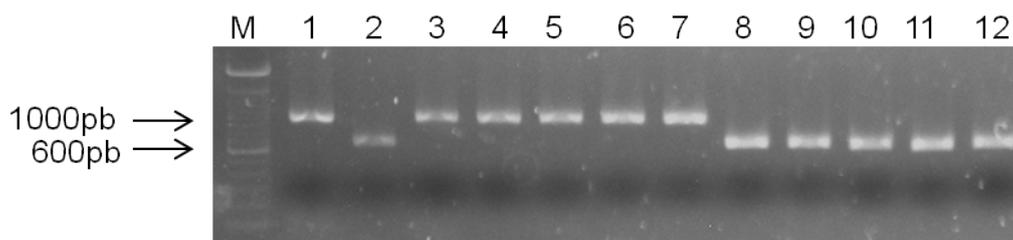


FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos plasmídeos e das colônias de *A. tumefaciens* transformadas TRV-GFP e TRV-PDS. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos plasmídeos TRV-GFP (1) e TRV-PDS (2), bem como das colônias de *A. tumefaciens* transformadas com os plasmídeos TRV-GFP (3-7) e TRV-PDS (8-12).

Diferentes métodos de agroinfiltração como imersão das raízes em solução com *Agrobacterium*, infiltração à vácuo e infiltração com seringa nos cotilédones são citados na literatura para uso em plântulas (Ryu *et al.*, 2004; Hartl *et al.*, 2008; Velásquez *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2009). O método de infiltração nos cotilédones de plantas de tomate foi escolhido para aplicação neste trabalho devido aos recentes trabalhos (Velásquez *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2009) que justificam a viabilidade deste método pela facilidade de execução, baixo custo, menor tempo de montagem do experimento, menos danos às plantas e maior eficiência no silenciamento sistêmico de genes.

Sendo assim, os cotilédones de plantas entre cinco e sete dias após a emergência foram infiltrados com a mistura dos vetores TRV1 + TRV-GFP (controle) ou TRV1 + TRV-PDS. Em todos os experimentos desenvolvidos neste trabalho, todas as plantas agroinfiltradas com o inóculo de silenciamento para o *PDS* apresentaram o fenótipo

correspondente de foto branqueamento, indicando que o método foi eficiente. Outros trabalhos relatam a eficiência do silenciamento do *PDS* em plantas da cv. Micro-Tom agroinfiltradas no estágio de plântula (Jiang *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2009), confirmando que o método de agroinfiltração em folhas cotiledonares é eficiente para o silenciamento do *PDS* em tomate e este pode ser aplicado ao silenciamento de outros genes. Cabe ressaltar que o silenciamento do *PDS* foi validado para as cultivares de tomate Gaúcho e Micro-Tom.

A redução no tempo de infiltração foi também verificada através da verificação do efeito do silenciamento na redução do mRNA de *PDS* acumulado. Embora o fenótipo de foto branqueamento tenha sido verificado entre 8 a 14 dias após a agroinfiltração (dpi) (Figura 10), plantas com cinco dias após a agroinfiltração já apresentavam redução nos níveis de RNA, sendo que sete dias após a infiltração foram verificados os níveis mais elevados de silenciamento (Figura 11). Estudos com TRV em solanáceas na maior parte conduzem a agroinfiltração em plântulas entre 14 dias e 20 dias, e realizam o desafio das plantas silenciadas com o patógeno 20 dias após a agroinfiltração (Ekengren *et al.*, 2003; Brigneti *et al.*, 2004; Bhattarai *et al.*, 2007; Senthil-Kumar *et al.*, 2007a). No entanto, após 20 dias as plantas já ultrapassam o período de maior predisposição ao desafio com *Pythium* sp. Com os resultados obtidos neste experimento foi possível antecipar a indução do silenciamento e também reduzir o período de adição do inóculo do desafiante e, desse modo, viabilizaram-se os ensaios com o patógeno.

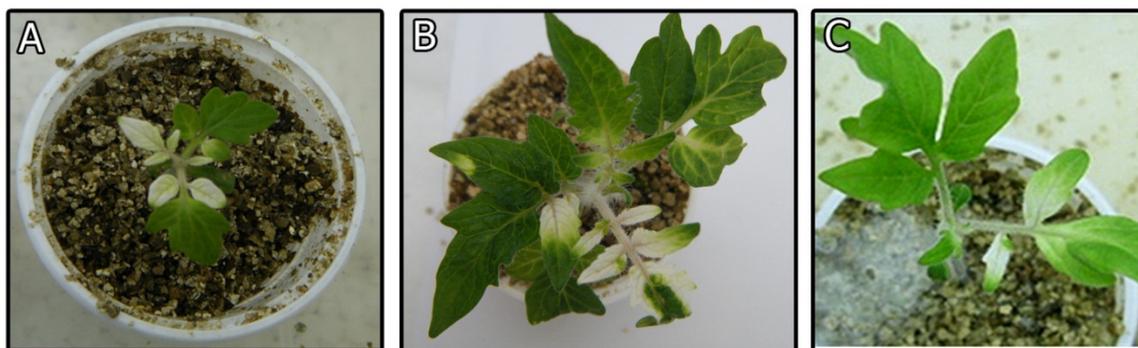


FIGURA 10. Fenótipo de foto branqueamento em cvs. de tomate agroinfiltradas com TRV-PDS. Na cv. Micro-Tom 10 dpi. (A), na cv. Micro-Tom 14 dpi. (B) e na cv. Gaúcho 8 dpi. (C).

O acúmulo de mRNA do *PDS* quantificado na raiz (Figura 11) e na parte aérea de Micro-Tom (Figura 12) foi comparado entre as plantas agroinfiltradas TRV-GFP (controle) e as plantas agroinfiltradas TRV-PDS. O vetor TRV2b utilizado neste trabalho desencadeia respostas ao VIGS tanto na parte aérea quanto nas raízes das plantas. Este efeito nas raízes é atribuído à presença da proteína 2b no vetor (Valentine *et al.*, 2004). Devido a esta característica do vetor foi possível quantificar o silenciamento do *PDS* nas raízes de plantas de tomate. Ho *et al.* (2009) também verificaram que o silenciamento de *PDS* em raízes e folhas foi obtido com sucesso quando empregou-se o sistema TRV-VIGS através da agroinfiltração nos cotilédones. Os autores também verificaram que este método foi eficiente para o gene TGA2.2, o qual apresentou redução do nível do transcrito no caule, na raiz e nas folhas em cinco, sete e dez dias após a infiltração, respectivamente, indicando que a redução no tempo de avaliação das plantas silenciadas pode ser extrapolado para estudos de outros genes.

Nas plantas TRV-PDS, houve redução do acúmulo de mRNA do *PDS* em mais de 80% nas raízes e 60% nas folhas (Figuras 11 e 12, respectivamente) em comparação com as plantas controle onde este gene não foi silenciado. O nível de redução do acúmulo de

mRNA de um gene alvo do VIGS pode ser variável entre as plantas silenciadas (Bhattara *et al.*, 2007). Por esta razão, as quantificações foram realizadas em plantas individualizadas.

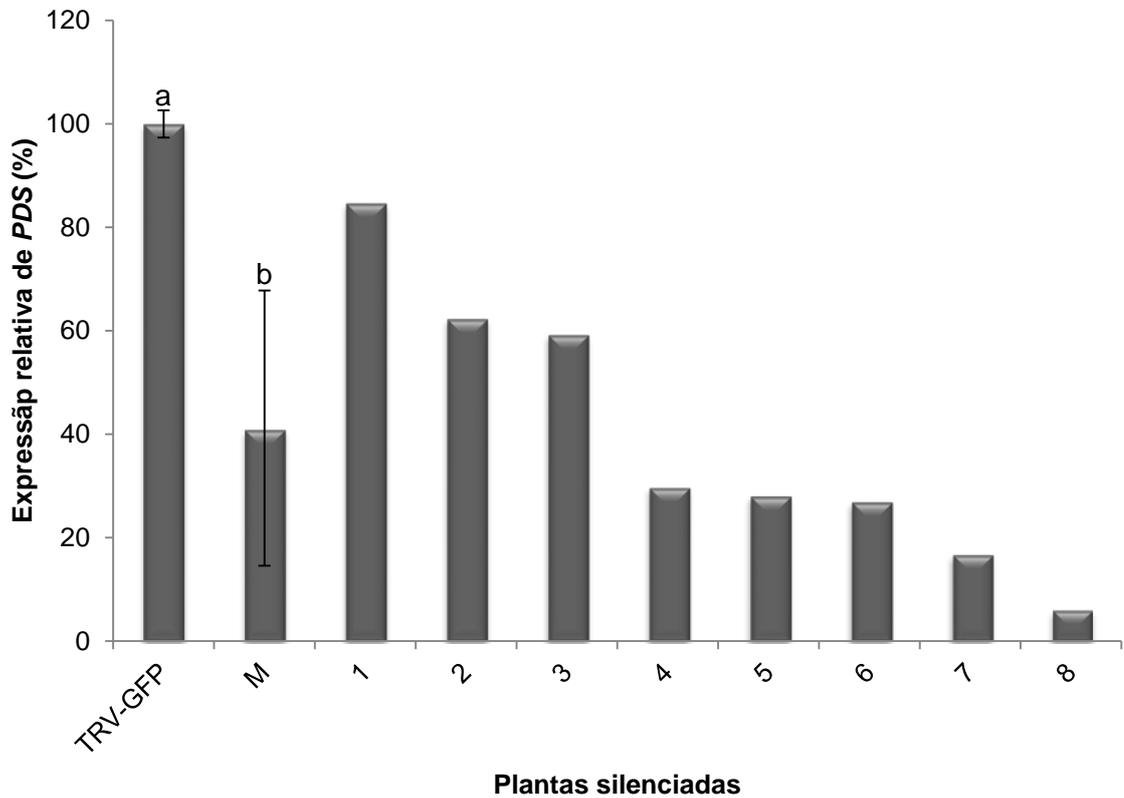


FIGURA 11. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do *PDS* nas raízes de tomate 7 dias após a agroinfiltração. M- representa a média das oito plantas agroinfiltradas com TRV-PDS. Os valores de 1-8 correspondem às plantas agroinfiltradas com TRV-PDS e representam a redução de mRNA do *PDS* em relação ao verificado nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP. Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. O valor utilizado para comparação com as plantas controle corresponde à média de cinco plantas TRV-GFP. A média das oito plantas TRV-PDS diferem do calibrador pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

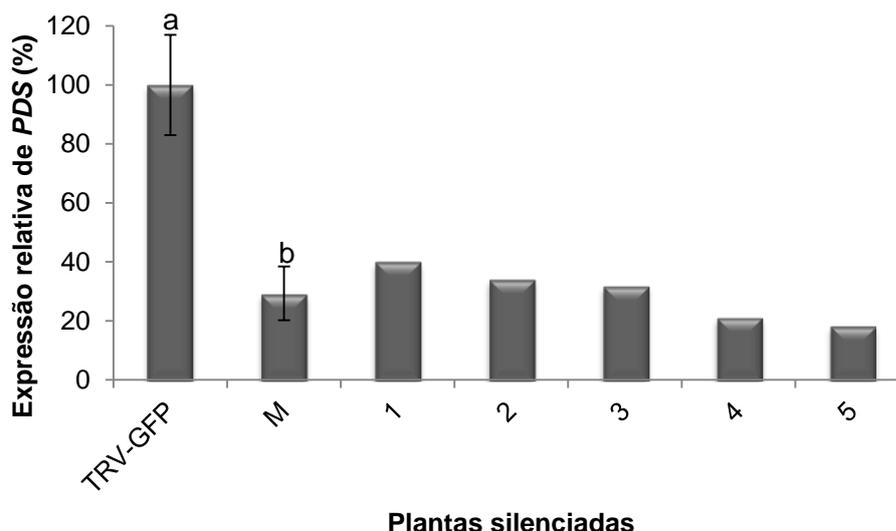


FIGURA 12. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do *PDS* nas folhas jovens de tomate da cv. Micro-Tom aos 14 dias após a agroinfiltração. M representa a média das oito plantas agroinfiltradas com TRV-PDS. Os valores de 1-5 correspondem às plantas agroinfiltradas com TRV-PDS e representam a redução de mRNA do *PDS* em relação ao verificado nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP. Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. O valor utilizado para comparação com as plantas controle corresponde à média de cinco plantas TRV-GFP. A média das plantas TRV-PDS diferem do calibrador pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A cv. Micro-Tom contendo o gene *PDS* silenciado foi cultivada até o final de seu ciclo (70-90 dias). O fenótipo de foto branqueamento permaneceu até o estágio reprodutivo, sendo visível em toda a parte aérea, incluindo flores e frutos (Figura 13). O silenciamento do *PDS* resulta na obtenção de frutos com teor de licopeno reduzido, tendo em vista o bloqueio da biossíntese de carotenoides (Orzaez *et al.*, 2009). A maior parte dos estudos sobre VIGS relata uma duração de seus efeitos por até 3 semanas, enquanto que outros trabalhos demonstram que esta duração pode ser prolongada por mais de 3 meses. Contudo, trabalhos recentes comprovam que o VIGS pode ser transmitido para a progênie das plantas. Isto foi verificado inclusive para o VIGS mediado por TRV em tomate (Senthil-Kumar & Mysore, 2011a; Senthil-Kumar & Mysore, 2011b). A durabilidade do VIGS até o estágio reprodutivo, demonstrada neste e em outros trabalhos, é de extrema

importância quando se deseja estudar os efeitos do silenciamento durante todo o desenvolvimento da planta.

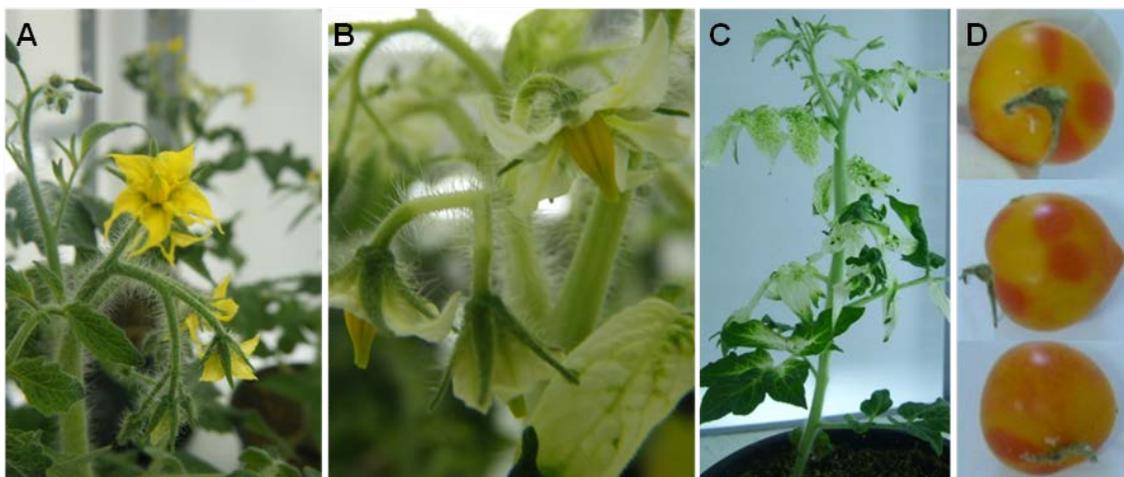


FIGURA 13. Fenótipo de foto branqueamento até o estágio reprodutivo de tomate da cv. Micro-Tom. Planta adulta não silenciada para o *PDS* (A). Plantas adultas silenciadas para o *PDS* (B e C). Efeito do silenciamento do *PDS* nos frutos (D).

O método de agroinfiltração nos cotilédones permitiu a utilização de plântulas com cinco a sete dias de desenvolvimento, sendo que o efeito do silenciamento em raízes de tomate foi observado cinco, sete e dez dias após a agroinfiltração. Desse modo foi possível desafiar as plantas silenciadas com *P. dissotocum* sete dias após a agroinfiltração, quando o efeito do silenciamento foi alcançado e as plantas estavam com 10 ou 12 dias após a germinação. Desta forma, foi possível diminuir o tempo para a inoculação com o patógeno nas plantas agroinfiltradas em pelo menos 10 dias garantindo que o patógeno consiga infectar as plantas e a metodologia possa ser empregada com sucesso para estudar os genes envolvidos na interação tomate x *P. dissotocum*.

## **4.6 Caracterizações da resposta de defesa mediada por ET através do silenciamento de *CTR1* e *ERF1* na cv. Micro-Tom.**

### **4.6.1 Silenciamento gênico induzido por vírus de *CTR1* e *ERF1* na cv. Micro-Tom**

Diversos trabalhos tem demonstrado a importância do ET em mediar às respostas de defesa da planta contra a infecção com diferentes patógenos necrotróficos (Knoester *et al.*, 1998; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; van Loon *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). No entanto, é conhecido que a via de sinalização de resposta de defesa mediada por ET pode desempenhar um papel positivo ou negativo na defesa das plantas dependendo da interação entre planta e patógeno (Lin *et al.*, 2008; van Loon *et al.*, 2006). Para determinar se o ET está envolvido na defesa de plantas de tomate contra *P. dissotocum*, com base nas pesquisas realizadas com *A. thaliana*, foi realizado o silenciamento dos genes que participam da via de sinalização mediada por etileno e que apresentam respostas diferenciais a presença do etileno. Desta forma os seguintes genes foram selecionados para caracterizar sua função na interação da cv. Micro-tom com *P. dissotocum*. *CTR1* é um regulador negativo da via de sinalização por ET, e *ERF1*, um fator de transcrição que atua em resposta ao etileno como regulador de genes envolvidos nas vias de sinalização de defesa mediadas por etileno e ácido jasmônico (Lorenzo *et al.*, 2003; Hongxing *et al.*, 2005). Para tanto, os fragmentos de *CTR1* e *ERF1* amplificados a partir de cDNA de tomate, foram clonados no vetor TRV-GFP, dando origem aos vetores TRV-CTR1 e TRV-ERF1 (Figura 14). As construções TRV-GFP, TRV-PDS, TRV-CTR1 e TRV-ERF1 foram infiltradas em tomate em três experimentos independentes. Sendo as construções TRV-GFP e TRV-PDS introduzidas como tratamentos controle.

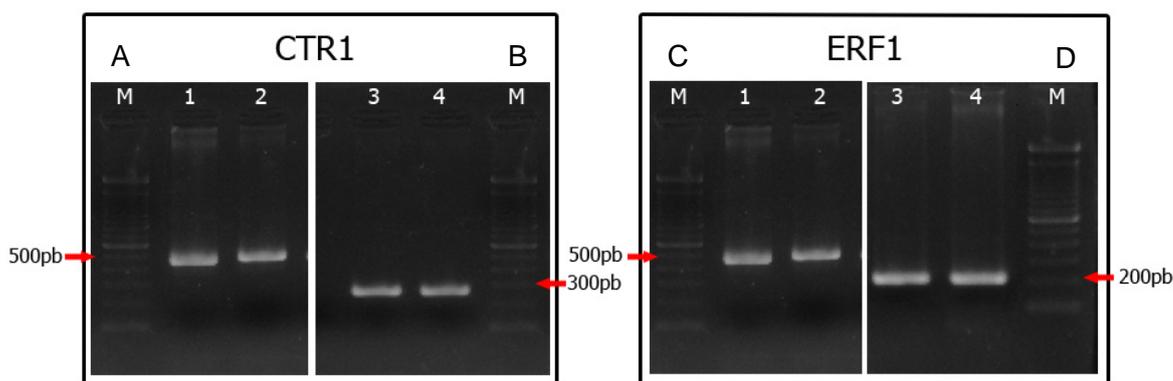


FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de colônias de *A. tumefaciens* transformadas com os plasmídeos TRV-CTR1 e TRV-ERF1. PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R, resultando na amplificação de 254 pb adicionais ao tamanho do inserto (A). PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores CTR1 F/R, resultando na verificação de 236 pb referentes ao inserto (B). PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R, resultando na amplificação de 254 pb adicionais ao tamanho do inserto (C). PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores ERF1 F/R, resultando na verificação de 210 pb referentes ao inserto (D).

Para validar o silenciamento de *CTR1* e *ERF1* o cDNA das raízes das plantas agroinfiltradas foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores em regiões externas aos fragmentos clonados, permitindo apenas a quantificação do gene endógeno. As plantas utilizadas nesta análise foram coletadas aos 10 dias após a agroinfiltração. Como revelado nas Figuras 15 e 16, a acumulação dos transcritos dos genes alvo do silenciamento foi reduzida em vários níveis. Nas plantas agroinfiltradas com TRV-CTR1 houve uma redução de até 70% do mRNA correspondente ao gene *CTR1*. Pôde-se observar que ocorreu uma variação na redução de nível de silenciamento entre 30 e 70% (Figura 15), fato este que foi observado nas outras repetições deste experimento.

Nas plantas agroinfiltradas com TRV-ERF1, a variação na redução de nível de silenciamento foi ainda maior entre 15 e 90% (Figura 16), indicando que as avaliações

devem ser realizadas sempre planta a planta. Embora o uso de VIGS apresente vantagens, uma das limitações desta técnica é que frequentemente não leva a uma uniformidade e nem a completa repressão da expressão dos genes alvo (Burch-Smith *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009). Assim, a validação dos resultados obtidos através desta técnica pode ser obtida com a avaliação do efeito de diferentes genes envolvidos na mesma via de sinalização.

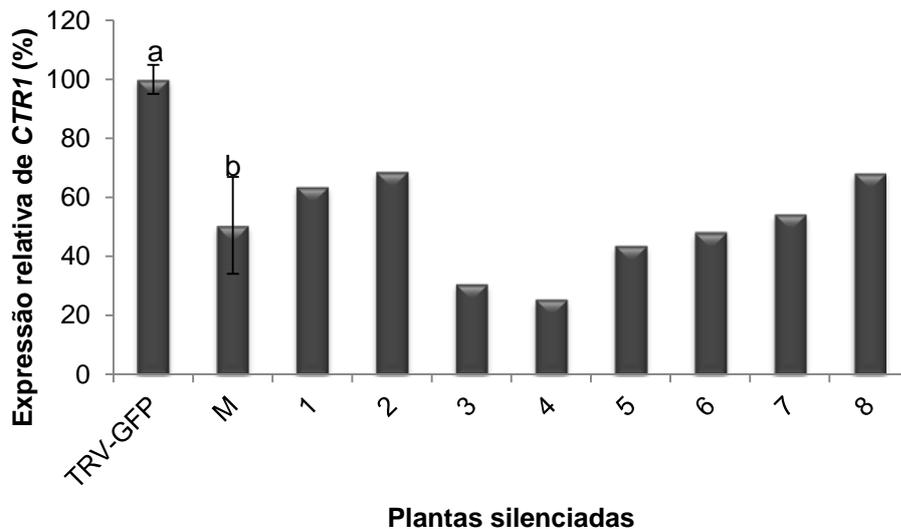


FIGURA 15. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do *CTR1* nas raízes de tomate cv. Micro-Tom 10 dias após a agroinfiltração. M- representa a média das oito plantas agroinfiltradas com TRV-CTR1. Os valores de 1-8 correspondem às plantas agroinfiltradas com TRV-CTR1 e representam a redução de mRNA do *CTR1* em relação ao verificado nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP. Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. O valor utilizado para comparação com as plantas controle corresponde à média de cinco plantas TRV-GFP. A média das plantas TRV-CTR1 diferem do calibrador pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

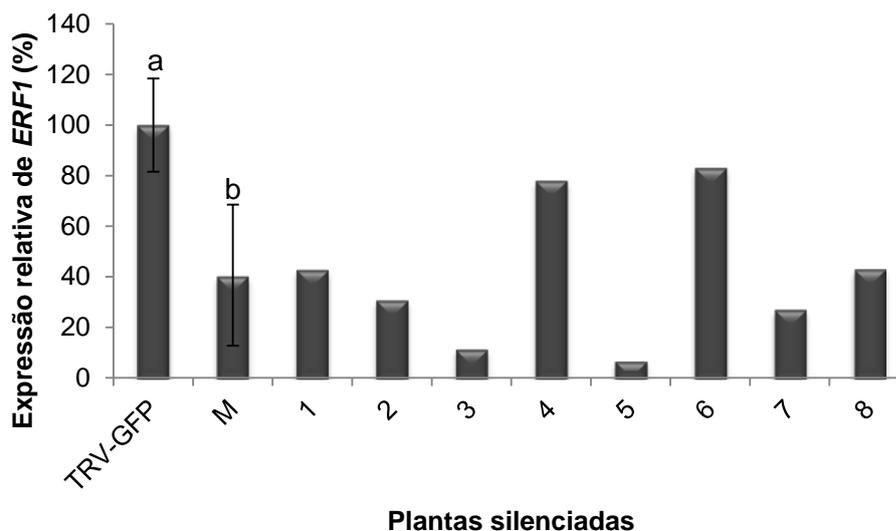


FIGURA 16. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do *ERF1* nas raízes da cv. Micro-Tom 10 dias após a infiltração. M- representa a média das oito plantas agroinfiltradas com TRV-*ERF1*. Os valores de 1-8 correspondem às plantas agroinfiltradas com TRV-*ERF1* e representam a redução de mRNA do *ERF1* em relação ao verificado nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP. Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. O valor utilizado para comparação com as plantas controle corresponde à média de cinco plantas TRV-GFP. A média das plantas TRV-*ERF1* diferem do calibrador pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

As plantas da cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-CTR1 apresentaram um fenótipo de epinastia, redução de tamanho e escurecimento das plântulas, típico de mutantes *ctr1* (Kieber *et al.*, 1993; LeClercq *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Este efeito foi verificado nas plantas 10 dias após a agroinfiltração (Figura 17).

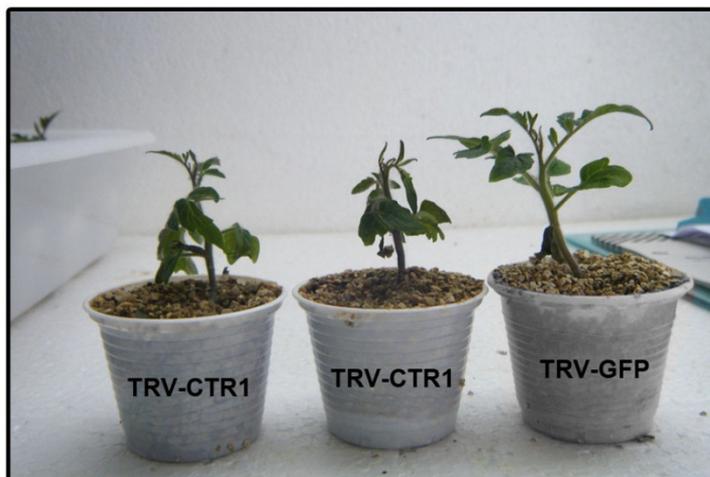


FIGURA 17. Fenótipo de plantas de tomate cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-CTR1. Plantas agroinfiltradas com TRV-CTR1 e plantas agroinfiltradas com TRV-GFP controle 10 dpi.

A fim de observar o efeito da agroinfiltração com TRV-ERF1 em plantas de tomate cv. Micro-Tom no crescimento e desenvolvimento das plantas quatro plantas de cada experimento foram mantidas até o fim do ciclo da planta. Não foi observado nenhum efeito no desenvolvimento das plantas agroinfiltradas (Figura 18).

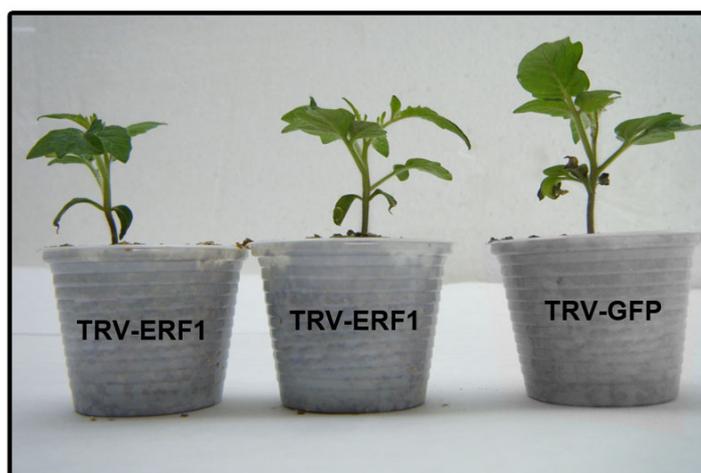


FIGURA 18. Fenótipo de plantas de tomate cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-ERF1. Plantas agroinfiltradas com TRV-ERF1 e plantas agroinfiltradas com TRV-GFP controle 10 dpi.

Além de *CTR1* e *ERF1*, os seguintes genes foram amplificados a partir de cDNA de tomate: *ETR1*, *ERF3*, *TSRF1*, *EIN2*, *NIM1*, *MPK1* e posteriormente clonados no vetor TRV-GFP, dando origem aos vetores TRV- *ETR1*, TRV- *ERF3*, TRV- *TSRF1*, TRV- *EIN2*, TRV- *NIM1*, TRV- *MPK1* (apêndice 2). Assim como no silenciamento de *CTR1* e *ERF1*, os vetores construídos com os diferentes genes foram infiltrados em tomate. Sendo as construções TRV-GFP e TRV-PDS introduzidas como tratamentos controle.

No entanto, um aumento de temperatura na câmara de crescimento onde as plantas eram mantidas acima de 35°C prejudicou o silenciamento destes genes nas plantas fato este verificado nas plantas controle agroinfiltradas com TRV-PDS que não apresentaram o fenótipo de foto branqueamento. A expressão transiente do gene mediada por *Agrobacterium* e a multiplicação do vírus são influenciadas pela temperatura (Fu *et al.*, 2006, Ryu *et al.*, 2004; Tuttle *et al.*, 2008). Plantas de *Nicotina benthamiana* silenciadas para o gene *PDS* com o vetor TRV a uma temperatura de 28-30°C apresentaram uma drástica redução na frequência e nos níveis de silenciamento (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). Os trabalhos de silenciamento utilizando o vetor TRV geralmente são executados em temperaturas em torno de 25°C (Liu, *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009; Pantelides *et al.*, 2010; Wu, *et al.*, 2011). Possivelmente o aumento de temperatura na câmara de crescimento afetou a sobrevivência e multiplicação do vírus na planta. Por este motivo as avaliações referentes ao silenciamento destes genes não foram executadas.

#### **4.6.2 Desenvolvimento da doença em plantas TRV-CTR1 e TRV-ERF1 inoculadas com *P. dissotocum***

A via de sinalização por ET tem sido bem estudada. Genes ACO regulam a biossíntese de ET, os quais então inativam *CTR1*, o qual é um regulador negativo da via de

sinalização por ET. (Gao *et al.*, 2003). Assim, inativação de CTR1 resulta na liberação de EIN2 e posterior ativação de ERF1, o qual vai desencadear a expressão de genes envolvidos nas respostas de defesa (Ouaked *et al.*, 2003). Para determinar se genes envolvidos na sinalização mediada por ET estão envolvidos na resistência de tomate à infecção por *P. dissotocum*, as plantas agroinfiltradas com TRV-CTR1 e TRV-ERF1 foram inoculadas com *P. dissotocum* sete dias após a agroinfiltração. Depois deste tempo, o silenciamento já havia iniciado nas raízes e na base do caule, conforme verificado pela quantificação da expressão de *PDS* (Figura 11). Três dias após a inoculação as plantas foram avaliadas quanto à presença de sintomas e sinais do patógeno.

A severidade da doença foi estimada através da escala de severidade de notas utilizada nos experimentos prévios (Figura 19A). Todas as plantas inoculadas apresentaram manchas necróticas no colo, em alguns casos chegando à constrição. Porém, não foram verificados sintomas de amarelecimento foliar e de tombamento das plantas. As plantas TRV-CTR1 desenvolveram sintomas menos severos da doença, como os encontrados nos níveis 1 e 2 da escala de sintomas (Figura 19). Enquanto as plantas TRV-ERF1 apresentaram sintomas mais severos, foi observado uma grande quantidade de manchas necróticas que em alguns casos chegaram a coalescer e provocar a constrição no colo das plântulas. Observou-se que aproximadamente 30% das plantas TRV-ERF1 apresentaram constrição no colo comparado com apenas 4% das plantas controle (TRV-GFP) (Figura 19B). Esta observação indica que as plantas TRV-ERF1 são mais suscetíveis que as plantas controles.

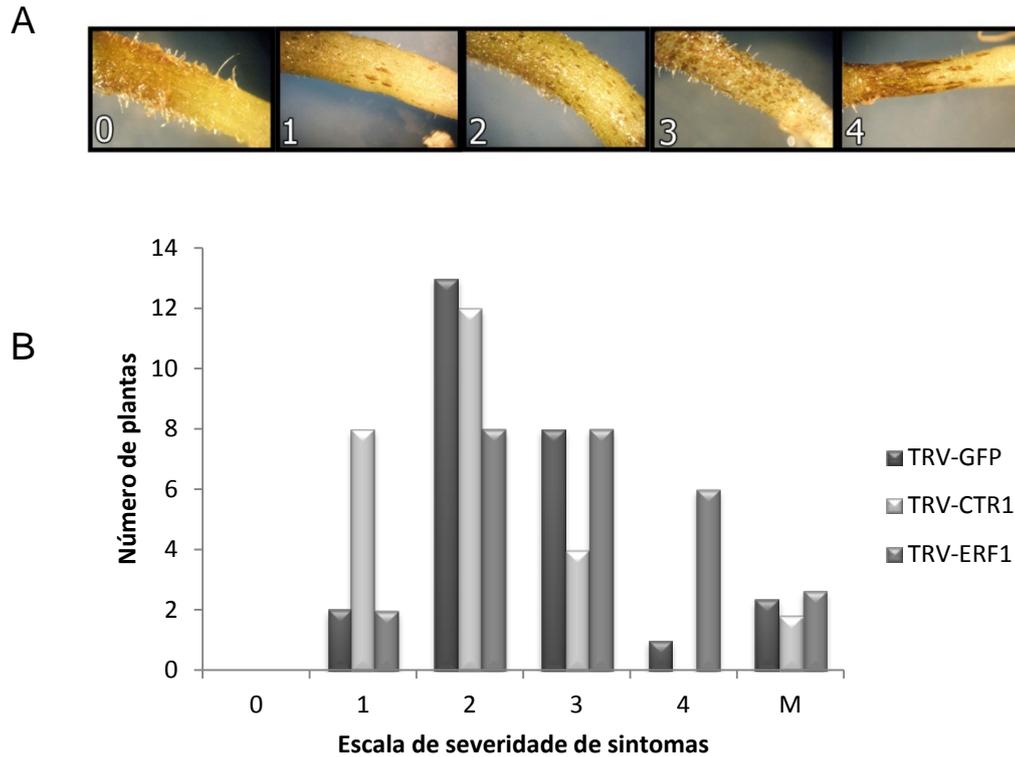


FIGURA 19. Comparação de sintomas observados nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP, TRV-CTR1 e TRV-ERF1. Escala de severidade dos sintomas observados em *S. lycopersicum* (A). Comparação da severidade dos sintomas observados em 24 plantas agroinfiltradas com TRV-GFP, 24 plantas agroinfiltradas com TRV-CTR1 e 24 plantas agroinfiltradas com TRV-ERF1 segundo as notas obtidas pela escala severidade dos sintomas 0-4. M - representa a média das notas (B).

As plantas agroinfiltradas e inoculadas desenvolveram-se menos que as plantas não inoculadas (Figura 20A e C). No caso da agroinfiltração com TRV-CTR1, as plantas apresentaram um fenótipo marcante de epinastia e menor crescimento das plantas mesmo sem a inoculação (Figura 20B), como isso, o efeito do patógeno foi menos visível. Embora não tenha sido verificada a morte de plantas devido à infecção pelo patógeno foi possível verificar um retardamento no crescimento das plantas, o que pode acarretar ao longo do ciclo da planta em perdas na produção de frutos.

Buscando caracterizar a relação dos sintomas desencadeados na planta com a presença de estruturas do patógeno, como oósporos nas regiões infectadas, plantas agroinfiltradas foram analisadas por microscopia. Assim, observou-se que as plantas TRV-ERF1 apresentaram uma grande quantidade de manchas necróticas que coalescem e chegam a provocar a constrição no colo comparadas com as plantas TRV-GFP e TRV-CTR1 (Figura 20D, E e F). Nas plantas TRV-ERF1 também foi observado a maior quantidade de estruturas do patógeno (20I). Enquanto que nas plantas TRV-CTR1 a quantidade e o tamanho das manchas necróticas foram menores. Além disso, foi observada a presença de poucos oósporos nestas plantas (20E e H). A quantidade de oósporos observados no tecido das plantas agroinfiltradas TRV-CTR1 e TRV-ERF1 confirma que existe uma relação direta entre a quantidade de estruturas do patógeno e o sintoma desencadeado pela planta (Figura 20).

Os genes *CTR1* e *ERF1* estão envolvidos na sinalização por ET, no entanto eles respondem de forma contrária ao ET. Enquanto *ERF1* é um gene responsivo ao ET, *CTR1* é um regulador negativo da via de sinalização.

Em *A. thaliana*, mutantes *etr1* e *ein2* os quais atuam na percepção e na sinalização de ET, respectivamente, foram mais suscetíveis à infecção por diferentes espécies de *Pythium* (van Loon *et al.*, 2006). Plantas insensíveis ao etileno também apresentam aumento de suscetibilidade em diferentes espécies de plantas a vários patógenos incluindo *Septoria glycines*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp, *B. cinerea*, and *P. cucumerina* (Knoester *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 1999; Thomma *et al.*, 1999).

Elementos da via de sinalização mediada por ET têm sido descritos pelo seu papel na defesa de plantas contra diversos patógenos tanto em *A. thaliana* como em tomate (Leclercq *et al.*, 2002; Adams-Phillips *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009) indicando que esta via

de sinalização tem se preservado entre estas espécies e apontam para um possível envolvimento desta via em outras espécies de planta.

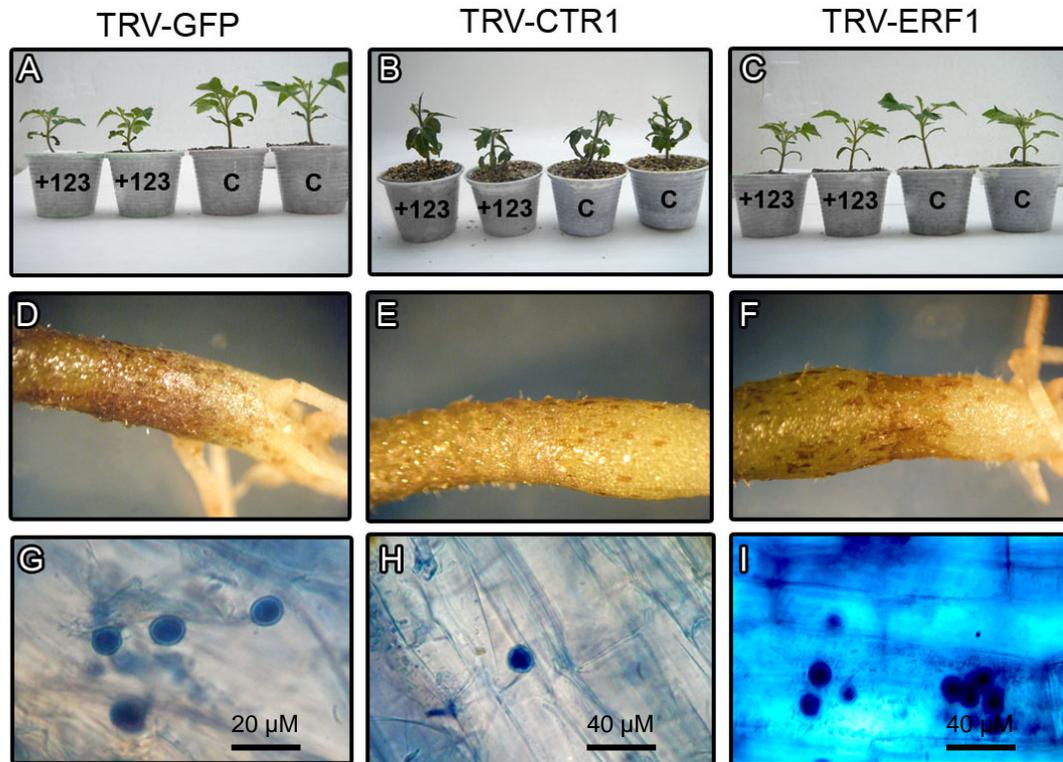


FIGURA 20. Avaliação dos sintomas e sinais na cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-GFP, TRV-CTR1 e TRV-ERF1. Plantas TRV-GFP na presença (+123) e ausência (C) de *P. dissotocum* (A). Plantas TRV-CTR1 na presença (+123) e ausência (C) de *P. dissotocum* (B). Plantas TRV-ERF1 na presença (+123) e ausência (C) de *P. dissotocum* (C). Sintomas observados no colo de plantas TRV-GFP (D), TRV-CTR1(E) e TRV-ERF1 (F). Sinais de *P. dissotocum* observados na região infectada das plantas TRV-GFP (G), TRV-CTR1 (H) e TRV-ERF1(I).

#### 4.6.3 Quantificação do patógeno por qPCR

Para verificar se o silenciamento de *CTR1* ou *ERF1* tinha relação no crescimento do patógeno e na colonização do tecido, o DNA extraído das plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-CTR1 e TRV-ERF1 inoculadas com *P. dissotocum* foi submetido à análise por qPCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores DC-6 (Cooke *et al.*, 2000) e ITS-4 (White *et al.*, 1990).

A análise indicou que *P. dissotocum* está presente nas plantas TRV-GFP, TRV-ERF1. Porém as plantas TRV-ERF1 apresentaram 12 vezes mais DNA do patógeno em suas raízes (Figura 21), indicando que o silenciamento deste gene em tomate permitiu uma maior colonização do patógeno comparado com as plantas TRV-GFP. Estes resultados revelam que existe uma relação entre a severidade dos sintomas encontrados nas plantas TRV-ERF1 e a quantidade de patógeno observada nas raízes (Figura 19 e 20) e detectada por qPCR (Figura 21).

Não foi possível quantificar o DNA do patógeno nas plantas silenciadas para o gene *CTR1* pelo método de quantificação por Real time PCR, pois este apresentou quantidades inferiores do DNA de *P. dissotocum* do que as encontradas nas plantas controle TRV-GFP. Assim a sensibilidade do método aplicado não foi suficiente para a detecção do patógeno.

Os resultados obtidos com o silenciamento de *CTR1* demonstraram uma maior resistência das plantas à *P. dissotocum*. Enquanto que o silenciamento de *ERF1* apresentou maior suscetibilidade das plantas ao patógeno. Desta forma, juntamente com os resultados obtidos com o tratamento com etefon, no qual as plantas apresentaram maior resistência ao ataque de *P. dissotocum* indicam que a via de sinalização mediada por ET está envolvida na sinalização de respostas de defesa à *P. dissotocum* em tomate.

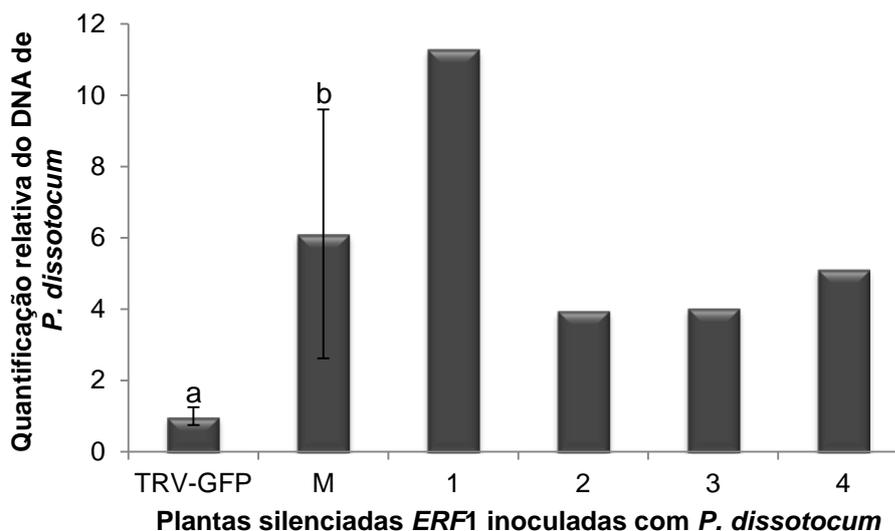


FIGURA 21. Quantificação do DNA de *P. dissotocum* em plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-ERF1, três dpi. Os níveis de DNA do patógeno foram estimados por RT-qPCR isolado de raízes de plantas silenciadas. M = Média de quatro plantas agroinfiltradas com TRV-ERF1 representam o acúmulo de DNA do patógeno em relação ao acúmulo verificado nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP. Todos os valores de Cts foram normalizados pelos Cts do controle endógeno *UBI3* ( $\Delta C_t$ ). Os valores da quantificação relativa representam o número de vezes que o DNA do patógeno aumenta ou diminui em relação às plantas agroinfiltradas com TRV-GFP ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), cujo valor de expressão relativa é 1,0. A média das plantas TRV-ERF1 diferem do calibrador TRV-GFP pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 Caracterização do papel de *SIPROPEP* na defesa de tomate à infecção por *Pythium*.

##### 4.7.1 Silenciamento gênico induzido por vírus de *SIPROPEP* em tomate cv.

###### Micro-Tom

O ortólogo de *AtPROPEP* em tomate foi identificado *in silico* a partir de uma biblioteca de cDNA de plantas expostas aos hormônios AS e JA, bem como à patógenos necrotróficos, inclusive a *P. oligandrum*, depositada no GenBank (Benson *et al.*, 2011 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Através da análise da sequência foram encontradas evidências estruturais na sequência peptídica que apontam para que o peptídeo de tomate atue nas respostas de defesa da planta da mesma forma que o peptídeo de *A.*

*thaliana*. Desta forma, para testar se *SIPROPEP* está envolvido na defesa de tomate contra a infecção por *P. dissotocum*, sua expressão na cv. Micro-Tom foi silenciada usando VIGS. Para tanto, um fragmento de 55 pb, resultante da amplificação do cDNA de tomate na região C-terminal correspondente ao peptídeo SI<sub>Pep</sub>, foi clonado no vetor TRV-GFP, dando origem ao TRV-SIPROPEP (Figura 22). Assim como no silenciamento de *CTR1* e *ERF1*, a construção TRV-SIPROPEP foi infiltrada em tomate em três experimentos independentes. Sendo as construções TRV-GFP e TRV-PDS introduzidas como tratamentos controle.

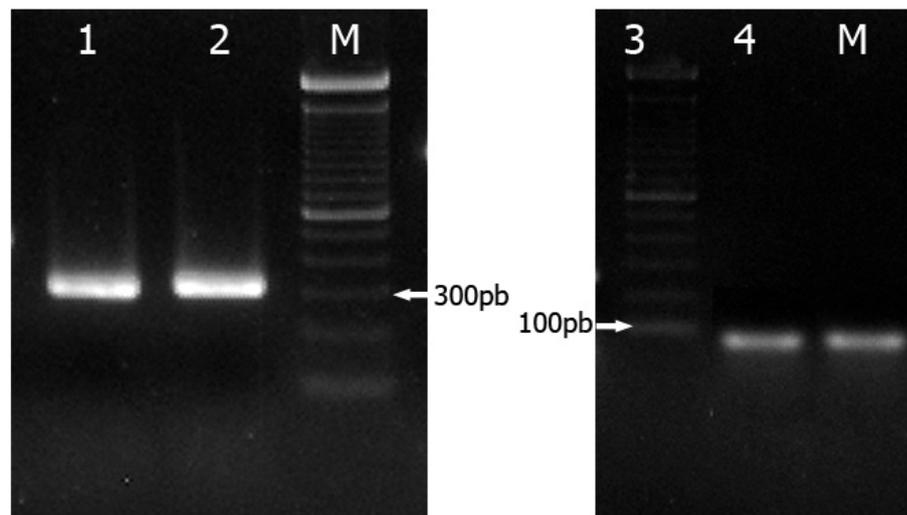


FIGURA 22. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de colônias de *A. tumefaciens* transformadas com os plasmídeos TRV-SIPROPEP. PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R, resultando na amplificação de 254 pb adicionais ao tamanho do inserto (A). PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores SI<sub>Pep</sub> F/R, resultando na verificação de 55 pb referentes ao inserto (B).

Dez dias após a agroinfiltração as raízes das plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP foram coletadas e o silenciamento de *SIPROPEP* foi quantificado por

RT-qPCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores em regiões externas ao fragmento de *SIPROPEP* clonado o que permitiu apenas a quantificação do acúmulo de mRNA do gene endógeno.

Todas as plantas silenciadas apresentaram reduções significativas no acúmulo de mRNA do *SIPROPEP* nas raízes (Figura 23), confirmando o silenciamento do gene nas raízes de tomate.

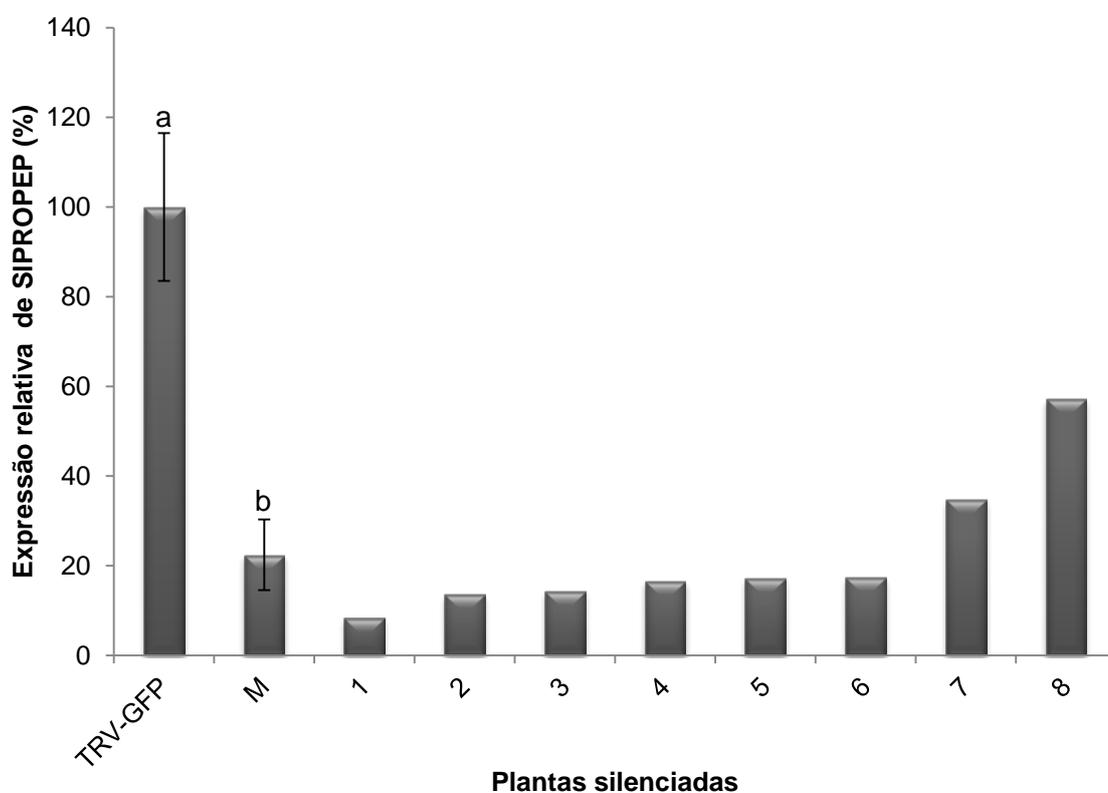


FIGURA 23. Quantificação por RT-qPCR do acúmulo de mRNA do *SIPROPEP* nas raízes da cv Micro-Tom aos 10 dias após a agroinfiltração. M- representa a média das oito plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP. Os valores de 1-8 correspondem às plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP e representam a redução de mRNA do *SIPROPEP* em relação ao verificado nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP. Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. O valor utilizado para comparação com as plantas controle corresponde à média de cinco plantas TRV-GFP. A média das plantas TRV-SIPROPEP diferem do calibrador pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

A fim de verificar se a agroinfiltração com TRV-SIPROPEP causa alguma alteração no crescimento e desenvolvimento da planta quatro plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP foram mantidas até o desenvolvimento dos frutos. Observou-se que embora as plantas agroinfiltradas com SIPROPEP tenham crescido menos que as plantas agroinfiltradas com TRV-GFP (Figura 24) elas produziram flores e frutos no mesmo período que as plantas controle, indicando que o silenciamento deste gene não afetou o ciclo de desenvolvimento da planta.

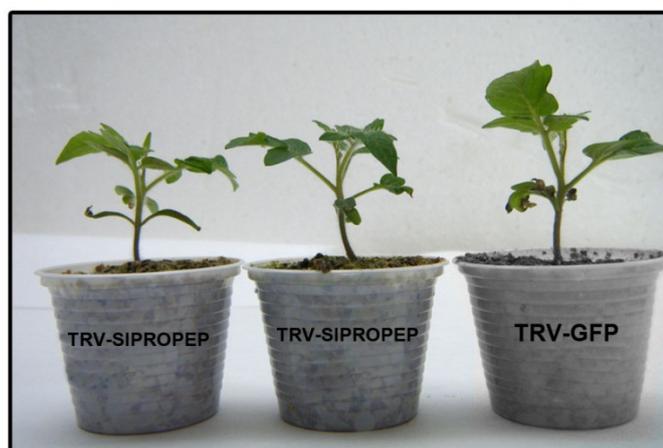


FIGURA 24. Fenótipo de silenciamento em plantas de tomate cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP. Plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP e plantas agroinfiltradas com TRV-GFP (controle) 10 dpi.

#### 4.7.2 Desenvolvimento da doença em plantas TRV-SIPROPEP inoculadas com *P. dissotocum*

Estudos com AtPep1 em *A. thaliana* e sua proteína precursora PROPEP1 demonstram a importância deste peptídeo na amplificação das respostas de defesa contra patógenos necrotróficos (Huffaker *et al.* 2006).

Para verificar se *SIPROPEP* está envolvido na resistência de tomate a *P. dissotocum* plantas agroinfiltradas com TRV-GFP (controle) e TRV-SIPROPEP foram

desafiadas com *P. dissotocum*. Três dias após a inoculação as plantas foram avaliadas quanto à presença de sintomas e sinais do patógeno.

Todas as plantas inoculadas apresentaram sintomas característicos da doença como podridão radicular e manchas necróticas no colo, em alguns casos chegando à constrição. Porém, não foram observados sintomas de amarelecimento foliar e de tombamento das plantas. A severidade dos sintomas causados por *Pythium* sp. nas raízes das plantas foi estimada através da escala de notas conforme realizado nos experimentos anteriores (Figura 25A).

Observou-se que 30% das plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP apresentaram constrição no colo em contraste com apenas 4% das plantas controle agroinfiltradas com TRV-GFP (Figura 25B). Esta observação indica que as plantas TRV-SIPROPEP são mais suscetíveis que as plantas controles. Além disso, revela a importância da quantificação dos danos na planta causados doença pela infecção por *P. dissotocum*, pois embora a planta apresente os sintomas da doença nem sempre vai ocorrer o tombamento e a morte da planta. Um dos pressupostos para haver o tombamento é a constrição no colo das plantas infectadas, porém devido à avaliação ter sido realizada em um curto período de tempo as plantas que apresentaram os sintomas de constrição no colo não chegaram a tombar. Cabe ressaltar que o período estipulado para a realização da avaliação foi pertinente para verificar a severidade da doença e para que a coleta do experimento fosse realizada sem que os danos causados pelo patógeno prejudicassem o isolamento do RNA das plantas para as análises posteriores.

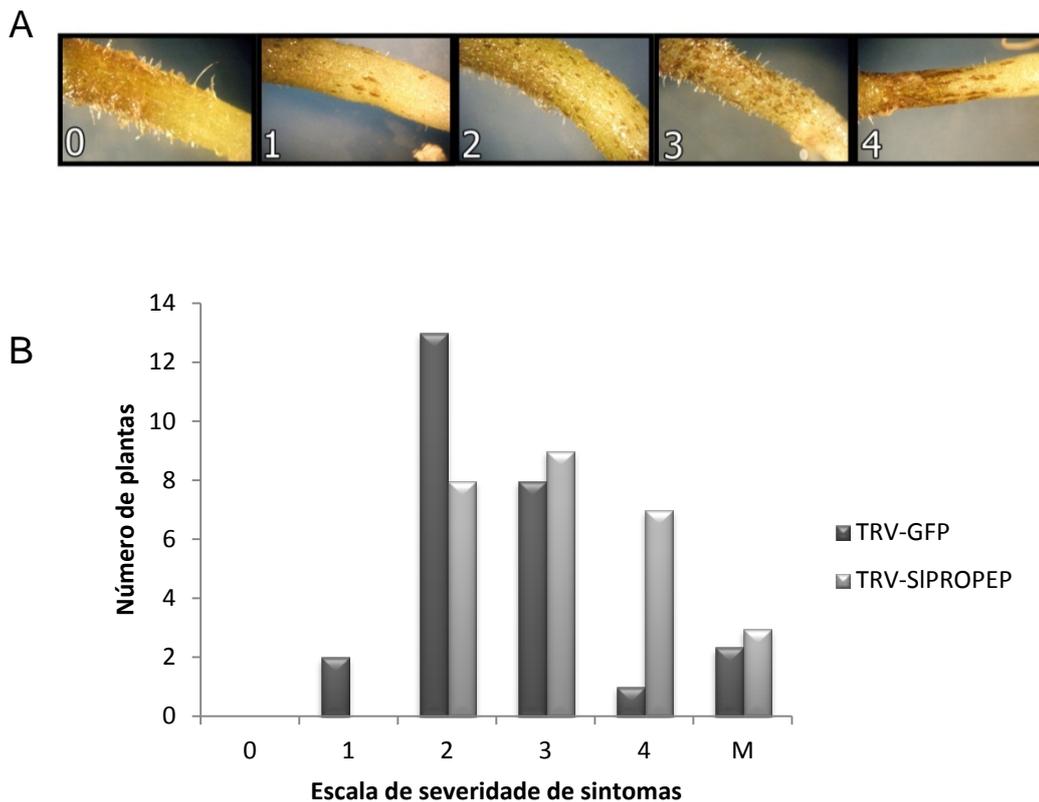


FIGURA 25. Comparação de sintomas observados nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP. Escala de severidade dos sintomas observados em *S. lycopersicum* (A). Comparação da severidade dos sintomas observados em 24 plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e 24 plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP segundo as notas obtidas pela escala severidade dos sintomas 0-4. M - representa a média das notas (B).

As plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP inoculadas com *P. dissotocum* desenvolveram-se menos que as plantas não inoculadas (Figura 26A e B). Isto indica que a infecção das plantas pelo patógeno provocou um menor crescimento das plantas, o que pode acarretar ao longo do ciclo da planta em perdas na produção de frutos.

Huffaker *et al.* (2006) verificaram que aos 25 dias após a inoculação as plantas de *A. thaliana* superexpressando *AtPROPEP1* apresentavam raízes maiores que as plantas controle, indicando que a superexpressão conferiu uma vantagem para o crescimento destas plantas. Este fato não foi verificado no experimento do silenciamento de *SIPROPEP*, provavelmente devido a coleta das raízes das plantas ter sido realizada 3 dpi.

Buscando caracterizar a relação dos sintomas desencadeados na planta com a presença do patógeno nas regiões infectadas, plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP foram analisadas por microscopia. Assim, observou-se que comparadas com as plantas agroinfiltradas com TRV-GFP, as plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP apresentaram uma grande quantidade de manchas necróticas que coalescem provocando a constrição no colo (Figura 26C e D). Além disso, as plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP também apresentaram maior quantidade de estruturas do patógeno. A presença de uma grande quantidade de oósporos no tecido destas plantas comparado com as observações realizadas nas plantas TRV-GFP confirma que existe uma relação direta entre a quantidade de estruturas do patógeno e o sintoma desencadeado na planta (Figura 26E e F), fato este comprovado pela quantificação do DNA do patógeno no tecido das plantas, baseado na região ITS por qPCR (Figura 27).

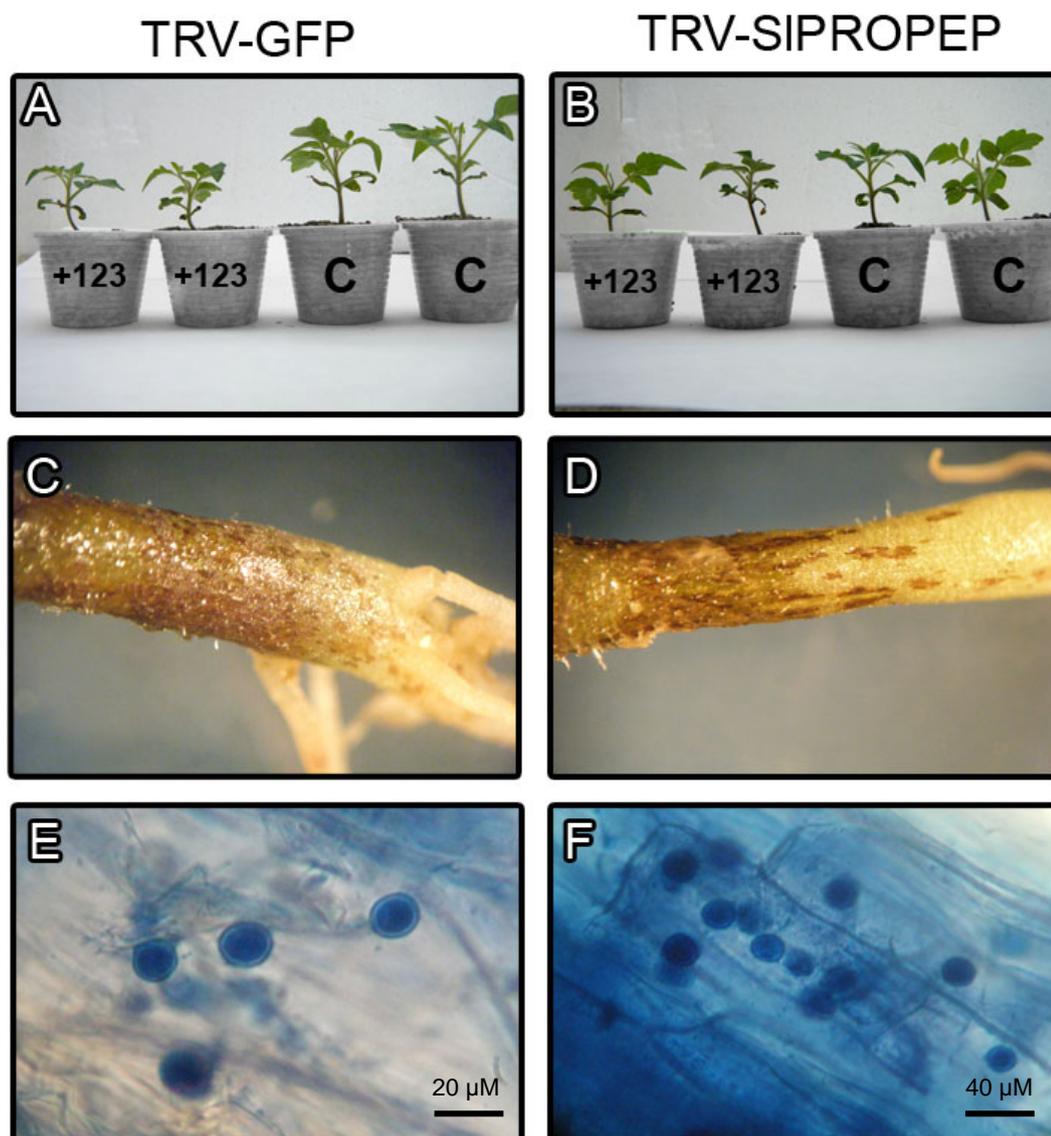


FIGURA 26. Avaliação dos sintomas e sinais na cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP. Plantas TRV-GFP na presença (+123) e ausência (C) de *P. dissotocum* (A). Plantas TRV-SIPROPEP na presença (+123) e ausência (C) de *P. dissotocum* (B). Sintomas observados no colo de plantas TRV-GFP (C) e TRV-SIPROPEP (D). Sinais de *P. dissotocum* observados na região infectada das plantas TRV-GFP (E) TRV-SIPROPEP (F).

#### 4.7.3 Quantificação do patógeno por qPCR

Para verificar se o silenciamento de *SIPROPEP* teria uma relação com o crescimento do patógeno e com a colonização do tecido, o DNA extraído das plantas

agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV- SIPROPEP inoculadas com *P. dissotocum* foi submetido a análise por qPCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores DC-6 (Cooke *et al.*, 2000) e ITS-4 (White *et al.*, 1990) para quantificação do patógeno (Figura 27).

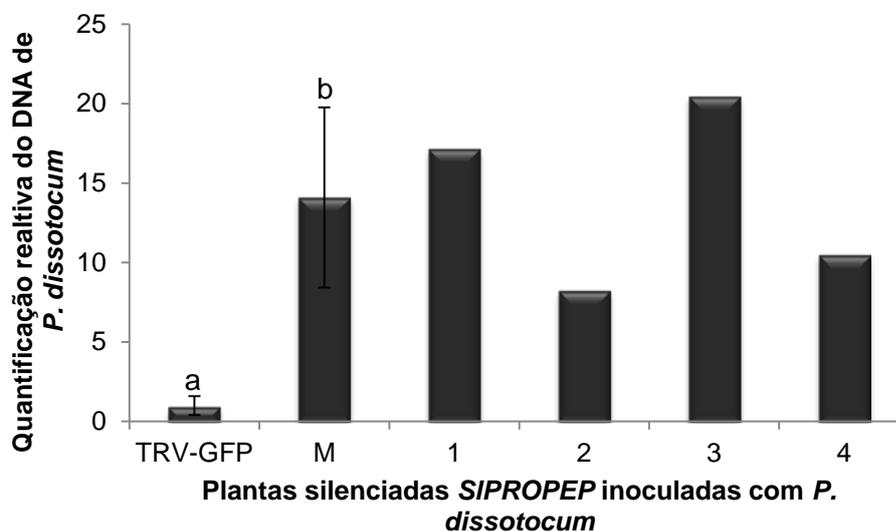


FIGURA 27. Quantificação do DNA de *P. dissotocum* em plantas agroinfiltradas com TRV-GFP e TRV-SIPROPEP, três dpi. Os níveis de DNA do patógeno foram estimados por qPCR baseado na região ITS. M = Média de quatro plantas agroinfiltradas com TRV- SIPROPEP representam o acúmulo de DNA do patógeno em relação ao acúmulo verificado nas plantas agroinfiltradas com TRV-GFP. Todos os valores de Cts foram normalizados pelos Cts do controle endógeno *UBI3* ( $\Delta C_t$ ). Os valores da quantificação relativa representam o número de vezes que o DNA do patógeno aumenta ou diminui em relação às plantas agroinfiltradas com TRV-GFP ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), cujo valor de expressão relativa é 1,0. A média das plantas TRV- SIPROPEP diferem do calibrador TRV-GFP pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Foi identificada a presença do DNA de *P. dissotocum* tanto nas plantas TRV-GFP como nas plantas TRV-SIPROPEP. Porém as plantas TRV-SIPROPEP apresentam até 20 vezes mais DNA do patógeno em suas raízes (Figura 27), indicando que a redução no acúmulo de mRNA de *SIPROPEP* em tomate permite um maior crescimento do patógeno. Estes resultados revelam que existe uma relação entre a severidade dos sintomas encontrados nas plantas TRV-SIPROPEP e a quantidade de patógeno observada nas raízes (Figura 25 e 26) e detectada por qPCR (Figura 27). Isto sugere que *SIPROPEP* está

envolvido nas respostas de defesa das plantas à infecção por *P. dissotocum* e na tolerância das plantas a este patógeno. Visto que este gene não restringe a infecção das plantas TRV-GFP, as quais possuem o gene *SIPROPEP* intacto e são infectadas por *P. dissotocum*., mas a colonização do patógeno nos tecidos das plantas.

#### 4.7.4 Análise da expressão gênica

A superexpressão de *PROPEP1* e *PROPEP2* induziu a expressão das defensinas *PDF1.2* e *PR-1* em *A. thaliana*. Além disso, a aplicação direta do peptídeo AtPep1 e seus ortólogos, bem como outros peptídeos encontrados em soja também possuem capacidade de induzir genes relacionados à defesa (Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker & Ryan, 2007; Pearce *et al.*, 2010; Huffaker *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2011). Com o objetivo de verificar se *SIPROPEP* está envolvido nas respostas de defesa através das vias de sinalização mediadas por AS, JA/ET foi avaliada a expressão de diferentes genes que participam da biossíntese ou sinalização destas vias de defesa, como aminociclopropano carboxilase sintase (*ACS*)-biossíntese de etileno, fator de resposta ao etileno 1 (*ERF1*), lipoxigenase D (*LOXD*)-síntese de JA, além dos genes de defesa que são induzidos pelas vias de JA, ET, AS, ou ambas como as proteína relacionada à patogênese 1 (*PR-1*), proteína semelhante à osmotina (*PR-5*), além da defensinas *DEF2*.

Observou-se que o silenciamento de *SIPROPEP* promoveu a redução do acúmulo de mRNA de todos os genes analisados (Figura 28). Devido ao fato do silenciamento de *SIPROPEP* aumentar a suscetibilidade das plantas de tomate à *P. dissotocum* e que estas plantas apresentaram uma redução na expressão relativa dos genes envolvidos nas diferentes vias de sinalização de defesa, bem como das proteínas de defesa sugere-se que as diferentes vias podem estar envolvidas na defesa de tomate à *P. dissotocum*.

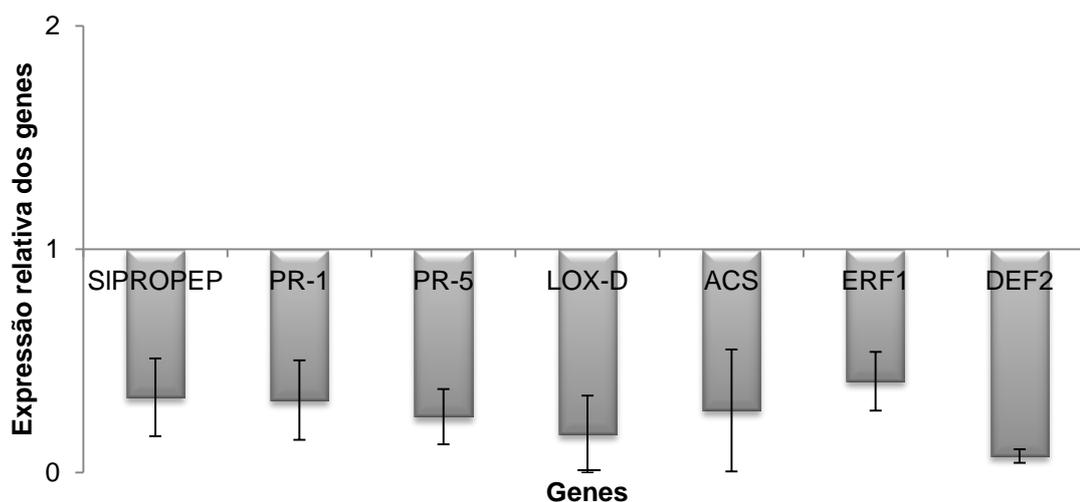


FIGURA 28. Expressão relativa de genes envolvidos na defesa nas raízes de plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP. Todos os valores de Cts foram normalizados pelos Cts do controle endógeno *UBI3* ( $\Delta C_t$ ). Os valores de expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação às plantas agroinfiltradas com TRV-GFP ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), cujo valor de expressão relativa é 1,0. Os valores de expressão relativa são médias de quatro repetições biológica e triplicata técnica.

Em *A. thaliana* estudos em linhas mutantes deficientes ou insensíveis aos hormônios vegetais ácido abscísico, JA, AS e ET, demonstram que a sinalização por ET e JA estão envolvidas na defesa contra *Pythium* spp. (van Loon *et al.*, 2006; Adie *et al.*, 2007). Porém, vias de defesa mediada pelos demais hormônios também contribuem para a defesa, sendo que a expressão de muitos genes de defesa depende do sinergismo entre as vias (Adie *et al.*, 2007).

O silenciamento de *SIPROPEP* tornou as plantas mais suscetíveis a *P. dissotocum* e levou a uma redução nos níveis de mRNA de *ERF1* (Figura 28), indicando o envolvimento deste gene na interação em questão. *ERF1* é descrito como um fator de transcrição que atua como regulador de genes envolvidos nas vias de sinalização mediadas por ET e JA. Além disso, este gene é induzido em resposta à infecção por *B. cinerea* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003; Hongxing *et al.*, 2005). Além deste outros genes da via de sinalização como *EIN2*, *NR*, *ETR4* e da biossíntese de etileno como *ACS* e *ACO* são

induzidos em resposta à infecção por patógenos necrotróficos (Pantelides *et al.*, 2010; Nambeesan *et al.*, 2010). Assim como os mutantes de *A. thaliana ein2* e *etr1* plantas de fumo insensíveis ao ET apresentaram um aumento de suscetibilidade a *Pythium* spp. (Knoester *et al.*, 1998; van Loon *et al.*, 2006), o silenciamento de genes da via de sinalização mediada por etileno aumentou a suscetibilidade das plantas de tomate à murcha causada por *R. solanacearum*, indicando que a via do ET é necessária para a defesa a diferentes patógenos (Chen *et al.*, 2009).

Já o gene *LOXD*, atua na biossíntese de oxilipinas como o JA (Porta & Rocha-Sosa, 2002). A expressão de genes *LOX* pode ser regulada por fatores como ferimentos, infecção por patógenos (Porta *et al.*, 2008) e JA (Heitz *et al.*, 1997), entre outros. Além disso, a atividade de *LOX* está associada à produção de superóxido e influência na produção de etileno. Desta forma a resistência a doenças pode ser o resultado do sinergismo de JA e ET (Yu *et al.*, 2009).

Embora os genes *PR-1* e *PR-5* sejam utilizados como marcadores da resposta de defesa mediada por AS (Thatcher *et al.*, 2005), foi verificado que eles também são induzidos por JA e ET juntos (Xu *et al.*, 1994; Penninckx *et al.*, 1998). Assim a redução dos níveis de mRNA destes genes nas plantas TRV-PROPEP são mais um indicativo do envolvimento de diferentes vias de sinalização para promover a resistência na interação de tomate com *P. dissotocum*, além de importância de *SIPROPEP* nesta interação.

Assim como *SIPROPEP*, as proteínas PRs e a defensina *DEF2* apresentaram um aumento da expressão relativa destes genes nas plantas tratadas com etefon. Interessantemente a redução da expressão relativa de *SIPROPEP* devido ao silenciamento deste gene provocou uma redução na expressão relativa das proteínas PRs e da *DEF2*, indicando que existe um padrão de expressão destes genes nas respostas de defesa de tomate à *P. dissotocum*.

O silenciamento dos genes *SIPROPEP*, *CTR1* e *ERF1* demonstra a importância destes genes na defesa das plantas de tomate à infecção por patógenos do gênero *Pythium*, e sugere que a defesa é mediada por etileno nesta interação. Além disso, plantas TRV-*SIPROPEP* apresentam um perfil de expressão de genes marcadores das vias de defesa que sugere que as diferentes vias de sinalização mediadas pelos fitohormônios estão envolvidas no processo de defesa das plantas de tomate à *P. dissotocum*.

Estes resultados, em conjunto com o aumento da resistência nas plantas tratadas com etefon as quais induziram *SIPROPEP* e *DEF2* indicam que a via de sinalização ET atua na resistência de tomate à *P. dissotocum* e possivelmente esta resistência é mediada por *SIPROPEP*.

Em *A. thaliana* plantas expressando constitutivamente o *AtPROPEP1* apresentam altos níveis de expressão dos genes *PDF1.2* e *PR-1* e são mais resistentes à *P. irregulare* e a *P. deliense* (Huffaker, 2006, Trivilin, 2008). Além disso, a aplicação direta do peptídeo em plantas é também um mecanismo efetivo para manipular a defesa. Plantas de *A. thaliana* pré-tratadas com AtPep1 aumentaram a resistência *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000 (Zipfel *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2010). Assim como AtPep1, o peptídeo endógeno de milho, ZmPep1 ativou diversos componentes da resposta imune. Estas respostas de defesa ativadas pelo peptídeo foram caracterizadas pela indução de fitohormônios relacionados à defesa, indução da expressão de genes de defesa contra patógenos e aumento de resistência a múltiplos patógenos (Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker *et al.*, 2011). Desta forma, outros trabalhos visando o isolamento do peptídeo SIPep do ortólogo de *AtPROPEP1* encontrado em tomate neste trabalho devem ser realizados para verificar o papel de SIPep em amplificar as vias de sinalização de respostas de defesa das plantas à patógenos necrotróficos e podem ser uma estratégia para o controle de doenças causadas por diferentes patógenos, inclusive os radiculares.

## 5 CONCLUSÕES

A superexpressão de *AtPROPEP1* em *A. thaliana* aumenta a resistência de plantas a patógenos induzindo a defensina *PDF1.2*, as *PRs* e *GPR3*, diferentes genes relacionado com defesa contra patógenos. Assim como em *A. thaliana*, a identificação de um ortólogo de *AtPROPEP1* em *S. lycopersicum* também está relacionado com a defesa. Em tomate o silenciamento de *SIPROPEP* tornou as plantas mais suscetíveis ao patógeno necrotrófico *P. dissotocum* e reprimiu a expressão da defensina *DEF2*, as *PRs* além de genes relacionados com as vias de biossíntese e resposta de *JA* e *ET*. Além disso, o silenciamento de genes da via de sinalização mediada por *ET*, bem como a aplicação exógena de *ET* mostraram ter um efeito positivo na resistência de tomate a *P. dissotocum*, indicando que a resistência de tomate a *P. dissotocum* é mediada por *SLPROPEP* através das vias de sinalização de *AS*, *JA* e *ET*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MONAIM, M. F. Induced systemic resistance in tomato plants against Fusarium wilt disease. **International Research Journal of Microbiology**, Istanbul, v. 3, n. 1, p. 014-023, 2012.
- ACHUO, E. A. et al. The salicylic acid-dependent defense pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, p. 65-72, 2004.
- ADAMS, M. D. et al. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, London, v. 377, p. 3-174, 1995. Suplemento.
- ADIE, B. et al. Modulation of plant defenses by ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 160-177, 2007a.
- ADIE, B. A. T. et al. ABA is an essential signal for plant resistance affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1665-1681, 2007b.
- AHN, C. S. et al. Prohibitin is involved in mitochondrial biogenesis in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, p. 658-667, 2006.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERSON, J. P. et al. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 3460-3479, 2004.
- AOKI, K. et al. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 210, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/210>>. Acesso em: 20 maio 2012.
- APPIAH, A. A. et al. Potassium homeostasis influences the locomotion and encystment of zoospores of plant pathogenic oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 213-223, 2005.

ASAI, T. et al. Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signalling pathways. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 1823-1836, 2000.

AUSUBEL, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature Immunology**, New York, v. 6, p. 973-979, 2005.

BAULCOMBE, D. RNA silencing. **Current Biology**, London, v. 12, n. 3, p. R82-R84, 2002.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, London, v. 431, p. 356-363, 2004.

BELHADJ, A. et al. Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 5781-5787, 2008.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 39, p. D32-D37, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071399>>. Acesso em: 20 maio 2012.

BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 399-436, 2007.

BERROCAL-LOBO, M. et al. Constitutive expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 23-32, 2002.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 763-770, 2004.

BHATTARAI, K. K. et al. The MI-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. **Plant Physiology**, Washington, v. 144, p. 312-23, 2007.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 379-406, 2009.

BOMBARELY, A. et al. The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 39, p. D1149-D1155, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935049>>. Acesso em: 20 maio 2012.

BOUDJEKO, T. et al. Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. **Planta**, Berlin, v. 223, p. 271-282, 2006.

BRASILEIRO, A. C.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998.

- BREDERODE, F. T. et al. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, p. 1117–1125, 1991.
- BRIGNETI, G. et al. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. **The Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 264-272, 2004.
- BROEKAERT, W. F. et al. The role of ethylene in host–pathogen interactions. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 393-416, 2006.
- BROWSE, J. The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. **Phytochemistry**, Pullman, v. 70, n. 13-14, p. 1539-1546, 2009.
- BRUMMELL, D. A. et al. Inverted repeat of a heterologous 30-untranslated region for high-efficiency, highthroughput gene silencing. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 793–800, 2003.
- BUGOS, R. C. et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, New York, v. 19, n. 5, p. 734-737, 1995.
- BURCH-SMITH, T. M. et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 734–746, 2004.
- CAMPION, C. et al. Agressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 725-735, 1997.
- CAMPOS, M. L. et al. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 4347-436, 2009.
- CHEN, C. et al. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, p. 477–486, 1999.
- CHEN, Y-Y. et al. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene, salicylic acid and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 136, p. 324-335, 2009.
- CHISHOLM, S. T. et. al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Cambridge, v. 124, p. 803-814, 2006.
- COOKE, D. E. L. et al. A molecular phylogeny of Phytophthora and related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 30, p. 17-32, 2000.
- CORRÊA, A. S. et al. Yellow stunt, a tobacco disease caused by *Pythium dissotocum*, in southern parts of Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 3, p. 354-354, 2011.

CRAMER, R. A. et al. Bioinformatic analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Alternaria brassicicola* –*Brassica oleracea* interaction. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 7, p. 113-124, 2006.

DALMAY, T. et al. Potato virus X amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 369-379, 2000.

DE OLIVEIRA, D. E. et al. Differential expression of five *Arabidopsis* genes encoding glycine rich proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 427-436, 1990.

DEVADAS, S. K. et al. The *Arabidopsis* *hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, p. 467-480, 2002.

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generation differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, n. 12, p. 6025-6030, 1996.

DIAZ, J. et al. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, p. 1341-1351, 2002.

DONALDSON, S. P.; DEACON, J. W. Effects of amino acids and sugars on zoospore taxis, encystment and cyst germination in *Pythium aphanidermatum* (Edson) Eitzp., *P. catenulatum* Matthews and *P. dissotocum* Drechs. **New Phytologist**, Cambridge, v. 123, p. 289-295, 1993.

EGUSA M. et al. The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen. **Planta**, Berlin, v. 229, p. 965-976, 2009.

EKENGREN, S. K. et al. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, p. 905-917, 2003.

FANG-I HO, F-I. et al. A tobacco rattle virus-induced gene silencing system for a soil-borne vascular pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Botanical Studies**, Minnesota, v. 50, p. 413-424, 2009.

FAURIE, B. et al. Methyl jasmonate/ethephon cotreatment synergistically induces stilbene production in *vitis vinifera* cell suspensions but fails to trigger resistance to *erysiphe necator*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Villenave D'ornon, v. 43, n. 2, p. 99-110, 2009.

FERRARI, S. et al. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 35, p. 193-205, 2003.

FLORS, V. et al. Abscisic acid and callose: team players in defense against pathogens? **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 377-383, 2005.

- FU, D. Q. et al. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. **Molecules and Cells**, Korean, v. 21, p. 153-160, 2006.
- GAO Z. et al. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signalling complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 34725-34732, 2003.
- GERAATS, B. P. J. et al. Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 1078-1085, 2002.
- GERAATS, B. P. J. et al. Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 813-82, 2003.
- GLAZEBROOK, J. et al. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, p. 217-228, 2003.
- GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.
- GOUDEY, J. S. et al. Uptake and fate of ethephon ([2-Chloroethyl] Phosphonic Acid) in dormant weed seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 85, p. 155-157, 1987.
- GOLD, S. E.; STANGHELLINI, M. E. Effects of temperature on *Pythium* root rot of spinach grown under hydroponic conditions. **Phytopathology**, Berlin, v. 75, n. 3, p. 333-337, 1985.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L. et al. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 277-284, 1999.
- GOTESSON, A. et al. Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 907-21, 2002.
- GRANT, M. R.; JONES, J. D. G. Hormone (Dis)harmony moulds plant health and disease. **Science**, London, v. 324, p. 750-752, 2009.
- GUINETTI-GONZALEZ, S. et al. Genes associated with hypersensitive response (HR) in the citrus EST database (CitEST). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 943-956, 2007.
- HAAS, B. J. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, London, v. 461, p. 393-398, 2009.
- HAHLBROCK, K. et al. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 4150-4157, 1995.

- HALIM, V. A. et al. The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, p. 311-318, 2004.
- HALIM, V. A. et al. PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, p. 230-242, 2009.
- HARTL, M. et al. Optimized virus-induced gene silencing in *Solanum nigrum* reveals the defensive function of leucine aminopeptidase against herbivores and the shortcomings of empty vector controls. **New Phytologist**, Cambridge, v. 179, p. 356-365, 2008.
- HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 285-306, 1999.
- HARDHAM, A. R. Cell biology of plant-oomycete interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 31-39, 2007.
- HE, Z.-H. et al. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, p. 55-64, 1998.
- HEITEFUSS, R. Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 88, p. 273-283, 2001.
- HENDRIX, F. F.; CAMPBELL, W. A. *Pythium* as a plant pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 11, p. 77-98, 1973.
- HIETER, P.; BOGUSKI, M. Functional genomics: it's all how you read it. **Science**, London, v. 278, p. 601-602, 1997.
- HONG, J. K. et al. Pepper gene encoding a basic class II chitinase is inducible by pathogen and ethphon. **Plant Science**, Limerick, v. 159, p. 39-49, 2000.
- HONGXING, Z. et al. Cloning and DNA-binding properties of ethylene response factor, LeERF1 and LeERF2, in tomato. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, p. 423-428, 2005.
- HORIGUCHI, G. RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. **Differentiation**, Berlin, v. 72, p. 65-73, 2004.
- HÜCKELHOVEN, R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 101-127, 2007.
- HUET, J-C. et al. The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitor like protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 8, p. 302-310, 1995.

HUFFAKER, A. et al. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, p. 10098-10103, 2006.

HUFFAKER, A.; RYAN, C. A. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 104, n. 25, p. 10732-10736, 2007.

HUFFAKER, A. et al. ZmPep1, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 155, p. 1325-1338, 2011.

ISLAM, M. T.; TAHARA, S. Chemotaxis of fungal zoospores, with special reference to *Aphanomyces cochlioides*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 1933-1948, 2001.

JABLONSKA, B. et al. The Mi-9 Gene from *Solanum arcanum* Conferring Heat-Stable Resistance to Root-Knot Nematodes Is a Homolog of Mi-1. **Plant Physiology**, Washington, v. 143, p. 1044-1054, 2007.

JIANG H. Y. et al. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 105, p. 4874-4879, 2008.

JONES, J. J. et al. Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 109, p. 201-211, 2004.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, p. 323-329, 2006.

JUNG, H. W.; HWANG, B. K. Pepper gene encoding a basic beta-1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethephon or methyl jasmonate treatment. **Plant Science**, Limerick, v. 159, p. 97-106, 2000.

KAMOUN, S. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 295-300, 2001.

KAMOUN, S. et al. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? **Trends in Plant Science**, Oxford, v.4, n.5, p.196-200, 1999.

KAWAMURA, Y. et al. INF1 elicitor activates jasmonic acid- and ethylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 287-297, 2009.

KIEBER, J. J. et al. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. **Cell**, Cambridge, v. 72, p. 427-441, 1993.

- KIRÁLY, L.; BARNA, B.; KIRÁLY, Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 385-396, 2007.
- KJEMTRUP, S. et al. Gene silencing from plant DNA carried by geminivirus. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, p. 91-100, 1998.
- KNOESTER, M. et al. Ethylene-insensitive tobacco lacks non-host resistance against soil-borne fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 95, p. 1933-1937, 1998.
- KNOESTER, M. M. et al. Involvement of ethylene in lesion development and systemic acquired resistance in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 45-57, 2001.
- KOBAYASHI, Y. et al. Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 38, p. 725-733, 1997.
- KONG, P. et al. Single-strand conformational polymorphism analysis of the ribosomal internal transcribed spacer 1 for rapid species identification within the genus *Pythium*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 240, p. 229-236, 2004.
- KROJ, T. et al. Mitogen activated protein kinases play an essential role in oxidative burst independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 2256-64, 2003.
- KROL E. et al. Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 285, p. 13471-13479, 2010.
- KUCHAREK, T.; MITCHELL, D. **Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium***. Gainesville: University of Florida, 2000. (Plant pathology fact sheet, PP-53). Disponível em: <<http://128.227.207.24/takextpub/FactSheets/pp53.pdf>>. Acesso em: 08 mar. 2012.
- KUMAGAI, M. H. et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 1679-1683, 1995.
- KUNKEL, B. N.; BROOKS, D. M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 325-331, 2002.
- KUNZE, G. et al. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 3496-3507, 2004.
- LASCOMBE, M-B. et al. Structure of sylvaticin, a new  $\alpha$ -elicitor-like protein from *Pythium sylvaticum*. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. D63, p. 1102-1108, 2007.
- LECELLIER, C. H.; VOINNET, O. RNA silencing: no mercy for viruses? **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 198, p. 285-303, 2004.

LECLERCQ, J. et al. *LeCTR1*, a tomato *CTR1*-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, p. 1132-1142, 2002.

LEE, S. C. et al. A pathogen-induced chitin binding protein gene from pepper: Its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, p.1321-1330, 2001.

LEON-REYES, A. et al. Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, p. 1797-1809, 2009.

LÉVESQUE, C. A. et al. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. **Genome Biology**, London, v. 11, n. R73, 2010. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2010/11/7/R73>>. Acesso em: 20 maio 2012.

LINTHORST, H. J. M. et al. Characterization of cDNA clones for a virus-inducible, glycine-rich protein from petunia. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 15, p. 521-523, 1990.

LOPES, A. C. et al. **Como prevenir o “tombamento” em mudas de hortaliças**. Brasília : Embrapa.CNPq, 2005. (Comunicado técnico, n. 28). Disponível em: <[http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/publicacoes/publicacoes\\_2005/pdf\\_vfinal\\_2005](http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/publicacoes/publicacoes_2005/pdf_vfinal_2005)>. Acesso em: 08 mar. 2012.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S. P. Virus-induced gene silencing in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, p. 777-786, 2002.

LIGTERINK, W. et al. Receptor mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. **Science**, London, v. 276, p. 2054-7, 1997.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, London, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIN, Z. et al. *LeCTR2*, a *CTR1*-like protein kinase from tomato, plays a role in ethylene signalling, development and defence. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 1083–1093, 2008.

LIPKA, V. et al. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. **Science**, London, v. 310, p. 1180-1183, 2005.

LISITSYN, N. et al. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, London, v. 259, p. 946-951, 1993.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, Minneapolis, v. 25, p. 402-408, 2001.

LORENZO, O. et al. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 165-78, 2003.

MACDONALD, E. et al. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 37, p. 245-249, 2002.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 8, p. 4064-71, 2008.

MEDEIROS, M. S. **Caracterização da interação de *Pythium* spp. com plântulas de *Solanum lycopersicum***. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MELLO, C. C.; CONTE, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, London, v. 431, p. 338-342, 2004.

MELOTTO, M. et al. A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, p. 979-988, 2008.

MIKI, D. et al. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 138, p. 1903-1913, 2005.

MISHRA, R. N. et al. A modified cDNA subtraction to identify differentially expressed genes from plants with universal application to other eukaryotes. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 345, p. 149-157, 2005.

MUR, L. A. J. et al. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, Washington, v. 140, p. 249-262, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Washington, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-5, 1980.

NAMBEESAN, S. et al. Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. **Plant Physiology**, Washington, v. 158, n. 2, p. 1034-45, 2012.

NAPOLI, C. et al. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 279-289, 1990.

NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J. et al. Plant peptide signals. In: HUGHES, A. (Ed.). **Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. p. 599-631.

NAVARRO, L. et al. The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, p. 1113-1128, 2004.

NDAMUKONG, I. et al. SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 128-139, 2007.

NÜRNBERGER, T. et al. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Cell**, Cambridge, v. 78, p. 449-60, 1994.

O'DONNELL, P. J. et al. Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. **Plant Physiology**, Washington, v. 133, p. 1181-1189, 2003.

OKUBARA, P. A.; PAULITZ, T. C. Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. **Plant and Soil**, The Hague, v. 274, p. 215-226, 2005.

ONKOKESUNG, N. et al. Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. **Plant Physiology**, Washington, v. 153, p. 785-798, 2010.

OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; RYAN, C. A. Polygalacturonase beta-subunit antisense gene expression in tomato plants leads to a progressive enhanced wound response and necrosis in leaves and abscission of developing flowers. **Plant Physiology**, Washington, v. 133, p. 693-701, 2003.

ORZAEZ, D. et al. A visual reporter system for virus-induced gene silencing in tomato fruit based on anthocyanin accumulation. **Plant Physiology**, Washington, v. 150, n. 3, p. 1122-34, 2009.

OSBORN, R. W. et al. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 368, p. 257-262, 1995.

OSBOURN, A. E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1821-1831, 1996a.

OSBOURN, A. E. Saponins and plant defence: a soap story. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 1, p. 4-9, 1996b.

OWEN-GOING, N. et al. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian journal of plant pathology-Revue canadienne de phytopathologie**, Ontario, v. 25, p. 155-167, 2003.

- PANTELIDES, I. S. et al. Insights into the role of ethylene perception in tomato resistance to vascular infection by *Verticillium dahlia*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, p. 130-138, 2010.
- PARK, R. A. et al. Interaction of the *Arabidopsis* receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich rotein, AtGRP-3. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 28, p. 26688-26693, 2001.
- PEARCE, G. et al. A polypeptide from tomato leaves activates the expression of proteinase inhibitor genes. **Science**, London, v. 253, p. 895-897, 1991.
- PEARCE, G. et al. Systemins. In: KASTIN, A. J. (Ed.). **Handbook of biologically active peptides**. Burlington: Academic Press, 2006. p. 49-53.
- PEARCE G. et al. Structure-activity studies of AtPep1, a plant peptide signal involved in the innate immune response. **Peptides**, New York, v. 29, p. 2083-2089, 2008.
- PEARCE, G. et al. A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, p. 14921-14925, 2010b.
- PEARCE, G.; RYAN, C. A. Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. isolation and characterization of three novel defense signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Betheesda, v. 278, p. 30044-30050, 2003.
- PICARD, K. et al. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, p. 379-395, 2000.
- PORTA, H. et al. Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Planta**, Berlin, v. 227, p. 363-373, 2008.
- PORTA, H.; ROCHA-ROSA, M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, p. 15-21, 2002.
- QUTOB, D. et al. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-Like Proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3721-3744, 2006.
- RADHAKRISHNAN, N.; BALASUBRAMANIAN, R. Salicylic acid induced defence responses in *Curcuma longa* (L.) against *Pythium aphanidermatum* infection. **Crop Protection**, Guildeford, v. 28, p. 974-979, 2009.
- RAFTOYANNISA, Y.; DICKB, M. W. Zoospore encystment and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species on plant roots. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, p. 1-8, 2006.

- RAKWAL, R. et al. Chitinase induced by jasmonic acid, methyl jasmonate, ethylene and protein phosphatase inhibitors in rice. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 31, p. 113-119, 2004.
- RATCLIFF, F. et al. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **The Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 237-245, 2001.
- REDDY, M. K. et al. Global amplification of cDNA from limiting amounts of tissue: an improved method for gene cloning and analysis. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 22, p. 223-230, 2002.
- RENSINK, W. A.; BUELL, C. R. Arabidopsis to rice. Applying knowledge from a weed to enhance our understanding of a crop species. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, p. 622-629, 2004.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A. et al. Pathological hormone imbalances. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 372-379, 2007.
- ROS, B. et al. Comparative analysis of *Phytophthora infestans* induced gene expression in potato cultivars with different levels of resistance. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 686-693, 2005.
- RUIZ, M. T. et al. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 937-946, 1998.
- RYAN, C. A. et al. New insights into innate immunity in Arabidopsis. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1902-1908, 2007.
- RYU, C.-M. et al. Agroinoculation: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. **The Plant Journal**, Oxford, v. 40, p. 322-331, 2004.
- SAGERSTOM, C. G. et al. Subtractive cloning: past, present and future. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 66, p. 751-783, 1997.
- SHAH, J. Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 229-260, 2005.
- SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning: a laboratory laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHENA, M. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, London, v. 270, p. 467-470, 1995.
- SENTHIL-KUMAR, M. et al. A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. **New Phytologist**, Cambridge, v. 176, p. 782-791, 2007.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, p. 797-806, 2011a.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in plant science**, Oxford, v. 16, p. 656-65, 2011b.

SIVASANKAR, S. et al. Expression of Allene Oxide Synthase determines defense gene activation in tomato. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p. 1335-1342, 2000.

SPOEL, S. H. et al. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 760-770, 2003.

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

STANGHELLINI, M. E. et al. Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with a nonionic surfactant. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 1113-1116, 1996.

STASWICK, P. E. et al. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 15, p. 747-754, 1998.

STOTZ, H. U. et al. A defensin from tomato with dual function in defense and development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 71, p. 131-143, 2009.

SUTTON, J. C. et al. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 32, n. 4, p. 307-321, 2006.

TAO, Y. et al. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 317-330, 2003.

THATCHER, L. F. et al. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, p. 1-19, 2005.

THOMMA, B. P. H. J. et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, p. 15107-15111, 1998.

THOMMA, B. P. H. J. et al. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, p. 163-171, 1999.

TRIVILIN, A. P. **Superexpressão do gene codificante do peptídeo AtPep1 em *A. thaliana* visando a obtenção de resistência à isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium***. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em

Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 13, p. 459-465, 2010.

TUTTLE, J. R. et al. Geminivirus-mediated gene silencing from *Cotton leaf crumple virus* is enhanced by low temperature in cotton. **Plant Physiology**, Washington, v. 148, p. 41-50, 2008.

TYAGI, A. K. et al. Structural and functional analysis of rice genome. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 83, n. 1, p. 79-99, 2004.

TYLER, B. M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 137-167, 2002.

UNVER, T.; BUDAK, H. Virus-Induced Gene Silencing, a Post Transcr Silencing Method. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2009, p. 1-8, 2009.

VALENTINE, T. et al. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. **Plant Physiology**, Washington, v. 136, p. 3999-4009, 2004.

VAN DER PLAATS-NITERINK, J. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology**, Baarn, n. 21, 1981. Disponível em: <[http://www.cbs.knaw.nl/simonline/sim\\_021/sim21.htm](http://www.cbs.knaw.nl/simonline/sim_021/sim21.htm)>. Acesso em: 06 mar. 2012.

VAN LOON, L. C. et al. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN WEST, P. et al. Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. **Molecular plant-microbe interactions**, Sain Paul, v. 15, p. 790-798, 2002.

VAN WEST, P. et al. Advances in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p. 99-113, 2003.

VEIT, S. et al. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, Arabidopsis, and tobacco. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, p. 832-841, 2001.

VELCULESCU, F. E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, London, v. 270, p. 484-487, 1995.

VERHAGE, A. et al. Plant immunity: It's the hormones talking, but what do they say? **Plant Physiology**, Washington, v. 154, p. 536-540, 2010.

VIJAYAN, P. et al. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, p. 7209-14, 1998.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

XU, Y. et al. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1077-1085, 1994.

WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 681-697, 2007.

WASTERNAK, C. et al. The wound response in tomato – role of jasmonic acid. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, p. 297-306, 2006.

WATERHOUSE, P. M. Plant gene silencing applications. **Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 5, p. 1-3, 2002.

WATERHOUSE, P. M.; HELLIWELL, C. A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, p. 29-38, 2003.

WATSON, J. M. et al. RNA silencing platforms in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, p. 5982-5987, 2005.

WHITE, T. J. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

YAMAGUCHI, Y. et al. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 26, p. 10104-10109, 2006.

YAMAGUCHI, Y. et al. GmPep914, an eight-amino acid peptide isolated from soybean leaves, activates defense-related genes. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, p. 932-942, 2011.

YAZAKI, K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 1183-1191, 2005.

YOSHIOKA, H. et al. Nicotiana benthamiana gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 3, p. 706-718, 2003.

YU, M. et al. The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 54, p. 153-158, 2009.

ZHANG, H. et al. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, p. 825-834, 2004.

ZHANG W, WEN C-K. Preparation of ethylene gas and comparison of ethylene responses induced by ethylene, ACC and ethephon. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 45-53, 2010.

ZHANG, W. et al. Ethylene preparation and its application to physiological experiments. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, n. 4, p. 453-457, 2010.

ZIPFEL, C. et al. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. **Nature**, London, v. 428, p. 764-767, 2004.

ZIPFEL, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 20, p. 10-16, 2008.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 414-420, 2009.

## 7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Sequência do cromossomo 4 de *Solanum lycopersicum*. Parte da sequência do cromossomo 4 entre 37449 pb e 40588 pb. Em destaque a sequência correspondente ao ortólogo de *AtPROPEP1*, *SIPROPEP* (entre 37666 pb e 39955 pb). Em azul está representada a região correspondente ao íntron. Em cinza, a região correspondente ao cDNA depositada no GenBank (acesso: AK325093).

```
>gi|194239932|emb|CU914525.3| S.lycopersicum DNA sequence from clone
LE_HBa-149017 on chromosome 4, complete sequence DNA linear 45002 pb
AAAGGTTCTTGTATATTTTATCTTCCTCAGATTTATTGTCATGATTTAAAAGTTCAAGATGGTCTCATATGAT
ACTCTGTATCGAAGATAATATCGTTCCTAATTGAAAATCATTGGAATCTAATGAAAATAAAGTTATTGAGTTC
GATCACATTTTGAAGAGCGGTAGAAGAAGATTGCATCCACTTAAATCAATAGAGAATTGGAAATCAAAATTCG
ACAAATACTCAACTTGTAGATTTAATTATTTACTAATACTTAACTTACAAATATGAAAATAAAATTCCTTAT
ATCTTACAATACATGTATATAAAACAAATAATTAAAGGACCTAATACAATTTAACTCCGAAATCAAACCAAGAT
AAAAGAGCAATACGACTAGACCTAAGTCTCGATATAAATATCGACCATATGAAAAAGCAGACATATTTTGGGC
CGACTACTACGACTATATAGGTCTATCGAGTGCCGTGGCTTGAAAATAAAACAATTTTCGATCATCTTTTAAATA
TTCTAAATAAATTTACTGATCAAATAACCATCGACTAAATTTAAAGTGTTCGATATATAGTCTAACTAATCAAT
TAATTTGTTCTGAGGAGGAGGTCCACTACCAACTTTAGGTCTTGATGGTGGTCTTCCCCTCCTATCTGTTGCTA
ATATCTGCGTACACAACCAAAATAAAACAATCATAATGTCTTTAATTTGTGATTACGAATTAATAAATAGAT
TTGACTCTCAAAATTCGAATAATTATATTACTTAGAGACATGACTGTATCATCTATATTAAGATTTGAAGCAT
AACAAATGTTAAAAAACCTAACTTTGATAGGTGACAAAATTTAAATGTGTGTTAAAGTGTAAACACCTCTT
TTGGCAAAAATAAAAATGTTATAGTTTGAACAAATGAATAAGACATGATTTAAATATGAAACAAATAAAAAT
GTGATAGTTTGTAAAGGTTTCATCTGAAAGTTGTAGTCCCTTAGGTACATTAAATAAGACATAATTCAAATAT
GAAACATACAAAAAAAATAAAAATTAGGAGGGTTTTGATCCATTATTTAAAAAAGAAAAAAGAAATATG
TGTAAGACTTTTGTTTGTCATGTCCCTATATCTCATTTTTTTGCTAAAATAAATACGTAATAATTGGATATAA
TTCTAATAAATGAAAAAAAATAAATATAGAAATTGCATGTTCTATATATTTTATATTTCTTTTTTTGTA
AAAGACATATTTCTTGAAACTCAAAGAGAGAGAGAGAAGCAGCTATTCTTTTCATCAAATACTATTCAACAA
CCGACATATTTCTGGAGAATTTAATTTTTTTTATTATTAATAATAGAAATTATGACCTTTTTTTAAATTTTTT
TTATTTTAAAGGTGTTAATCATGAAATATTTCTTTTTTTTAAAGTTAACTTTTCGAAAACATTTTTTTTC
ATAAATTTGGGAATTCAACTACTTGAGAATTACAAAAAACAAAAAATTATAAAAAGACATTTTCACTTTTT
TCACTCTAAATCACACACACAAAAAAAATAAATAAATAAATTAATTTATAGTCATAACCAAGTACAATTT
TAAAAATCATTTTGTACCTTAAAAATAGAGTTATTTTTTTTCTTCAAATTTTCATGATAAAATATGATCAAACAT
GGTCTAATCGTAATGTAACATTATATTCGGTAGTGTACGTAGTGGATTAAATTAATAACATCAAACCTCTT
AGCTAGAAAATTTATTTACTACGCATATATCAAATCTTCTTGAGTTTTATTTGTAATACGTAATCATATGAGAT
CATTTCTTCGTTAATTTCTCTATGAAAATACTAATTTAAAGAGAATAATTTAATGATAATAACAAAAGATTT
AGCGTAATTTATAAAGAATGATATCTATCCAGTCTTATTCGTACTTTTTTTTTTAAAGTAGAAAGACGATTTT
CGATTTATTAATAAAAAGGTGAAAAGTAGTAGATGATGAACCTTACAAGAGTTGGATCTTCATCATTAGTTTCA
GCTGGAGGGTCATTTTCGTAATTATCATTTGTTGAATCTGAACCTTGCTTCTTACCATCTTCATGGAACAAA
CACACTCTTGTCTTGTTTTTCACTCTCTTCTTCTTTTTTATTATTAGTACCTAACATACTCGAAGAAGA
AGAAGACGATGATGATGAGGACGACGAGGATGAAGAGGATGCTTGATGAACAAGTTTTGAAGATTCAAACCA
AGGCATTTTAGAATAGCTTTAATGCCTTCTTGTAAGTAAAAAATGGATTCTTGGTGATAACTTCATCATAAA
CTGATGATCTACTCTTTTTTCTCTTCCATATTAATAACTCTTTCTTTTCTTACAAATGCTTGATTATATT
ATATTTTTTGGACTTGTATTATTATTGCAACTAATAAATAGGAAGATGAGTAGCTTGCTCTCTTTAATGTTTTT
```

Continuação APÊNDICE 1. Sequência do cromossomo 4 de *Solanum lycopersicum*. Parte da sequência do cromossomo 4 entre 37449 pb e 40588 pb. Em destaque a sequência correspondente ao ortólogo de *AtPROPEP1*, *SIPROPEP* (entre 37666 pb e 39955 pb). Em azul está representada a região correspondente ao íntron. Em cinza, a região correspondente ao cDNA depositada no GenBank (acesso: AK325093).

```
GCTGAATGGTTTGGTGATGTTCTTTAATGAACCTAAGCTTTGGCCCTTTTTATGTTAAAACACACAATATTTG
ACACATAACAATATGCTTGTAGTAATCCTTCTATAGACTTTGTAAAAGTGTGCTTTCTCGAATAGTTTAATCTA
TTAGATAAGATGGTTATATATTTTTAATATTGTATCAGATTGAGCAGATATATATTCTGTAATCGAATAGTTTA
ATTTTTTTTTATGAGTTTGATTTATGAAAAAATAGATCACCGCTATTTATATCAAACAAAAATTTTCATATGCT
TGGTTTATGAAAAAAAATTAAGCCGCACGTGAGAGAACGTGTTGAGAATGAAATTAACATAAAAAATGTG
CATCTCTCTCTAACGGCTTAACCTTTAAGTTTAGATGAGCAATCATACTTCTAACATATACAAATATATGTAA
ATGTTTCGGGTTTCGAGATTCATATAGTTTAAAACATAGTGAATTGTTTTGAAATAAATTTTATTTTATTTATT
TGATTTTTCACTCTATATAAAAATGCTCGTACGTATTAGAATACTAACTAATTAATTTGAATCACTCAATGTT
TGGTGTCCGTATTAGAGTAATAACTAATTAATTTGGAATTGCACATTATATGACTTATTTGAAATGGCACTCC
```

APÊNDICE 2. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor TRV2b com os diferentes insertos com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em cinza claro está a sequência de oligonucleotídeos para amplificação dos insertos e as regiões em cinza escuro indicam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI*, para clonagem no vetor TRV2b.

>TRV-SIPROPEP

```
ATCCCACCCCCCCCCAAGTCCTCGTTGATAGAGTCTATCATTCTGTTACATCAAATTTGA
CAAGAAACGGTTTGCTGACCTTTCCGGTACTGTATCACTTACCCGAGTTAACAGGAGGG
GAAGACCACCATCAAGACCTAAAGTTGGTAGTGGACCTCCTCCTCAGAGAATTCTCTAGA
AGGCCTCCATGGGGATCCGGTACCGAGCTCACGCGTCTCGAGGCCCGGGCATGTCCCGAA
GACATTAACACTACGGTTCTTTAAGTAATCCGTGTCTGAAGTTTTAGGTTCAATTTACACC
TACCAGATTGACATTCTCGACTGATCTTGATTGATCGGTAAGTCTTTTGTAATTTAATTT
TCTTTTTGATTTTATTTTAAATTTGTTATCTGTTTCTGTGTATAGACTGTT
```

>TRV-CTR1

```
TTATTGAACCTAAAACCTTCAGACACGGATCTACTTAAAGAACCAGTATTTAATGTCTTCG
GGACATGCCCGGGCCTCGAGACGCGTGAGCTCGGTACCGGATCCCCATGGAGGCCTTCTA
GAGAATTC AACCGCTTCATAATTGCAACTCCTCCTCAAAAATTCCTTGAGTCGCTCTGCAT
GAAAATCTTGTTCCATGAGGATCTTCACGGCAACATCAGAGCCATGCCAATCACCACGGT
GAACAGTACCAAAAGACCCTGCCCAATTTTCTCCATTAGAACCAGATCATTCCATGGAA
TATTGAACCTTCTACATCGAGATCAAGTTCTTCACTTGGTATAGCAGAAACAACATGAC
CTCCGTTAACTCGGGTAAGTGATACAGTAACCAGTAGGTCAGCAAACCGAGTTGTCAAAT
TTTTAGTAACAGAATGATAGACTCTATCAACGAGAGACAAATCAGTATAATTATGCTCTT
AATTAAGATAACTTAATTAACCTTAACACTTTCTCTAAAGATAGTGTGAAACCCAGAAC
AGATGCTCGTGCAGCGTGACCACAGGAATTAATTTCAATCGCTTCTTACAACGATAGAGAA
TATGGCTTCTCCCGCCCTGGTACTTTCAACCAGCCTTCAAACAGAATTTCTCATCAACC
AATCACAATAACCAACCGTAAACGATTGGACCGATTCTACTGGCGTCAACATAAGTATAT
AGTTGAGCACTAGATAGTGCTGCCCAAAGCATTCTACATGTGCCCCAATCGTCACTAAAT
ACTCCAGACTGACAGACGATCACCACATAGTCGTGATACTCGATGTAACCT
```

Continuação APÊNDICE 2. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor TRV2b com os diferentes insertos com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em cinza claro está a sequência de oligonucleotídeos para amplificação dos insertos e as regiões em cinza escuro indicam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI*, para clonagem no vetor TRV2b.

>TRV-ERF1

GGGGTCCCTCGTTGATAGAGTCTATCATTCTGTTACTACCCATTTGACAACCTCGGTTTGC  
TGACCTACTGGTTACTGTATCACTTACCCGAGTTAAACCGTCCGAGGAAGTGAAACTCGAG  
CCGAGGGAGGAGATTGAGCCAGCTATGAGTACTTCTGTTTCTCCGCCGACAGTGGCTCCA  
GCGGCTTTGCAGCCTAAAGGAAGGCATTACAGGGGCGTTAGACAAAGGCCATGGGGAAAA  
TTTGCAGCGGAAATAAGAGATCCGGCTAAAAACGGCGCACGGGTTTGGCTTGGAACTTAC  
GAGTCGGGAATTCCTCTAAAGGCCTCCATGGGGATCCGGTACCGAGCTCACGCGTCTCGAG  
GCCCGGGCATGTCCCGAAGACATTAACCTACGGTTCTTTAAGTAATCCGTGTCTGAGTTT  
TAGGTTCAATTTAAACCTACCA

>TRV-ETR1

CGGGTCTCTCGTTGAAAAATTCTATCATTCTGTTACTTTAAATTTGACAACCTCGGTTTG  
CTGACCTACTGGTTACTGTATCACTTACCCGAGTTAACTGCTGGCACTGGACTTGGCCTT  
GCAATTTGTAAGAGGTTTGTAAATCTTATGGAAGGACACATTTGGATTGAAAGTGAAGGT  
GTCGGGAAGGGTTCTACTGCTATCTTTATTGTTAAACTTGGCATTCCCTGGTCGCTTAAAT  
GAGTCAAAGCTTCCCTTTACGGCCGGATTGCCTGCAAAGAATTCCTCTAAAGGCCTCCATG  
GGGATCCGGTACCGAGCTCACGCGTCTCGAGGCCCGGGCATGTCCCGAAACATTAACCTA  
CGGTTCTTTAATAGATCCGTGTCTGAAGTTTTAGGTTCAATTTAAACCTACAATTGACAT  
TCTCACTGATCTTGATTGATC

>TRV-TSRF1

GGGGTCCCTCGTTGATAGAGTCTATCATTCTGTTACTCCCAAATTTGACAACCTCGGTTTG  
CTGACCTACTGGTTACTGTATCACTTACCCGAGTTAAACAAGGAGAAGTTCGTACCGAGGTG  
TTAGGAGGCGTCCATGGGGTAAATTCGCAGCGGAGATAAGAGATTCTACGAGAAATGGGG  
TTCGAGTATGGTTAGGGACATTTGATAGCGCGGAAGATGCTGCTTTAGCTTATGATCAAG  
CTGCGTTTTCAATGAGGGTAAATTCGCCATTTTGAATTTTCCAGTGGAGACCGTTGAAT  
TCTCTAGAAGGCCTCCATGGGGATCCGGTACCGAGCTCACGCGTCTCGAGGCCCGGGCAT  
GTCCCGAAGACATTAACCTACGGTTCTTTAATAATCCGTGTCTGAAGTTTTAGGTTCAAT  
TTAAACCTACGACATTGACATTC CGACTGATCTTGATTGATCGGAATCTTTTGAATTA

>TRV-EIN2

TTTTAAATTGAACCTAAAACCTCAGACACGGATCTACTTAAAGAACCGTAGTTTAAATGTCT  
TCGGGACATGCCCGGGCTCGAGACGCGTGAGCTCGGTACCGGATCCCATGGAGGCCTTC  
TAGAGAATTCAGAGCCCTAAGCCGATTCAAGTGCTCCTCTTTCATCTTGAAAGGAGCCTCG  
TTCAAATCCACTGTTGTCTCTGTGCATCAGCTATCTTCTTCTCATGCTAGCCAGGGGTA  
ATTCAGACGTGCCATCAACTTGTGCAGTTAACTCGGGTAAGTGATACAGTAACCAGTAGGT  
CAGCAAACCGAGTTGTCAAATTTTGTAGTAACAGAATGATAGACTCTATCAACGAGAGACAA  
ATCAGTATAATTATGCTCTTAATTAAGATAACTTAATTAACCTAACACTTTCTCTAAAGAT  
AGTGTGAAACCCCAAGACAAGATGCTCGTGCGACGTGACCACAGGAATTTATTTCAATCGCT  
TCCTACAACGATAGAGAATATGGCTTCTCCCGCCCTGGTACTTTCAACCAGCCTTCAAACA  
GAATTTCTCATCAACCAATCACAATAACCAACCGTAAACGATTGGACCGATTCTACTGGC  
GTCAACATAGGTATATAGTTGAGCACTAGATAGTGTGCCCCAAAGCATTCTACATGTCGCC  
CAATCGTCACTAAATACTCCAGACTGACAGACGATCACCACATAGTCGTGATACTCGATGT  
A

Continuação APÊNDICE 2. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor TRV2b com os diferentes insertos com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em cinza claro está a sequência de oligonucleotídeos para amplificação dos insertos e as regiões em cinza escuro indicam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI*, para clonagem no vetor TRV2b.

>TRV-ERF3

CTTTAATTGAACCTAAAACCTTCAGACACGGATCTCCTTAAAGAACCCTAGTTTAAATGTCTT  
CGCGGACATGCCCGGGCCTCGAGACGCGTGAGCTCGGTACCGGATCCCATGGAGGCCTTC  
TAGA GAATTC TTCCGGTGGAGGAAAGTTGAGATCCAGATTTAAACCGGCGGTGGTTGATTT  
CACGTCAACACGCATAAAATCAATTACCGTTGATGAATCAGAGTCACCACCACCGAGGTAA  
TCTACCGTTTTCTTCCGATTTGTTTCTAACTTTATAACTCCGGCGCGTGCAAGTGCTTCTA  
TATAGTACATATGATTCACCGCCTGTACCGAACC GG TAAAACCTCCACCGGAGCTCGGGAA  
CTTAACCGTATGATGATTA AACCCGCGGATTGATCCACAGAGACTTAGATCTAACGGCGAT  
GATGAGTTAACTCGGGTAAGTGATACAGTAACCAGTAGGTCAGCAAACCGAGTTGTCAAAT  
TTTTAGTAACAGAATGATAGACTCTATCAACGAGAGACAAATCAGTATAATTATGCTCTTA  
ATTAAGATAACTTAATTAACCTTAACACTTTCTCTAAAGATAGTGTGAAACCCAGAACAAG  
ATGCTCGTGCGACGTGACCACAGGAATTATTTCAATCGCTTCTTACAACGATAGAGAATAT  
GGCTTCTCCCGCCCTGGTACTTTCAACCAGCCTTCAAACAGAATTTCTCATCAACCAATC  
ACAATAACCAACCGTAAACGATTGGACCGATTCTACTGGCGTCAACATAGGTAT

>TRV-NIM1

TTTTAAATTGAACCTAAAACCTTCAGACACGGATCTACTTAAAGAACCCTAGTTTAAATGTCT  
TCGGGACATGCCCGGGCCTCGAGACGCGTGAGCTCGGTACCGGATCCCATGGAGGCCTTC  
TAGA GAATTCAGAGCCCTAAGCCGATTCAAGTGCTCCTCTTTCATCTTGAAAGGAGCCTCG  
TTCAAATCCACTGTTGTCTCTGTGCATCAGCTATCTTCTTCTCATGCTAGCCAGGGGTA  
ATTCAGACGTGCCATCAACTTGTGCAAGTTAACTCGGGTAAGTGATACAGTAACCAGTAGGT  
CAGCAAACCGAGTTGTCAAATTTTTAGTAACAGAATGATAGACTCTATCAACGAGAGACAA  
ATCAGTATAATTATGCTCTTAATTAAGATAACTTAATTAACCTTAACACTTTCTCTAAAGAT  
AGTGTGAAACCCAGAACAAGATGCTCGTGCGACGTGACCACAGGAATTATTTCAATCGCT  
TCTTACAACGATAGAGAATATGGCTTCTCCCGCCCTGGTACTTTCAACCAGCCTTCAAACA  
GAATTTCTCATCAACCAATCACAATAACCAACCGTAAACGATTGGACCGATTCTACTGGC  
GTCAACATAGGTATATAGTTGAGCACTAGATAGTGCTGCCCAAAGCATTCTACATGTCGCC  
CAATCGTCACTAAATACTCCAGACTGACAGACGATCACCACATAGTCGTGATACTCGATGT  
A

>TRV-MPK1

AAGGTCTCTCGTTGAAAGAGTCTATCATTCTGTTACATCAAATTTGAAAAAACGGTTTG  
CTGACCTTTCCGGTACTGTATCACTTACCCGAGTTAACCAAATC GAATTCAGTCTAAA  
ATAAAATCCACCCATAAAGATACATCAAACAACCTCTCCATACATAAGTCAGCTTCATAA  
CTAAGTGTGTCATAAGAACTCATCCATGTTCCCGGACGGAATGCACACATATATACAT  
GGGGAGATATATTGTCAGTTACACATAACATGTAGATCAAACCTGCAACAATCTGGTTAA  
CCAAATCGAATTTCTTAGAAGGCCTCCATGGGGATCCGGTACCGAGCTCACGCGTCTCGA  
GGCCCGGCATGTCCCGAAGACATTAACCTACGGTTCTTTAAGTAGATCCGTGTCTGAAG  
TTTTAGGTTCAATTTAAACCTACGAGATTGACATTCTCGACTGATCTTGATTGATCGGTA  
AGTCTTTTGTAATTTAATTTCTTTTTGATTTTATTTTAAATTGTTATCTGTTTCTGTGT  
ATAGACTGTTTGAGATCGGCGTTTGGCCGACTCATTGTCTTACCATAGGGGGAACGGACT  
TTGTTTGTGTTGTTATTTTATTTGTATTTTATTAAATTCTCAACGA