

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

**RESISTÊNCIA INDUZIDA POR *Trichoderma harzianum* EM RESPOSTA A
Alternaria alternata EM TOMATEIRO**

Gustavo Borges Meirelles
Biólogo/ULBRA

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil,
Setembro de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Borges Meirelles, Gustavo
Resistência induzida por *Trichoderma harzianum* em
resposta a *Alternaria alternata* em tomateiro /
Gustavo Borges Meirelles. -- 2014.
79 f.

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2014.

1. Indução de resistência. 2. *Trichoderma*
harzianum. 3. *Alternaria Alternata*. 4. Tomate. 5.
Fitormônios . I. Gravina de Moraes, Marcelo, orient.
II. Título.

GUSTAVO BORGES MEIRELLES
Biólogo - ULBRA

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 24.04.2014
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 22.09.2015
Por

MARCELO GRAVINA DE MORAES
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

ROBERTO LANNA FILHO
PPG Fitotecnia

ISABEL CRISTINA PADULA PAZ
ICB BIOAGRITEC Ltda.

ANDRÉIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA
FEPAGRO

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

Dedico

*Esta página é dedicada primeiramente
A deus que me deu dificuldades para superar e assim me fortalecer.
Aos meus pais, Emilio e Rosilene.
A minha irmã, Camila.
Obrigado por todos momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos,
pelo amor, pela honestidade, pelo afeto, pela amizade.*

AGRADECIMENTO

Agradeço ao meu orientador, professor Marcelo Gravina de Moraes, pela oportunidade de fazer parte do Departamento de Fitossanidade da UFRGS, que engloba diferentes especialidades: Entomologia, Fitopatologia, Apicultura, Biotecnologia e Manejo e Conservação de Grãos. Agradeço pela confiança e o apoio ao longo destes anos.

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo meu apoio recebido durante o meu período no Departamento de Fitossanidade/UFRGS.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular, pelo trabalho em equipe, pela paciência e carinho, mas principalmente pela amizade; aos meus queridos amigos e estagiários e bolsistas do nível de graduação: Gabriel Barreto Pinto, Lourenço D`Almeida, Ricardo Rambor, Jonathas Johnson, Rafaela Gomes, Pedro Henrique Mari Velho, Aline procedi, Fabricio Musa, Juliana Saraiva, Joana Paolazzi, Suellen Godoy, Jhonatan Alves, Margarete Garcia, Daniela Ribeiro e Arthur Prates e a nível de pós-graduação: Fernanda Nichele, Julie Zanin, Ana Paula Trivilin, Guilherme Duarte e a Sara Hartke, muito obrigado pelo carinho, Amizade, e ajuda durante todos esses anos, pelas conversas, pelos desabafos, muitos cafés e bolos saborosos, enfim, por tornaram a execução deste trabalho mais divertida; agradeço também aos demais colegas e amigos do Departamento de Fitossanidade.

Agradeço a Empresa ICB BIOAGRITEC Ltda.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade.

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

E principalmente a amigos de infância, em que uma brincadeira de criança nos conhecemos, e dessa brincadeira nasceu a verdadeira amizade.

Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência.

RESISTÊNCIA INDUZIDA POR *Trichoderma harzianum* EM RESPOSTA A *Alternaria alternata* EM TOMATEIRO¹

Aluno: Gustavo Borges Meirelles
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

Trichoderma spp. são fungos benéficos que após interagir com as raízes melhora o vigor das plantas. *Trichoderma* spp. produzem uma variedade de MAMPs (Padrões Moleculares Associados a Micro-organismos) que estimulam a indução de resistência (IR) em plantas. A IR por *Trichoderma* spp. pode aumentar a resistência contra patógenos através das respostas mediadas por ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (JA), etileno (ET). Estas respostas reguladas são antagônicas entre as diferentes vias de sinalização de defesa relacionadas à JA/ ET e AS, sensibilizando a planta para uma resistência melhorada contra patógenos. Neste estudo utilizamos um sistema entre três componentes *Solanum lycopersicum*, *Trichoderma harzianum* e *Alternaria alternata*. A sinalização molecular envolvido durante a supressão da doença por *T. harzianum* foi analisado nas plantas de tomate cv. Micro-Tom subsequente à infecção por *A. alternata*. As vias de sinalização de AS, JA e ET foram exploradas durante IR por *T. harzianum*. À aplicação dos esporos de *T. harzianum* nas raízes das plantas de tomate aumentou a resistência contra *A. alternata* causador da mancha foliar da cultura. O intervalo de 15 dias entre a aplicação de *T. harzianum* e de *A. alternata* foi suficiente para suprimir os sintomas causados por *A. alternata* no tomate. A severidade da doença foi estimada 96 horas após inoculação do patógeno desafiante. A quantificação do DNA por qPCR foi utilizado para verificar as diferenças da biomassa do patógeno. O resultado obtido da quantidade de DNA de *A. alternata* foi 74 vezes menor nas plantas previamente tratadas com *T. harzianum* isolado Th1 em comparação com as plantas não tratadas com Th 1. O tratamento com os hormônios etileno e metil jasmonato indicou que as vias do JA e ET estão parcialmente relacionadas com a suscetibilidade à *A. alternata* em plantas de tomate. Foi avaliado o fenótipo de IR de plantas de tomate silenciadas para o gene de fator de resposta de ET. A análise do desenvolvimento dos sintomas demonstrou que a IR por *T. harzianum* não envolveu a resposta do ET. Finalmente, análise da expressão gênica indica que a resistência induzida por *T. harzianum* é controlada pelo aumento da biossíntese do JA combinado com a diminuição da sinalização de resposta do AS e ET.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (p.66) Setembro, 2014.

RESISTANCE INDUCED BY *Trichoderma harzianum* IN RESPONSE *Alternaria alternata* IN TOMATO¹

Author: Gustavo Borges Meirelles
Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Trichoderma spp. are beneficial fungi that after interacting with the roots improves plant health. *Trichoderma* spp. produce a variety of MAMPs (Associated Molecular Patterns Micro-organisms) that stimulate the induction of resistance (IR) in plants. The IR by *Trichoderma* spp. can increase resistance against pathogens mediated through salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), ethylene (ET) responses. These responses regulated are antagonistic between different defense signaling pathways related to JA/ET and AS, sensitizing the plant for enhanced resistance against pathogens. In this study we used a system of three components *Solanum lycopersicum*, *Trichoderma harzianum* and *Alternaria alternata*. The molecular signaling involved during disease suppression by *T. harzianum* was analyzed in tomato plants cv. Micro-Tom subsequent to infection by *A. alternata*. The signaling pathways of SA, JA and ET have been explored for IR *T. harzianum*. In the application of spores of *T. harzianum* in the roots of tomato plants increased resistance against *A. alternata* causing leaf spot of culture. The 15 day interval between application of *T. harzianum* and *A. alternata* was sufficient to suppress symptoms caused by *A. alternata* in tomato. The effect of IR elicited by *T. harzianum* was from his association with the roots of tomato for 15 days. Disease severity was estimated 96 hours after inoculation the challenge pathogen. DNA quantification by qPCR was used to determine differences in biomass of the pathogen. The result of the amount of DNA of *A. alternata* was 74 times lower in treated plants *T. harzianum* isolated Th1 compared with plants not treated with Th 1. Treatment with ethylene and methyl jasmonate indicated that the hormones JA and ET pathways are partially related to susceptibility to *A. alternata* in tomato plants. IR phenotype of tomato plants silenced for gene ET response factor was evaluated. The analysis of the development of symptoms demonstrated that IR by *T. harzianum* did not involve the response of ET. Finally, gene expression analysis indicates that IR by *T. harzianum* is controlled by increasing the biosynthesis of JA combined with the decrease in the response signaling SA and ET.

¹ Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (p.66) September, 2014.

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 O sistema imune vegetal	5
2.2 Sinalização das respostas de defesa da planta	8
2.3 <i>Trichoderma</i> spp	12
2.4 <i>Trichoderma</i> spp. e a sinalização de defesa	15
2.5 Interação planta - <i>A. alternata</i>	18
2.6 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Cultivo das plantas de tomate	23
3.2 Isolados e preparação do inóculo	23
3.3 Tratamentos e inoculação	25
3.4 Isolamento de RNA total e tratamento com DNase	27
3.5 Síntese de cDNA	27
3.6 Análise de expressão gênica por RT-qPCR	28
3.7 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)	30
3.8 Extração do DNA e quantificação do patógeno por qPCR	31
3.9 Análise estatística	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Supressão dos sintomas causados por <i>Alternaria alternata</i> em tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) por <i>Trichoderma harzianum</i>	35
4.2 Quantificação do patógeno por qPCR	38
4.3 Efeito da aplicação exógenos de MeJA e etileno no desenvolvimento dos sintomas causados por <i>A. alternata</i>	40
4.4 Silenciamento do gene ERF1 em tomate	42
4.5 Expressão de genes envolvidos na defesa	44
5 CONCLUSÕES GERAIS	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Escala de sintomas em tomate cv. Micro-Tom.....	26
2. A sequência de iniciadores utilizados na análise de genes	29
3. Análise de expressão das PR1-1 <i>a</i> e PR5 em folhas de tomate em plantas previamente tratadas com <i>T. harzianum</i> 1 (15 dpi) e após desafiadas com <i>A. alternata</i> (48 hpi).....	46

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Efeito dos tratamentos com os diferentes isolados de <i>T. harzianum</i> na supressão dos sintomas contra <i>A. alternaria</i> em tomate cv. Micro-Tom	36
2. Fenótipo da indução de resistência por <i>T. harzianum</i> 1 contra <i>A. alternaria</i> em tomate cv. Micro-Tom	38
3. Quantificação do DNA de <i>A. alternata</i> nas folhas de tomate cv. Micro-Tom durante a ISR	39
4. Severidade da mancha de alternária em plantas de tomate cv. Micro-Tom sob efeito do tratamento com etileno e MeJA	41
5. Efeito da IR em plantas de tomate cv. Micro-Tom agroinfiltradas com TRV- ERF1	44
6. Análise de expressão de genes por RT-qPCR na interação: plantas tratadas com <i>T. harzianum</i> 1 vs. plantas controle	48
7. Análise de expressão de genes por RT-qPCR na interação: plantas inoculadas com <i>A. alternata</i> vs. plantas controle	50
8. Análise de expressão de genes por RT-qPCR na interação: plantas tratadas com <i>T. harzianum</i> 1 e inoculadas com <i>A. alternata</i> vs. plantas inoculadas com <i>A. alternata</i> controle	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AAL – Toxina *A. alternata* f. sp. *lycopersici*

ABA – Ácido abscísico

ACC – Acetil-CoA carboxilase

ACCD – Acetil-CoA carboxilase deaminase

Alt – *Alternaria alternata*

ANOVA – Análise de variância

AP2/EREBP – Apetala2/ Proteína de ligação responsiva ao etileno

AS – Ácido salicílico

Asc – Locus de resistência ao cancro da haste

AtPeps – Peptídeos em *Arabidopsis thaliana*

AVR – Proteínas de avirulência

Avr-R – Proteínas de avirulência/ Proteínas de Resistência

BDA – Meio de cultura Batata-Dextrose-Agar

cDNA – DNA complementar ao mRNA

Ct – Ciclo limiar

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

CTR – Resposta tripla constitutiva

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos

DEF – Defensinas

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNase – Deoxyribonuclease

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos tri-fosfato

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EIL – Similar ao EIN

EIN – Insensitivo ao etileno

ERF – Fatores de resposta ao etileno

ERS – Sensor de resposta ao etileno

ET – Etileno

ETI – Imunidade desencadeada pelos efetores

ETR – Receptor do etileno

ETS – Suscetibilidade desencadeada por efetores

EUA – Estados Unidos da América

F-Box COI1 – Coronatina insensível

GA – Ácido giberélico

GFP – Proteína verde fluorescente

HR – Resposta de hipersensibilidade

HST – Toxina seletiva ao hospedeiro

IAA – Auxina

IR – Indução de resistência

ISR – Resistência sistêmica induzida

JA – Ácido jasmônico

JAI – Insensitivo jasmonato

JA-Ile – Jasmonato isoleucina

JAZ – Domínio jasmonato ZIM

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

LOX – Lipoxigenase

MAMPs – Padrões moleculares associados a microrganismos

MeJA – Metil jasmonato

MPK – Quinase ativada por mitógenos

mRNA – RNA mensageiro

MTI – Imunidade desencadeada por MAMPs

MYC – Hélice-laço-hélice básica proteína zíper de leucina

NahG – Salicilato hidroxilase

NCBI – Centro Nacional de Informações Biotecnológica

NIM – Não imune

NIMIN – Proteína que interagem com NIM

NPR – Não expressor de genes PR

Oligo (dt) – Sequências curtas de nucleotídeos desoxi-timina

PAMPs – Padrões moleculares associados ao patógeno

pb – Pares de bases

PCD – Morte celular programada

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDF – Proteína defensina

PEPR – Receptores de peptídeos

pGEM-T – Vetor de clonagem

pH – Potencial hidrogeniônico

PR – Proteínas relacionadas à patogênese

PROPEP – Proteína precursora de peptídeos

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões

PTGS – Silenciamento gênico pós-transcrição

PTI – Imunidade desencadeada pelas PAMPs

qPCR – PCR quantitativo

R – Proteínas de resistência

RNA – Ácido ribonucleico

RNase – Ribonuclease

ROS – Espécie de oxigênio reativa

RPCPs – Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas

RT – Transcriptase reversa

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

SAR – Resistência sistêmica adquirida

SCF^{coi1} – Ubiquitina ligase E3

SDS – Dodecil sulfato de sódio

STS – Tiosulfato de prata

Taq – DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

Th – *Trichoderma harzianum*

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

TRV – Vírus Pedicular do Tabaco

UBI3 – E3 Proteína- ubiquitina

v:v – Volume por volume

VIGS – Silenciamento gênico induzido por vírus

VSP – Proteína de armazenamento vegetativo

1 INTRODUÇÃO

A maioria das *Alternaria* spp. são saprófitas e geralmente são encontradas em solos ou em tecidos vegetais em decomposição. Algumas espécies do gênero *Alternaria* são um grupo altamente bem sucedido de patógenos fúngicos que causam doenças em uma grande variedade de culturas economicamente importantes, incluindo maçã, brócolis, cenoura, citrus, couve-flor, pera, arroz, morango, tomate, batata e tabaco, além de determinadas espécies de plantas ornamentais e plantas daninhas. Devido a sua ampla gama de hospedeiro e distribuição no mundo, as *Alternaria* spp. têm sido relatadas causando doenças em 400 espécies de plantas; isoladamente *Alternaria alternata* pode infectar mais de 100 espécies de plantas (Chung, 2012). O patógeno é responsável por diferentes doenças em tomate, tais como: cancro da haste, pinta-preta, podridão-escura e mancha-foliar. *A. alternata* não só infectam a cultura de tomate em condições de campo, mas também causa perdas consideráveis durante o armazenamento do fruto (Grogam *et al.*, 1975). Infecções latentes podem ocorrer e resultar em doenças pós-colheita ou tombamento de mudas em caso de sementes infectadas (Thomma, 2003). Os patótipos de *A. alternata* produzem fitotoxinas seletivas ao hospedeiro (HSTs) que atuam como moléculas efetoras que são essenciais para a patogênese/virulência necrotrófica. Na interação com plantas de tomate o patótipo de *A. alternata* f. sp. *lycopersici* produz a toxina AAL, capaz de induzir morte celular em cultivares suscetíveis (Tsuge *et al.*, 2012).

A cultura do tomate destaca-se por apresentar um amplo histórico de problemas fitossanitários, de modo geral as doenças do tomate são responsáveis por perdas significativas na produção. Dentre as principais doenças a mancha de alternária é uma das doenças foliar mais frequente e importante da cultura do tomateiro no Brasil, e pode ser causada pelos fungos do gênero *Alternaria* entre eles *Alternaria solani* (Song *et al.*, 2011; Fontenelle *et al.*, 2011) e *A. alternata* (Jia *et al.*, 2013; Prasad & Upadhyay, 2010; Ahmad *et al.*, 2012). *A. alternata* é um patógeno de pré e pós-colheita das culturas de tomate, por isso é importante controlá-lo por meio de técnicas eficazes, econômicas e menos agressivas ao meio ambiente. A fim de evitar essas doenças, a utilização de agentes de controle biológico no solo é uma alternativa em relação às práticas convencionais de manejo. As espécies do gênero *Trichoderma*, compreende um grande número de linhagens fúngicas que atua como agentes de biocontrole. O uso de biopesticidas são produtos disponíveis no mercado e a maioria dos quais são baseados nos micro-organismos benéficos do gênero *Trichoderma* (Woo *et al.*, 2006). Portanto muitas espécies desse gênero tem o potencial de tornarem-se produtos comerciais à base de agentes de biocontrole.

A indução de resistência (IR) em plantas é um processo fisiológico que aumenta a capacidade defensiva provocada por estímulos específicos. As plantas podem desenvolver IR como resultado de uma infecção por um agente patogênico, em resposta a inseto, após a colonização das raízes por específicos micróbios benéficos e após tratamentos com produtos químicos específicos. Nos últimos anos tem aumentado o interesse da IR a doenças em plantas baseado em duas formas conhecidas como resistência sistêmica induzida-ISR, e a resistência sistêmica adquirida-SAR. A SAR e a ISR, podem ser induzidas pela simbiose entre as raízes de plantas e *Trichoderma* spp. (Harman *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2012).

A IR é provavelmente resultado da regulação de uma rede de vias de sinalizações interligadas em que hormônios vegetais desempenham um importante papel. As vias de sinalização podem ser alteradas após a colonização por *Trichoderma* spp., induzindo respostas de defesa mais rápidas e mais eficientes a infecções por patógenos (Martínez-Medina *et al.*, 2013). Em paralelo, tem-se verificado que os patógenos desenvolveram mecanismos moleculares sofisticados para alterar a biossíntese hormonal e/ou para interferir com as redes de sinalização hormonais, sendo capaz de “desativar” as respostas de defesa (Jones & Dangl, 2006). Em geral, o equilíbrio entre os hormônios relacionado com a defesa tem um impacto sobre o desenvolvimento e crescimento das plantas e é determinante para resistência contra patógenos (Hermosa *et al.*, 2013). A IR é modulada por redes de sinalização em que os hormônios vegetais, incluindo ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), os quais desempenham um papel crítico para a resistência. Por outro lado, diferentes patógenos estimulam as respostas de defesa mediadas por ET, JA e AS a fim de facilitar o processo de colonização no hospedeiro. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares e genéticos que regulam a resistência mediada por hormônios é necessário para a manipulação das vias de sinalização hormonal na resistência das culturas contra diferentes patógenos. A fim de caracterizar o tipo de sinalização comprometido na expressão da IR à *A. alternata* desencadeada por *Trichoderma harzianum*. Neste estudo foi realizada a análise da expressão de genes relacionados às diferentes vias de sinalização de defesa para identificar componentes ou mecanismo moleculares envolvidos na IR por *T. harzianum* em resposta a *A. alternata* em tomateiro.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Identificar mecanismos envolvidos na sinalização da resistência induzida por *Trichoderma harzianum* contra o patógeno necrotrófico *Alternaria alternata* em tomate.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a habilidade de 5 isolados de *T. harzianum* em induzir a indução de resistência contra o patógeno necrotrófico *A. alternata* em tomate;
- Avaliar o fenótipo de IR em plantas de tomate silenciadas para o gene de fator de resposta a etileno 1 (ERF1);
- Analisar a expressão de genes envolvidos na defesa após a indução de resistência à *A. alternata* por *T. harzianum*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O sistema imune vegetal

O sistema imune inato vegetal é uma forma primitiva de defesa, incluindo mecanismos constitutivos e induzidos. Um dos efeitos dessas defesas é de promover uma barreira física, como exemplo, a formação de cutícula que dificulta a penetração do patógeno no hospedeiro. Em nível celular as paredes formam barreiras fortes e flexíveis, que consistem principalmente de fibras de celulose, mas também de glucanos, pectinas, calose, cutina, lignina, suberina e ceras que podem ser incorporada para a estabilização (Garcin *et al.*, 2007). Além da barreira física, a defesa contra patógenos envolve ativação de respostas de defesa que incluem a reação de hipersensibilidade (HR), deposição de calose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), espessamento das paredes das células, produção de proteínas antifúngicas, e os fitormônios AS, ET, JA e ácido abscísico (ABA). Estas são típicas respostas de defesa que desempenham importante papel na regulação da resistência contra patógenos (Jones & Dangl, 2006).

Quando uma planta detecta a invasão de um patógeno, mecanismos de defesa locais são rapidamente ativados. O modelo “zig-zag” proposto por Jones & Dangl (2006) demonstra a existência de duas linhas de defesa. A primeira linha envolve a capacidade da planta de reconhecer uma grande variedade de Padrões Moleculares Associados a Micro-organismos (MAMPs), como flagelina, quitina, glicoproteínas e

lipopolissacarídeos, por receptores da membrana plasmática da célula vegetal, denominados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Pieterse *et al.*, 2012). Este reconhecimento ativa a imunidade de defesa desencadeada por MAMPs (MTI) ou defesa basal não específica (Jones & Dangl, 2006; Spoel & Dong, 2012). Além das MAMPs, as PRRs também reconhecem moléculas endógenas denominadas padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que também leva a ativação de respostas imunes (Liu *et al.*, 2013).

A segunda diz a respeito aos receptores intracelulares, conhecidos como proteínas de resistência (R), receptoras de moléculas efetoras dos patógenos. Os efetores são definidos como proteínas de virulência introduzidos nas células hospedeiras através de patógenos para suprimir as respostas de defesa do hospedeiro e causar doença (Fu & Dong, 2013), todavia podem desencadear respostas de defesa em função do reconhecimento por proteínas R. Os patógenos são capazes de superar as defesas das plantas utilizando moléculas efetoras que suprimam a PTI, resultando em uma suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (Pieterse *et al.*, 2009).

Em contrapartida as plantas respondem com receptores especializados para detectar sinais de efetores, resultando na imunidade desencadeada por efetores (ETI). Uma característica específica da ETI, ou interação gene-a-gene é a indução da HR, que provoca à morte celular programada (PCD) impedindo o crescimento de patógenos no início da infecção (Jones & Dangl, 2006; Spoel & Dong, 2012). Este efeito é mediado pela produção de moléculas antimicrobianas, indução de genes responsivos de defesa, deposição de calose, produção de ROS em torno dos tecidos infectados, o que leva a resistência local ao patógeno invasor (Schneider & Collmer, 2010; Spoel & Dong, 2012). Adicionalmente, desencadeia a sinalização de defesas pelos hormônios AS, ET e JA, (Pieterse *et al.*, 2012), dependendo do tipo do agente

patogênico que infecta a planta (Pieterse *et al.*, 2009). Outros hormônios vegetais, por exemplo, ABA, citocininas, também atuam na defesa da planta e podem, ainda que parcialmente, alterar a sinalização por AS, JA ou ET (Pieterse *et al.*, 2012).

O contato com microrganismos patogênicos ou não patogênicos desencadeiam uma grande variedade de mecanismos de defesa nas plantas. Dois mecanismos são particularmente descritos, a SAR que é induzida após a infecção por patógenos, e a ISR que é desencadeada por micro-organismos benéficos. Além da ETI e PTI, a infecção de patógenos também ativa a SAR, que é dependente das vias de sinalização reguladas por AS mediada pela proteína reguladora NPR1 (*NONEXPRESSOR OF PR GENES*) que estimula a expressão das proteínas relacionadas à patogênese (PRs). Ao contrário de SAR, a ISR é independente de AS, mas requer componentes das vias de sinalização do JA e ET (Van loon *et al.*, 2006; Shores *et al.*, 2010;). Embora haja exceções, patógenos biotróficos são geralmente sensíveis a respostas de defesa reguladas por AS, que é necessário tanto para a resistência local como para SAR. Por outro lado, agentes patogênicos com hábitos necrotróficos estimulam as defesas desencadeadas por JA e ET durante a ISR.

Uma das características comum das respostas da resistência induzida por micro-organismos benéficos é o *priming*. Esta é uma condição na qual as plantas tratadas com o eliciador tornam-se preparado a ativar as respostas de defesa mais rapidamente, mais fortemente, ou ambos, quando expostos ao ataque de patógenos em comparação com as plantas não tratadas (Conrath, 2011). O efeito do *priming* pode ser alcançado tanto por micro-organismos benéficos, ou por tratamento de plantas com vários compostos naturais e sintéticos (Beckers & Conrath, 2007). O *priming* é uma alternativa a ativação da resistência induzida de longa duração, pois atenua os mecanismos de resistência através da modulação da “memória

imunológica” das plantas (Conrath, 2011). Visto que os recursos para a defesa não estão comprometidos até que a ameaça de nova infecção retorne, o *priming* é considerado um mecanismo de “custo” relativamente baixo no avanço para a defesa da planta (Conrath, 2011; Holeski *et al.*, 2012). O controle genético do *priming* mostra semelhanças com os mecanismos genéticos que regulam a indução de defesa transgeracional em plantas, tais como SAR dependente de AS e herança da defesa dependente de JA (Holeski *et al.*, 2012). O *priming* pode ser considerado uma solução da planta para o problema representado pelo benefício proporcionado pelas respostas de defesa na proteção contra doenças e o custo envolvidos na ativação da defesa (Hermosa *et al.*, 2013).

2.2 Sinalização das respostas de defesa da planta

A sinalização por AS está associada com a resistência contra patógenos biotróficos, enquanto uma combinação de JA e ET desencadeiam a resistência contra patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005). Porém, diversas exceções para esta regra em geral, tem sido descritas, e desse modo, a via de AS também é necessária para a resistência das plantas contra patógenos necrotróficos, enquanto que as vias de ET, JA foram encontradas como sendo essenciais para a resistência a patógenos biotróficos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Considerando essas exceções, as vias de sinalização de AS, JA e ET são geralmente antagônicas e, portanto, a ativação da resistência a um patógeno biotrófico está frequentemente associada com o aumento da suscetibilidade a patógenos necrotróficos. Em contrapartida, a ativação da resistência a patógenos necrotróficos está relacionada com a maior suscetibilidade contra patógenos biotróficos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Os hormônios de defesa, como AS, JA, ET, auxina (IAA) e ABA estão envolvidos na modulação das vias de sinalização de defesa e nas interações planta-patógeno (Pieterse *et al.*, 2012). Alterações nas concentrações hormonais ou na sensibilidade desencadeada durante as interações com patógenos desencadeiam toda a gama de respostas das plantas, muitas vezes à custa do crescimento e desenvolvimento. A composição hormonal pode determinar se os tecidos das plantas irão tornar-se mais sensíveis ou mais resistentes a patógenos.

AS está associado com a indução da HR, que limita a invasão de patógenos biotróficos produzindo localmente a PCD em torno da área infectada. A HR é efetiva nas respostas de defesa contra biotróficos que derivam de nutrientes dos tecidos vivos do hospedeiro, mas não contra patógenos necrotróficos já que se beneficiam da morte da célula hospedeira (Glazebrook, 2005). A sinalização que sucede AS é em grande parte controlada pela proteína regulatória NPR1 (também conhecida como NIM1). Após a ativação por AS, NPR1 atua como coativador transcricional de um grande conjunto de genes relacionados com a defesa. NPR1 e seus parálogos, NPR3 e NPR4, são receptores de AS (Fu *et al.*, 2012). NPR1 localiza-se no citosol como um oligômero, e na presença do AS, ocorrem alterações no potencial redox o que leva a dissociação do complexo NPR1, o qual se desloca para dentro do núcleo e interage com os fatores de transcrição TGA para regular a expressão de vários genes PRs (Durant & Dong, 2004; Fu *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2012), alguns dos quais tem direta atividade antimicrobiana (Conrath *et al.*, 2002). Além de interagir com TGA, NPR1 interage com o grupo de pequenas proteínas NIMIN (*NIMI-INTERAGEM*). A proteína NIMIN possui sinais de localização celular, e assim, direciona NPR1 no núcleo. NPR1 interage fisicamente com TGA e NIMIN; TGAs principalmente ativam a expressão do gene NPR1, enquanto que NIMIN reprime a

expressão de NPR1. NIMIN inibe a atividade promotora de prováveis genes através da interação com TGAs (Pieterse *et al.*, 2012). Em *Arabidopsis* foi verificado que as proteínas NIMIN são reguladoras de resposta de SAR. Foi proposto que NIMIN atua de forma contínua, na qual é regulada por AS e afeta a proteína sensora NPR1 em distintos estágios da SAR, permitindo assim que as plantas controlem estritamente a ativação de genes de defesa em tecidos locais e distais da entrada do patógeno depois de desencadeada a ETI (Hermann *et al.*, 2013).

ET é um hormônio gasoso que está envolvido na regulação de muitos processos fisiológicos das plantas, como senescência das folhas, flores e maturação do fruto (Van loon *et al.*, 2006). ET é um dos principais constituintes da sinalização de defesa associado ao balanço hormonal vegetal que são produzidos durante muitas interações planta-patógeno e funciona como modulador de imunidade da planta (Broekaert *et al.*, 2006; Van Loon *et al.*, 2006). ET é percebido por receptores associados à membrana, localizados no retículo endoplasmático, incluindo ETR1/ETR2 (*ET RECEPTOR*), ERS 1 e 2 (*ET-RESPONSE SENSOR*) e EIN (*ET RESPONSE*), os quais atuam como reguladores positivos da sinalização do ET. Os receptores do ET interagem com CTR1 (*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*) um regulador negativo da via. CTR1 desreprime EIN2 levando à ativação dos fatores de transcrição EIN3 e EIL (*EIN3-LIKE*). EIN3 é um fator de transcrição de curta duração, e esta relacionada com o outro fator de transcrição o EIL, o qual desempenha um papel fundamental na via de defesa pela regulação da expressão dos genes ERF (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) como ERF1 (Broekaert *et al.*, 2006). O gene ERF1 codificam AP2/EREBP (*ET-RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN*), que pertence a um grupo de fatores de transcrição envolvidos na defesa das plantas contra patógenos necrotroficos. Eles fazem partes das sinalizações de JA

e ET e da regulação da expressão das PRs incluindo osmotina, quitinase e β -1,3-glucanase (Licausi *et al.*, 2013). Ou seja, a expressão de ERF1 é induzida por ET e JA e pode ser ativada de forma sinérgica por ambos os hormônios (Pieterse *et al.*, 2009), indicando que as duas vias de sinalização hormonal são requeridas simultaneamente para a ativação das respostas de defesa da planta.

JAs são moléculas sinalizadoras derivadas de lipídios que regulam diversos processos de desenvolvimento (Lyons *et al.*, 2013), amadurecimento dos frutos, crescimento das plantas e senescência (Wasternack, 2007), bem como respostas adaptativas ao estresse biótico e abiótico em plantas (Lyons *et al.*, 2013). JA tem um papel crítico na resposta de defesa contra herbívoros e injúrias mecânicas, bactérias e a infecção de fungos patogênicos (Wasternack, 2007). A sinalização de JA é mediada pelo complexo SCF^{coi1} (*E3-UBIQUITIN-LIGASE*) e proteínas JAZ (*JASMONATO ZIM-DOMAIN*) formando um complexo que reprime a expressão de genes responsivos ao JA. Após a acumulação de JA, JA-ILE (*JAI-SOLEUCINA*) liga-se a proteína F-Box COI1 (*CORONATINE-INSENSITIVE1*) que faz parte do complexo SCF^{coi1}. Isso ocorre após as proteínas JAZ serem ubiquitinizadas e subsequentemente degradadas no proteossoma (Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012; Dundler, 2013). O proteossoma na planta está envolvido em muitos processos celulares, incluindo sinalização hormonal e nas respostas de defesa do hospedeiro contra ataque de patógenos (Dundler, 2013). A degradação de JAZ resulta na ativação de genes responsivos ao JA através dos fatores de transcrição como MYC2 (*BASIC HELIX-LOOP-HELIX LEUCINE ZIPPER PROTEINS*) (Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012). Após a indução da via do JA, MYC regula diferencialmente duas classes de genes responsivos ao JA. MYC atua como um regulador positivo dos genes VSP2 (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2*) e LOX (*LIPOXYGENASE*), enquanto age

como regulador negativo dos genes PDF1.2 (*ET-AND JA-RESPONSIVE PLANT DEFENSIN*) que são ativados por ERF1 (Pieterse *et al.*, 2009).

Recentemente foi identificado SIPROPEP, um ortólogo AtPROPEP em tomate. O mesmo tem um importante papel na amplificação das respostas de resistência a *P. dissocotum* em tomate (Trivilin *et al.*, 2014). Os membros da família PROPEP são induzidos por hormônios de defesa JA, ET e AS, ou na resposta a PAMPs, e estes são considerados amplificadores de sinais de perigo durante a infecção por patógenos (Liu *et al.*, 2013). A família de peptídeos endógenos elicitores, chamados de AtPeps em *Arabidopsis thaliana*, bem como seus respectivos receptores de membrana PEPR1 e PEPR2 são induzidos após ferimentos, estresse biótico, bem como a aplicação de JA. Peptídeos endógenos derivados de genes PROPEP são transportados para o apoplasto, onde eles interagem com os receptores PEPRs da superfície celular e desencadeiam respostas imunes. Esses peptídeos induzem a expressão de genes PDF1, PR1 e PROPEP durante a interação com PEPRs (Huffaker & Ryan 2007). É possível que os peptídeos SIPep derivados da proteína precursora PROPEP1, atuem como amplificadores de ambas as vias JA/ET e AS. Eles podem desempenhar um papel na sinalização sistêmica em tomate, tanto para amplificar a sinalização de defesa, quanto manter os níveis de JA e AS durante a sinalização de defesa local e sistêmica contra patógenos.

2.3 *Trichoderma* spp.

Trichoderma é um gênero pertencente aos fungos ascomicetos, apresenta reprodução assexuada por meio da produção e germinação de conídios. Em algumas espécies de *Trichoderma* a fase sexuada teleomórfica (*Hypocrea* spp.) tem sido identificada, porém a denominação da fase anamórfica *Trichoderma* spp. é a

nomenclatura mais utilizada (Harman *et al.*, 2004). Algumas linhagens de *Trichoderma* spp. colonizam os espaços intercelulares da epiderme da raiz (Samolski *et al.*, 2012). Tem sido demonstrado que a sacarose derivada das plantas é importante fontes nutricionais para os processos de infecção e colonização por *Trichoderma* spp. nas raízes (Vargas *et al.*, 2009). A colonização envolve a capacidade de reconhecer e aderir às raízes, penetrar nas plantas e resistir aos metabólitos tóxicos produzidos em resposta à invasão (Hermosa *et al.*, 2012). Para *Trichoderma* spp., a aderência na superfície da raiz pode ser mediada por hidrofobinas, que são pequenas proteínas hidrofóbicas da camada mais externa da parede celular que reveste a superfície da célula do fungo e proteínas expansinas relacionadas ao desenvolvimento da parede celular (Nawrocka & Małolepsza 2013).

De modo geral, os agentes de biocontrole promovem efeitos positivos nas plantas que incluem a tolerância aos estresses fisiológicos de sementes e estresses abióticos. Além disso, podem melhorar a eficiência fotossintética, especialmente em plantas expostas a vários estresses. Finalmente os fungos utilizados como agentes de biocontrole também podem aumentar a eficiência do uso de nitrogênio em plantas (Shoresh *et al.*, 2010). *Trichoderma* spp. são agentes de biocontrole eficazes para inúmeros patógenos foliares e radiculares, são reconhecidos quanto a capacidade de proteger as plantas contra doenças e estresses ambientais, e melhorar o crescimento e desenvolvimento das culturas (Harman *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2012). A promoção de crescimento em plantas é bastante conhecida e pode ocorrer tanto em sistemas axênicos como sob condições naturais de campo. Existem vários mecanismos pelos quais *Trichoderma* spp. atuam na proteção das plantas contra a infecção por patógenos. Um dos mecanismos envolve o micoparasitismo podendo se posicionar como antagonista dependendo do tipo do patógeno no solo. Nesses casos

envolve a combinação de enzimas hidrolíticas e a produção de antibióticos que é desencadeado durante as interações entre micoparasita-hospedeiro. Esse contato é mediado por lectinas e proteínas que carregam módulos de ligação de celulose nas hifas do hospedeiro e do fungo micoparasita, respectivamente (Hermosa *et al.*, 2012). Alguns isolados de *Trichoderma* spp. são competentes para colonizar e crescer na rizosfera das plantas, tendo efeito direto sobre elas, isso inclui o aumento de crescimento, melhor absorção de nutrientes e indução de resistência contra doenças (Shoresh *et al.*, 2010).

A simbiose entre planta e *Trichoderma* spp. é regulada para garantir benefícios para ambos, o que inclui basicamente proteção e disponibilidade de nutrientes oferecidos à planta e, obtenção de compostos orgânicos e um nicho adequado para o desenvolvimento fúngico (Martínez-Medina *et al.*, 2013). O ponto mais crítico para o estabelecimento da interação simbiótica entre *Trichoderma* spp. e as plantas consiste na colonização radicular e infecções nas camadas das células corticais da raiz (Harman *et al.*, 2004). Por fim, as interações de simbiose são reguladas, e as respostas variam de acordo com características da planta ou cultivares e do tipo de isolado das *Trichoderma* spp. que coloniza a planta (Tucci *et al.*, 2010; Brotan *et al.*, 2013). A capacidade do fungo em promover o crescimento equilibrado nas plantas depende de uma boa regulação dos hormônios e compostos semelhantes aos mesmos na rizosfera. Entretanto, outros fatores como o genótipo, o estado fisiológico das plantas, ou, as condições das culturas (hidroponia vs. solo ou altos vs. baixos teores de fertilizantes) estão envolvidos no processo (Tucci *et al.*, 2010). Devido a ampla gama de efetores/MAMPs produzidos por *Trichoderma* spp. (Hermosa *et al.*, 2012; Nawrocka & Małolepsza 2013) é provável que ele seja capaz de ativar a sinalização de defesa uma vez que, estabeleça interações benéficas

“duradouras” com a planta. Isto é possível por causa da secreção de efetores, que suprimem as respostas de defesa do hospedeiro favorecendo a simbiose.

2.4 *Trichoderma* spp. e a sinalização de defesa

Trichoderma spp. também estimula os mecanismos de defesa das plantas. Lorito *et al.* (2010) propôs um modelo de interação planta-*Trichoderma* spp. sobrepondo as fases previstas no modelo “zig-zag” de Jones & Dangl (2006). O fungo pode interferir nas respostas de defesa da planta para aumentar a imunidade ou a MTI, bem como reduzir a suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS), aumentando a ETI. Linhagens efetivas de *Trichoderma* spp. são capazes de induzir uma defesa basal mais robusta produzindo uma variedade de MAMPs, como as xilases, celulasas, endopoligalacturonase, metabólitos secundários, e enzimas com atividade direta antimicrobianas (Lorito *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2012; Nawrocka & Małolepsza 2013). Além disso, algumas linhagens são capazes de neutralizar efetores de patógenos que interferem com a MTI, por exemplo, inibindo fatores de patogenicidade ou controlando a dispersão e nutrição dos patógenos. Isso reduz a ETS e inibe a supressão da resistência. Finalmente, *Trichoderma* spp. também pode melhorar a ETI, causando uma resposta mais rápida como o *priming*, ou ativá-lo, liberando compostos que, como acontece com algumas moléculas dos patógenos, são especificamente reconhecidos (Avr-R) por receptores da planta e eliciando os mecanismos de defesa (Lorito *et al.*, 2010).

A resposta de defesa induzida por *Trichoderma* spp. é típica da ISR, similar induzida por rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs), ou de SAR, que é induzida por patógenos, na qual é muito debatido (Mathys *et al.*, 2012; Hermosa *et al.*, 2012). Por exemplo, *Trichoderma* spp. podem liberar compostos que

induzem a SAR tanto quanto eliciam a ISR (Korolev *et al.*, 2008). Atualmente as duas resistências, eliciadas por *Trichoderma* spp. têm sido investigada pelo mecanismo conhecido como *priming* (Conrath, 2011). A forte correlação entre SAR e o *priming* sugere que este é decisivo no mecanismo da SAR em plantas. Para este fenômeno, a resistência induzida envolve o acúmulo das PR1 e de compostos que induzem a resistência contra patógenos. Quando não há o acúmulo das PR1 e de alguns compostos que reduzem as infecções subsequentes ocorre o *priming* (Conrath *et al.*, 2002). ISR, SAR, ou ambos podem ser ativados dependendo do tempo de interação e da quantidade de inóculo aplicada de *Trichoderma*. É provável que *Trichoderma* spp. estabeleçam a simbiose durante o período em que a defesa da planta é baixa, e que pode ocorrer por secreção de efetores/MAMPs do fungo.

As respostas das plantas desencadeadas por MAMPs são eliciadas de forma rápida e transitória (Mathys *et al.*, 2012). As respostas iniciais envolvem o fluxo de íons através da membrana plasmática, através do influxo transitório de Ca^{2+} e H^+ bem como o efluxo K^+ e Cl^- . O desequilíbrio e a modulação da atividade dos canais de íons resultam em rápidas mudanças no potencial iônico da membrana plasmática, sugerindo que as despolarizações bem como sinais elétricos locais e distais se espalhem na planta podendo desempenhar um papel significativo na indução da imunidade sistêmica. Durante a despolarização, a geração de ROS e as alterações de pH são observadas nas células vegetais e, posteriormente, a deposição de calose e a síntese de compostos antimicrobianos (Nawrocka & Małolepsza 2013).

O equilíbrio entre defesa e crescimento pela interação entre planta e *Trichoderma* spp. resulta das relações entre as vias de transdução da sinalização de AS, JA, ET, IAA e vias de respostas de outros hormônios (Ácido giberélico [GA] e ABA). A comunicação entre AS, JA e ET, desempenham um papel central na defesa,

e as vias de respostas de outros hormônios, como ABA, IAA e GA estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento, principalmente quando interagem com a sinalização do JA (Hermosa *et al.*, 2012; Brotman *et al.*, 2013; Hermosa *et al.*, 2013).

Trichoderma spp. reduzem a disponibilidade de ACC (*1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID*) pela atividade da ACCD (*DEAMINASE*) necessária para a biossíntese do ET. A redução do ET, promove o crescimento da planta e suprime a defesa via sinalização da GA, aumentando a degradação das proteínas DELLA, que são proteínas repressores de sinalização de GA (Hermosa *et al.*, 2012; Brotman *et al.*, 2013). No entanto a degradação da proteína DELLA bloqueia a defesa através da repressão da atividade transcricional de MYC2 pela ligação das proteínas JAZ. Por outro lado, GA pode controlar o aparecimento de respostas de defesa dependente de AS-JA pela regulação da degradação da proteína DELLA (Hermosa *et al.*, 2012).

Por outro lado, *Trichoderma* spp. produz IAA e estimula a biossíntese do ET via ACC nas plantas, podendo contribuir para o crescimento das plantas e desenvolvimento das raízes laterais. A produção de ET desencadeia o aumento na biossíntese de ABA, juntamente com a redução dos níveis de GA, reduzindo a degradação da proteína DELLA, assim ocorre à degradação da proteína JAZ facilitando a atividade transcricional de MYC2, isso contribui rapidamente para ativar as via de sinalização de JA. A produção de IAA também contribui no antagonismo com as vias de sinalização de AS e para compensar a supressão de crescimento por induzir o desenvolvimento de raízes laterais (Hermosa *et al.*, 2013).

Recentemente foi demonstrado que a ISR por *T. harzianum* em tomate contra *B. cinerea* é baseada principalmente nas respostas de defesa dependente das vias de sinalização de JA, ABA e SA em tomate (Martínez-Medina *et al.*, 2013).

Abordagens usadas para estudar alterações a níveis transcricionais associados à ISR por *Trichoderma* spp. sugerem que às principais vias de sinalização JA e AS estão envolvidas para ISR contra *B. cinerea* (Mathys *et al.*, 2012). Já a sinalização por JA/ET foi demonstrada essencial na resistência basal contra *Plasmospora viticola*, um oomiceto biotrófico que causa o míldio em videira (Perazzolli *et al.*, 2012). Outros estudos mostram que *Trichoderma* spp. desencadeiam alterações bioquímicas e moleculares que alteram características da SAR, principalmente associados com a expressão de proteínas PR1, PR2 e PR5 (Mathys *et al.*, 2012; Hermosa *et al.*, 2012).

2.5 Interação tomate-*A. alternata*

A infecção nas folhas por *A. alternata* ocorrem através da camada cuticular, que consiste na combinação de cutina e ceras, compreende a primeira fase a ser superada para penetração direta do patógeno. Os esporos na superfície do hospedeiro, em condições favoráveis, produzem um ou mais tubos germinativos. Em seguida, os tubos germinativos penetram nos estômatos, cutícula ou feridas com ou sem a formação de pequenos apressórios (Thomma, 2003). As plantas têm uma ampla variedade de defesas químicas e físicas contra infecções de patógenos tais como as causadas por *A. alternata*. As células das plantas desenvolveram defesas estruturais pré-invasivas, incluindo uma camada de cutícula e várias modificações da parede celular e da compactação da matriz extracelular, os quais são cruciais para a obstrução dos agentes patogênicos (Hückelhoven, 2007). As plantas respondem normalmente ao ataque de *Alternaria* spp. pela formação da parede celular em torno das hifas invasoras. As ROS são depois produzidas para iniciar a reação de hipersensibilidade e reforçar a parede celular, bem como a indução de um grupo de PRs e fitolexinas para lutar contra a progressão do patógeno (Thomma, 2003; Prasad

& Upadhyay, 2010). Apesar da regulação de uma série de genes de defesa em resposta as *Alternaria* spp., os patógenos geralmente estabelece o tipo e eficiência da resposta de defesa ativadas nas plantas e as diferentes vias de defesa que estão envolvidas na interação entre planta-*Alternaria* sp.

As vias de sinalização hormonal são desencadeadas por patógenos a fim de perturbarem e evitarem a resposta de defesa da planta. As infecções de plantas de tomate por *A. alternata* inicia uma cascata de eventos de sinalização que envolve a síntese e subsequente ativação das vias do ET, JA e AS. Recentemente, Zhang *et al.* (2011) sugeriram que a biossíntese e sinalização do JA promovem a PCD induzido pela toxina AAL em plantas de tomate. No estudo com mutantes *spr2* (*SUPPRESSOR OF [PRO] SYSTEMIN-MEDIATED RESPONSES 2*), uma mutação que reduz ácidos graxos trienólicos, foi possível verificar que a via deficiente na síntese de JA diminuiu a extensão do dano tecidual. No entanto, plantas transgênicas 35:: *prosys* superexpressando níveis endógenos do JA e após aplicação exógena do JA aumentou a sensibilidade em resposta para toxina AAL. Após aplicação exógena de metil jasmonato (MeJA) nas plantas *defl* restaurou os sintomas da doença pelo patógeno e induziu sintomas mais severos nas plantas controle (Jia *et al.*, 2013). Sendo assim, JA tem um efeito sobre a suscetibilidade em tomate para *A. alternata* e o patógeno utiliza a via de sinalização JA para a infecção bem sucedida (Egusa *et al.*, 2009). Jia *et al.* (2013) também observaram o envolvimento do JA na promoção de suscetibilidade à infecção por *A. alternata* em tomate. E propôs que as respostas do ET e a sinalização de JA dependente de JAI1 aumentam a suscetibilidade, enquanto a sinalização do AS promove a resistência da planta de tomate em resposta a *A. alternata*.

Enquanto isso a via do AS promove a resistência contra *A. alternata* e antagoniza com a sinalização de ET durante a infecção. Atuação do AS foi demonstrada em mutantes *NahG* (codifica uma hidroxilase bacteriana que degrada AS), no qual exibiram um aumento na expressão de genes da biossíntese e sinalização do ET, indicando que AS diminui a biossíntese do ET aumentando a resistência em resposta a *A. alternata*. Plantas *NahG* pré-tratadas com tiosulfato de prata (STS), um inibidor da ação do ET, atenuou significativamente o desenvolvimento dos sintomas da doença, e após aplicação exógena de AS em plantas mutantes superexpressando ET (*epi*) não influenciou no desenvolvimento dos sintomas, indicando que o ET pode ser efetivo na resposta de defesa induzido por AS durante a infecção por *A. alternata* (Jia *et al.*, 2013).

Uma vez que a produção do ET seja induzida pelo patógeno ou pela toxina AAL, promove a PCD. Subsequentemente, o patógeno necrotrófico extrai os nutrientes a partir de células mortas do hospedeiro produzindo mais toxina AAL, que por sua vez aumenta a morte celular (Mase *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2013). Outro estudo indicou que a via dependente do ET também está envolvida na sinalização da PCD desencadeada por *A. alternata* (Zhang *et al.*, 2011). Sendo assim, a via de JA e ET atuam sinergicamente para promover a susceptibilidade em plantas de tomate infectadas por *A. alternata*. Dessa forma, foi demonstrado que a aplicação exógena do ET na forma de ACC (*1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID*) nas plantas mutantes insensíveis (*jai1*) restabeleceu o desenvolvimento dos sintomas após aplicação da toxina AAL (Zhang *et al.*, 2011). O mesmo ocorreu com mutantes de tomate *never ripe (nr)*, que tem a percepção do ET debilitada, o qual mostrou menos sintomas de PCD após a aplicação da toxina AAL. No entanto, comparando o tratamento com a AAL toxina e aplicação exógena de JA em plantas *nr* não foi

verificado alteração da PCD induzido pela toxina AAL sugerindo que o receptor do ET, ETR3 (NR), pode ser importante no processo de PCD (Zhang *et al.*, 2011). Finalmente, a vias do AS promove a resistência em tomate pelo antagonismo com a sinalização do ET em resposta a *A. alternata*. O efeito do JA e SA depende da ação do ET, o principal modulador da suscetibilidade do tomate em resposta a *A. alternata* (Jia *et al.*, 2013).

2.6 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

O VIGS tem sido usado com sucesso para silenciar genes envolvidos em estudos de indução de resistência em dicotiledôneas especialmente em tomate. Nesse método sequências de cDNA são clonadas dentro de um genoma viral. O vetor é introduzido dentro da *Agrobacterium tumefaciens* e transferido para dentro das plantas por infiltração a vácuo ou com auxílio de uma seringa. O vírus propaga-se sistematicamente a partir do local da inoculação para as partes superiores da planta, e durante esse processo a expressão do gene endógeno da planta é suprimida (Liu *et al.*, 2002; Unver & Budak, 2009).

Uma vez que o vírus infecta a planta hospedeira, mecanismos de defesa do hospedeiro, como o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), é ativado para suprimir o vírus (Tian *et al.*, 2014). No processo, uma complexa enzima DICER desempenha um papel fundamental. A DICER tem dois sítios catalíticos de Ribonuclease III (RNase III) que clivam o RNA dupla fita (dsRNA) em dois locais que estão separadas por cerca de 21 a 26 nucleotídeos (Galun, 2005). O dsRNA é normalmente usado para a replicação da maioria do vírus de plantas. Estes fragmentos resultantes, são denominados *short interfering RNAs* (siRNAs), que são incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual irá

degradar qualquer transcrito endógeno que apresentem homologia com a sequência de siRNA (Unver & Budak, 2009). O RISC é ligado a uma sequência específica de um mRNA, e o mRNA é clivado ou sua tradução é suprimida (Galun, 2005). Isto pode ser obtido pela introdução de uma pequena molécula de RNA complementar (siRNA) em uma orientação senso ou anti-senso, ou pela introdução de um RNA fita dupla (dsRNA) mediada por *A. tumefaciens* ou por bombardeamento de partículas. As abordagens de silenciamento de genes são usadas para determinar a função de genes específicos, portanto, esta é uma ferramenta importante na genômica funcional.

Diferentes vetores tem sido utilizado em VIGS e um dos mais usados é baseado no TRV (Vírus Pedicular do Tabaco). O TRV é um vírus bipartido e, tal que, duas estirpes diferentes de *A. tumefaciens* são usadas para VIGS. O primeiro plasmídeo (pTRV1) 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). 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 o 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 (Trivilin, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo das plantas de tomate

Os experimentos foram conduzidos com sementes de tomate cv. Micro-Tom, gentilmente cedidas por Lázaro Eustáquio Pereira Peres, ESALQ-USP. A assepsia das sementes foi realizada, por esterilização em 2% de hipoclorito de sódio por 20 minutos e lavagem com água destilada esterilizada. As plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas luz, em copos plásticos (200 mL), contendo substrato comercial da Garden PLUS autoclavado e vermiculita (1:1).

3.2 Isolados e preparação do inóculo

A produção do inóculo dos isolados de *T. harzianum* Th1, Th2, Th3, Th4 e Th32 (cedidos pela empresa ICB-Bioagritec) foram preparados usando placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) compostos por 300 mL^{-1} de extrato de batata; 20 g L^{-1} sacarose e 16 g L^{-1} de ágar acrescido de 100 mg L^{-1} do antibiótico ampicilina (Vetnil). Para obter a esporulação as placas foram mantidas a 28°C , no escuro por sete dias. Os esporos foram coletados por lavagem das placas com água destilada esterilizada e ajustada para uma suspensão de esporos com concentração final de $2,0 \times 10^7\text{ mL}^{-1}$. A quantificação da suspensão de

esporos foi realizada com a utilização de câmara de Neubauer em microscópio de luz da marca Olympus (modelo BX 41 TF), com aumento de 400 vezes.

O patógeno utilizado para os testes de IR pertence à espécie *A. alternata* e faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFRGS. O patógeno foi isolado a partir de frutos de tomate com sintomas de mancha escura. O método para indução da esporulação de *A. alternata* foi desenvolvido a partir do método já validado para espécie *A. solani* descrito por Rodrigues *et al.* (2010). *A. alternata* foi cultivado em meio de cultura BDA, acrescido de 100 mg L⁻¹ de ampicilina (Vetnil) a 28°C. Após sete dias de cultivo, dois blocos de meio BDA (1 cm x 1 cm) contendo estruturas do patógeno foram coletados e transferidos para um frasco de erlenmeyer de vidro contendo 150 mL de meio de cultura V8 líquido composto por 100 mL L⁻¹ de suco de vegetais V8 (Campbell), e 100 mg L⁻¹ de ampicilina (Vetnil). Os cultivos foram incubados durante sete dias no escuro sob agitação orbital (*Shaker*) a 110 rpm, a 26 ± 2°C. Após este período, a biomassa micelial foi filtrada com camada dupla de gaze, com auxílio de uma espátula, fez-se pressão sobre a mesma para a retirada de todo o excesso do líquido. Em seguida a biomassa micelial foi colocada em placas de petri, e com auxílio de bisturi previamente esterilizado, a biomassa micelial foi triturada. Posteriormente, com uma espátula fragmentos de micélio foi transferida para placas de petri contendo 20 mL de meio de cultura BDA. As placas foram mantidas abertas sob um conjunto de quatro lâmpadas de luz negra (*LIGHT EXPRESS*, 40 w, tubular, 60 cm) distante 5 cm em si e em 30 cm das placas. As placas foram mantidas em fotoperíodo de 12 horas, a 25 ± 2°C, durante 60 horas. Os esporos foram coletados por lavagem das placas com água estéril e a suspensão de esporos ajustado em uma concentração de 1,0 x 10⁶ mL⁻¹.

3.3 Tratamentos e inoculação

Plantas de tomate cv. Micro-Tom com 15 dias de idade foram tratadas com cada um dos isolados de *T. harzianum*. Para o ensaio de IR aplicou-se 100 µL da suspensão de esporos com concentração final de $2,0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ diretamente sobre as raízes em cada copo. Quinze dias após os tratamentos, as plantas contendo *T. harzianum* foram inoculadas com um isolado de *A. alternata*. A inoculação do patógeno foi feita por aspersão da suspensão de esporos com concentração de $1,0 \times 10^6$ esporos mL^{-1} sobre ambas as superfícies foliares. Um dos tratamentos consistiu no cultivo com plantas não tratadas com os isolados de *T. harzianum*. O tratamento controle consistiu no cultivo com plantas não tratadas com os isolados de *T. harzianum* na ausência de *A. alternata*. Para as inoculações, foram aplicados 30 ml da suspensão de esporos por bandeja contendo 24 plantas, utilizando-se um frasco de vidro acoplado em um mini-compressor de ar automático (Marca Web kits- Modelo AS176). As plantas foram acondicionadas em caixas plásticas transparentes vedadas e para alcançar as condições ideais de alta umidade foi necessário o uso de umidificadores caseiros (Marca G-life-2 L). As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 horas de luz. Cada planta inoculada foi avaliada quanto à severidade da doença 96 horas após a inoculação (hpi), na qual foram analisados os folíolos das folhas (2^a, 3^a e 4^a folhas). Para estas avaliações, foi empregada a escala de notas adaptadas por Zhao *et al.* 2012 (Tabela 1). O índice de doença foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de doença (\%)} = [(\sum \text{ notas de severidade da doença} \times \text{número de folíolos infectados com as notas da área foliar infectada}) / \text{total de folíolos inoculados} \times \text{total de notas de severidade (5)}] \times 100.$$

O efeito da IR por diferentes isolados de *T. harzianum* foi realizado no mínimo dois experimentos independentes em tempos diferentes, sendo cada repetição constituída por 16 plantas.

Para extração do RNA e conseqüentemente a análise de expressão dos genes de tomate por RT-qPCR (Reação da transcrição reversa seguida da PCR quantitativa) foi utilizada folhas das plantas do tratamento com o isolado *T. harzianum* que obteve o melhor efeito na IR contra *A. alternata* entre os cinco isolados de *T. harzianum* utilizados.

TABELA 1. Escala diagramática de severidade (% da área foliar afetada) para avaliação da mancha foliar causada por *A. alternata* em tomate. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Nota	Sintomatologia
0	Ausência de sintomas
1	Manchas menores que 1% de área foliar lesionada
2	Pequenas lesões necróticas com coloração marrom-escuras, 1 a 5% de área foliar lesionada
3	Lesões necróticas coalescentes, 5 a 10% de área foliar lesionada
4	Lesões necróticas por coalescentes, 10 a 20% de área foliar lesionada
5	>20% de área foliar lesionada; e/ou com folhas ressecadas ou em senescência

No tratamento com os hormônios, 12 plantas da cv. Micro-Tom com 30 dias de idade foram submetidas aos tratamentos com 100 μ M de MeJA (Yu *et al.*, 2009) ou com o regulador de crescimento vegetal Ethrel[®] (24% do princípio ativo Etefon ou 7 mM de ET) (Sivasankar *et al.*, 2000) através da exposição do sistema radicular

com as soluções 24 horas antes da inoculação (hai) por *A. alternata*. Os sintomas da doença causada por *A. alternata* foram avaliadas 96 hpi. Para estas avaliações, foi empregada a escala de sintomas como descrito na tabela 1. O índice de doença foi calculado de acordo com a fórmula acima descrita.

3.4 Isolamento do RNA total e tratamento com DNase

O RNA total foi extraído usando folíolos de três plantas de cada interação usando reagente TRIzol[®] (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 H₃BO₃; 2 mM de EDTA], sendo utilizado como marcador 500 ng de λ HindIII. O gel permaneceu em contato com uma solução tampão TBE 1X com 0,5 mg mL⁻¹ de brometo de etídio por 15 min. Em seguida, o gel foi exposto a luz UV e fotografado pelo sistema de fotodocumentação computadorizado (Loccus Biotecnologia). Posteriormente, o RNA extraído foi submetido à reação com a enzima DNase I (RQ1 RNase-Free DNase da Promega) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.5 Síntese do cDNA

A reação de síntese de cDNA foi composta de aproximadamente 200 ng de RNA total tratado com DNase I; tampão 1X da GoScript[™]; 2 mM de MgCl₂; 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen); 1,3 μ 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 μ L que foi submetido às seguintes condições: 5 min a 25°C, 1 hora a 42°C e 15 min a 70°C.

3.6 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

Para a análise dos genes envolvidos na IR eliciada por *T. harzianum* contra *A. alternata* foi utilizado às folhas das plantas de tomate cv. Micro-Tom. Os genes selecionados e os oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cDNA estão descritos na Tabela 2. Para as análises de expressão foram utilizadas plantas previamente tratadas com *T. harzianum* e plantas não tratadas com *T. harzianum* antes e 48 hpi por *A. alternata*. A RT-qPCR foi realizada utilizando o método SYBR Green. Desta forma, as reações de amplificação consistiu de 4 µL de cDNA diluído 40 vezes; tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1 µL de SYBR[®] Green (Invitrogen) diluído 10000 X; 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 expressão dos genes alvos foi normalizada pelo gene do controle endógeno ubiquitina (UBI3) ($\Delta CT = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{ubi3}}$) e comparado com a amostra de um dos tratamentos que foram denominados como os calibradores ($\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{amostra}} - \Delta CT_{\text{calibrador}}$). Para comparar a expressão dos genes induzidos por *T. harzianum*, plantas controle, ou seja, plantas não tratadas com *T. harzianum*, foram utilizados como padrão de comparação com as plantas tratadas com *T. harzianum*. Sendo assim, foi utilizada a função $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{plantas tratadas com } T. \text{ harzianum}) - \Delta CT (\text{plantas controle})$. Para comparar a expressão dos genes induzidos por *A*

alternata, plantas não inoculadas com *A. alternata*, foram utilizadas como padrão de comparação com as plantas inoculadas com *A. alternata*. Conseqüentemente, foi utilizada a função $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (plantas inoculadas com *A. alternata*) – ΔCT (plantas controle).

TABELA 2. Representação das seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na análise de expressão gênica. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

No. Acesso GenBank	Gene	Nome	Seqüências
DQ409173	<i>Ethylene signaling Protein 2</i>	EIN2-F EIN2-R	5'-GCCCCATTCTCCGACGAGCC-3' 5'-CTGCAGTGCCCCGTTTCGTCCC-3'
AY192367	<i>Ethylene response factor 1</i>	ERF1-F ERF1-R	5'-ACAGTGGCTCCAGCGGCTTTG-3' 5'-AGCGAGTGCGGCTTCTCAG-3'
AY192369	<i>Ethylene response factor 3</i>	ERF3-F ERF3-R	5'-ACAGTGGCTCCAGCGGCTTTG-3' 5'-AGCCTGCAACAGACACCGGC-3'
U47279	<i>Ethylene receptor 1</i>	ETR1-F ETR1-R	5'-TGCTGGCACTGGACTTGGCC-3' 5'-TTTGCAGGCAATCCGGCCGT-3'
AY261512	<i>Mitogen activated protein kinase 1</i>	MPK1-F MPK1-R	5'-GCGCCACTACAGGGGAGCAA-3' 5'-GCAGCTGGGTTTACATGCGGGA-3'
AY640378	<i>Non inducible immunity 1</i>	NIM1-F NIM1-R	5'-CGTCTGCGCCGGATTTGACT-3' 5'-GCGAGCACACTGACCACGGC-3'
AK325093	<i>Gene precursor Pep1</i>	PROPEP-F PROPEP-R	5'-TCTTCATCCTCGTCGTCCTC-3' 5'-GCTGGAGGGTCATTTTCGTA-3'
X71592	<i>Pathogenesis related protein 1</i>	PR1-1a-F PR1-1a-R	5'-GGACGATGGTCTAGCAGCCTATG-3' 5'-CAGCACCAGCAGCGTTTAGC-3'
AJ277064	<i>Pathogenesis related protein 5</i>	PR5-F PR5-R	5'-TTGTGGTGGAGTCTGGATTGC-3' 5'-TTGTGGTGGAGTCTGGATTGC-3'
U37840	<i>Lipoxygenase</i>	LOXD-F LOXD-R	5'-GGCTTGCTTTACTCCTGGTC-3' 5'-ACACAACCTTGATGCCACAT-3'
X58253	<i>Gene ubiquitin</i>	UBI3-F UBI3-R	5'-TGCAGATCTTCGTGAAAACC-3' 5'-AGCGAGCTTAACCTTCTTCT-3'
KJ008684	<i>Beta tubulin</i>	B-TUB-F B-TUB-R	5'-AGAGAGCCTCGTTGTCAATGCAGA-3' 5'-ACGCTTCTCATCTCCAAGATCCGT-3'

A fim de verificar alterações na expressão de genes relacionadas à defesa durante a IR por *T. harzianum* em resposta à infecção por *A. alternata* em tomate, plantas inoculadas com *A. alternata* não tratadas com *T. harzianum*, foram utilizadas como padrão de comparação com as plantas tratadas com *T. harzianum* depois de

inoculadas com *A. alternata*. Sendo assim, foi utilizada a função $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (plantas tratadas com *T. harzianum* e inoculadas com *A. alternata*) – ΔCT (plantas inoculadas com *A. alternata*). Finalmente, a expressão foi calculado utilizando o Microsoft[®] Excel e a abundância de transcritos de cada gene foi determinada por meio da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Esse teste foi realizado com base em uma única repetição.

3.7 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

Para o VIGS por TRV foram utilizadas plantas de tomate com 7-8 dias após emergência. A agroinfiltração foi realizada na superfície abaxial das folhas cotiledonares antes do aparecimento das folhas verdadeiras. Um fragmento de cDNA de 251 pb do gene ERF1 de tomate foi clonados no sítio de restrição *Hpa*I e *Eco*RI do vetor pTRV2b (Trivilin, 2012). Para cada experimento, as plantas de tomate foram agroinfiltrada simultaneamente com colônias de *A. tumefaciens* (GV3101), transformadas com TRV1 e TRV2-GFP ou com TRV1 e TRV2b-ERF1. A partir das colônias recombinantes cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) sólido, acrescido de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rifampicina e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. A infiltração da *A. tumefaciens* contendo o vetor viral, foi conduzida de acordo com o método descrito por Liu *et al.*, (2002). Para tanto, as colônias de *A. tumefaciens*, transformadas com TRV1, TRV2b-GFP e TRV2b-ERF1 foram separadamente transferidas para 3 mL de LB líquido contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rifampicina e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. A canamicina foi utilizada como agente seletivo para TRV2b enquanto a rifampicina foi seletivo para *A. tumefaciens*. Após o cultivo das colônias a 28°C por 16-18 horas sob rotação de 200 rpm, 400 μL de cada cultura bacteriana foi adicionada em 20 mL de LB líquido contendo a mesma concentração dos antibióticos, 10 mM de MES (2-

[*N-MORPHOLINO*] *ETHANESULFONIC ACID*) e 20 μM de acetoseringona. As culturas foram novamente submetidas às condições mencionadas anteriormente por 18 horas. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em densidade óptica (D.O.) de 600 nm das diferentes culturas bacterianas, as quais foram então transferidas para tubos e centrifugadas por 10 min a 5000 x g. Após a precipitação das células as mesmas foram ressuspensas em uma solução de infiltração composta de 10 mM de MgCl_2 ; 10 mM de MES e 200 μM de acetoseringona, sendo a densidade óptica das culturas ajustada para $\text{OD}_{600\text{nm}} = 2,0$. As células ressuspensas foram mantidas por 3 horas a temperatura ambiente. Antes da infiltração, foi realizada a mistura na proporção 1:1 (v:v) das culturas TRV1 e TRV2b-GFP ou TRV1 e TRV2b-ERF1. A infiltração da *A. tumefaciens* contendo o vetor viral foi denominada de agroinfiltração. As plantas agroinfiltradas foram mantidas em câmara de crescimento a 23 ± 2 °C sob fotoperíodo de 14 horas. Cerca de 6 plantas foram agroinfiltradas com TRV2b-GFP ou TRV-ERF1.

3.8 Extração do DNA e quantificação do patógeno por qPCR

Para análise de PCR quantitativo (qPCR) foram utilizadas plantas previamente tratadas com *T. harzianum* e inoculadas com *A. alternata* e plantas não tratadas e inoculadas com *A. alternata*. Na técnica de detecção da qPCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene constitutivo β -tubulina para *A. alternata*. Para amplificar sequências genômicas de tomate, foi utilizado o gene que codifica proteína-ubiquitina (Tabela 2). Posteriormente, foi realizada uma série de diluições de 5 vezes do DNA genômico de esporos puros de *A. alternata* e do DNA total das folhas de tomate para realizar uma curva padrão, a fim de verificar a eficiência de amplificação da reação.

Para a quantificação do patógeno por qPCR, cada planta foi avaliada individualmente, sendo coletados dois folíolos da terceira ou quarta folha de tomate. Foram coletadas folíolos de 5 plantas após 96 hpi com *A. alternata* nas plantas previamente tratadas com Th1. Da mesma forma, foi coletado folíolos de 5 plantas não tratadas com Th1 inoculadas com *A. alternata*, totalizando 10 folíolos infectados por *A. alternata* em cada tratamento.

O DNA total foi extraído de folhas contendo sintomas e sinais do patógeno. Primeiramente, os tecidos foram triturados na presença do nitrogênio líquido. Uma alíquota de aproximadamente 100 mg de cada amostra foi utilizada para o isolamento do DNA. Em seguida, as 100 mg de tecido vegetal contendo material fúngico em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foi agitado com auxílio de um disruptor por duas vezes durante 5 min em temperatura ambiente na presença de 450 μ L do tampão de extração [(2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl, 2% polivinilpirrolidona (PVP)-40, 0,20 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pH 8,0, 1% β -mercaptoetanol)] e esferas de vidro (0,5 mm de diâmetro). Entre as duas etapas no disruptor a amostra foi mantida por 5 min no gelo, para favorecer o rompimento celular do material fúngico. Após, a amostra foi incubada a 65°C por 30 min. Em seguida, 70 μ L de clorofórmio foram adicionados, e as amostras foram mantidas por 5 min no gelo e centrifugado a 8,000 x g por 20 min a 4°C. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga, logo foi adicionada 30 μ L de cloreto de lítio (LiCl) 8 M e mantidos por uma noite a 4°C. No dia seguinte o material foi homogeneizado e centrifugado a 8,000 x g por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi recuperada contendo DNA e o precipitado contendo RNA foi descartado. A fase aquosa foi precipitada com de etanol absoluto 96% (2 vezes o volume). Em seguida o material foi mantido por 30 min a -20°C e centrifugado por

10 min a 8,000 x g. Finalmente o DNA precipitado foi lavado com Etanol 70%, centrifugado por 10 min a 8,000 x g para depois ser ressuspensas em 30 µL em água Milli-Q autoclavada. O material extraído foi armazenado a -20°C.

A qPCR foi realizada em um volume final de 10 µL. Desta forma, as reações de amplificação consistiram de 2 µL de DNA total; tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1 µL de SYBR[®] Green (Invitrogen) diluído 10000 X; 0,2 µL de ROX (Invitrogen); 0,25 U de Platinum[®] Taq e 3,05 µL de água ultrapura para completar o volume final. 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 quantidade de DNA relativa do fungo em relação ao DNA da planta foi calculado utilizando o Microsoft[®] Excel e a abundância de transcritos de cada gene foi determinada por meio da fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Sendo assim, os valores do limiar (Ct) dos genes alvos foram normalizados pelo gene do controle endógeno UBI3 da planta ($\Delta C_t = C_{t_{alvo}} - C_{t_{ubi3}}$) e comparado com uma amostra controle denominada calibrador ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{amostra}} - \Delta C_{t_{calibrador}}$). Esse teste foi realizado com base em uma única repetição.

3.9 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos a partir do planejamento fatorial experimental em delineamento inteiramente casualizados. Os dados dos sintomas da doença foram determinados pela média das notas da escala de severidade dos sintomas e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as

médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.7 beta (Silva & Azevedo, 2002).

Para análise da expressão dos genes nas folhas de tomate, os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas independentes para cada tratamento, e cada amostra foi processada em triplicata técnica. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.7 beta (Silva & Azevedo, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Supressão dos sintomas causados por *Alternaria alternata* em tomate (*Solanum lycopersicum*) por *Trichoderma harzianum*

Plantas de tomate cv. Micro-Tom foram tratados aos 15 dias após emergência com os diferentes isolados de *T. harzianum* (Th1, Th2, Th3, Th4 e Th32) e 15 dias após o tratamento com os isolados de *T. harzianum*, foram inoculadas com patógeno foliar *A. alternata*. A severidade da doença foi avaliada 96 hpi com *A. alternata* nas plantas previamente tratadas com os diferentes isolados de *T. harzianum* e controle (Figura 1). As plantas tratadas com os isolados Th2, Th3 e Th32 apresentaram severidade de 28%, 32% e 30%, respectivamente, e não diferiram significativamente da severidade da doença causada por *A. alternata* nas plantas controle que foi de 32% (Figura 1). As plantas tratadas com os isolados Th1 e Th4 de *T. harzianum* apresentaram redução significativa da severidade da doença quando comparadas com as plantas controle. A redução mais significativa dos sintomas foi conferida para os isolados Th1 com percentual de 19% enquanto a redução da severidade conferida para o isolado Th4 foi de 22% (Figura 1). O intervalo de 15 dias entre a aplicação de *T. harzianum* e de *A. alternata* foi suficiente para suprimir os sintomas causados por *A. alternata* em tomate por *T. harzianum*.

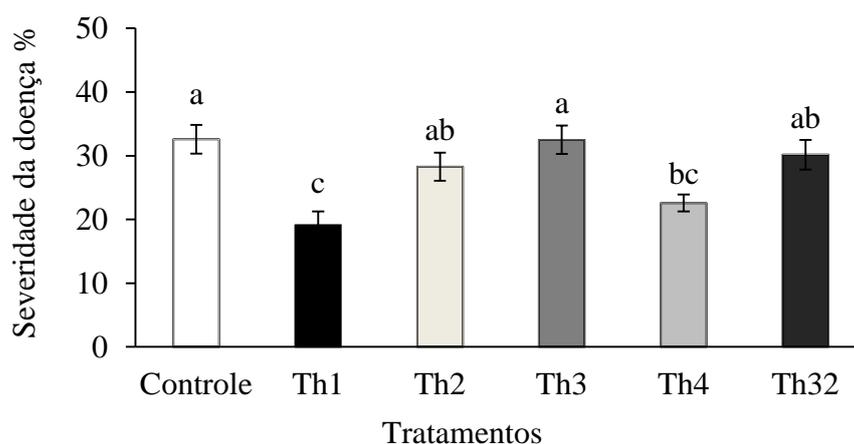


FIGURA 1. Severidade da mancha de alternária (%) causada por *A. alternata* em tomate cv. Micro-Tom tratadas com diferentes isolados de *T. harzianum* (Th1, Th2, Th3, Th4 e Th32) em comparação com as plantas não tratadas com os isolados de *T. harzianum*, plantas controle (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$). As colunas representam a média de 16 plantas e as barras verticais o erro padrão da média. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Considerando que os isolados de *T. harzianum* e o patógeno estiveram espacialmente separados na planta pode-se atribuir a redução de severidade à indução de resistência causada pelo tratamento. Esse fenômeno é causado por respostas imunes mediadas pela planta conhecido como ISR induzido por *Trichoderma* (Tucci *et al.*, 2010; Mathys *et al.*, 2012; Martínez-Medina *et al.*, 2013; Brotan *et al.*, 2013). Em relação à *T. harzianum*, este fenômeno já foi observado em outros patossistemas. Um exemplo é o da aplicação de *T. harzianum* T-39 em videira contra *Plasmopara viticola*, um oomiceto biotrófico que causa míldio em videira, onde é observada resistência local e sistêmica (Perazzolli *et al.*, 2012). Martínez-Medina *et al.* (2013) observaram que a colonização radicular por *T. harzianum* T-78 e *T. harzianum* T-22 (Tucci *et al.*, 2011) aumentou a resistência em tomate contra o patógeno necrotrófico *B. cinerea*, agente causal do mofo cinzento. Outros exemplos foram observados com aplicação de *T. harzianum* T-32 na proteção de tomate contra *A. solani* (Harman *et*

al., 2004), do isolado *Trichoderma* sp. IB 28/07 na proteção de tomate contra *A. solani* (Fontenelle *et al.*, 2011) e do isolado *T. harzianum* ETS 323 na proteção de *Brassica oleracea* var. *capitata* contra *Rhizoctonia solani* (Shibu *et al.*, 2013).

As condições de alta umidade durante o experimento favoreceu a infecção e simultaneamente afetou a ocorrência da IR por Th1 contra *A. alternata*. A infecção nas folhas de tomate por *A. alternata* levou a formação de pequenas lesões necróticas nas primeiras 24 hpi. Nas 96 hpi houve um crescimento lento e expansivo a partir das lesões iniciais, neste período foi caracterizado por lesões entre 1% e 30% de severidade. Plantas tratadas com o isolado Th1 e inoculadas com *A. alternata* foram fotografadas 50 dpi (Figura 2). Após a inoculação foi verificado que as folhas senescentes localizadas na base da planta apresentaram maior severidade da doença que as folhas mais jovens, resultando em folhas amareladas, secas, encurvadas ou caídas. No entanto, a razão para esta suscetibilidade dependente da idade ainda não é clara, embora diversos estudos tentam explicá-las. Em muitos casos, durante o desenvolvimento vegetal a expressão da resistência é geralmente associada com a maior expressão de um conjunto de genes e a ativação de diferentes vias de sinalização hormonal (Develey-Riviere & Galiana, 2007). Portanto a resistência sistêmica é resultado da modulação das vias de sinalização iniciais estabelecida por Th1 durante as interações benéficas com a planta.

O sucesso de *A. alternata* durante a infecção pode, em parte, ser atribuída à produção de fitotoxinas. *A. alternata* produz a toxina AAL específica ao tomate que está associado à patogenicidade (Grogan *et al.*, 2005). O estudo de Eshel *et al.* (2002) também relaciona a participação de enzimas ao desenvolvimento de sintomas e sugere que exo-glucanase e a endoglucanase estão envolvidas na patogenicidade de *A. alternata*. A insensibilidade do tomate à toxina é determinada por um único locus

codominante denominado Asc-1 (*ALTERNARIA STEM CANKER RESISTANCE GENE 1*) (Tsuge *et al.*, 2012). Muitos cultivares de tomate em uso comercial possuem o gene Asc1, que é um gene que confere a resistência parcial à *A. alternata*. A suscetibilidade à *A. alternata* está associada com o alelo mutante Asc-1, alelo que pode ser encontrado em tomate ou em outras solanáceas (Brandwagt *et al.*, 2001).

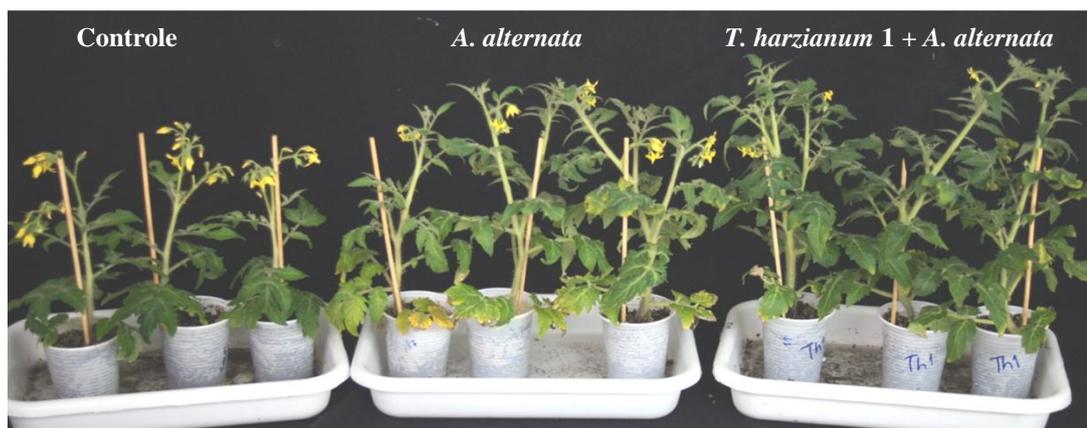


FIGURA 2. Ensaio de efeito do isolado de Th1 no controle de *A. alternata* em tomateiro, fotografado 50 dias após o desafio com *A. alternata*. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Esses resultados sugerem que aplicação de Th1 nas raízes de tomate cv. Micro-Tom efetivamente induziu a IR contra *A. alternata*. Com base nos resultados, o tratamento com o isolado Th1 conferiu maior resistência à infecção por *A. alternata*, caracterizada por uma redução significativa no desenvolvimento dos sintomas, e, portanto as plantas tratadas com Th1 foram selecionadas para quantificação do patógeno e análise da expressão de genes.

4.2 Quantificação do patógeno por qPCR

A fim de confirmar a relação entre os sintomas e a infecção pelo patógeno, foi realizado o método de qPCR. Este método tem sido utilizado para quantificar as estruturas do patógeno durante a infecção por *A. alternata* (Egusa *et al.*, 2009; Jia *et*

al., 2013). Frequentemente, nos ensaios de qPCR, a biomassa do patógeno é medida e normalizada pelo DNA da planta (Weßling & Panstruga, 2012). Para a quantificação, plantas tratadas com Th1 e posteriormente desafiadas com *A. alternata* e plantas não tratadas com Th1 inoculadas com *A. alternata* foram selecionadas para monitorar a colonização de *A. alternata* nos tecidos. Os oligonucleotídeos selecionados para quantificar o patógeno foram baseados no gene da β -tub e da planta baseados no gene UBI3 que produziram alta eficiência de amplificação com valores de 99,94 a 99,99%, respectivamente, assim foram utilizados em conjunto no experimento de quantificação. A expressão do gene β -tub foi detectado em 70% dos folíolos infectados com *A. alternata* nas plantas não tratadas com Th1 e 60% dos folíolos com *A. alternata* nas plantas previamente tratadas com Th1. Sendo assim, foi identificada a presença do DNA de *A. alternata* tanto nas plantas não tratadas como nas plantas tratadas com Th1. No entanto, a quantidade do DNA de *A. alternata* foi 74 vezes maior nas plantas não tratadas por Th1 (Figura 3).

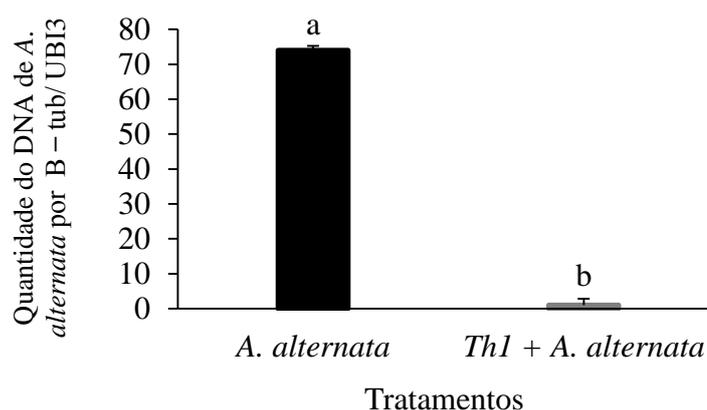


FIGURA 3. Quantificação de *A. alternata* nas plantas de Micro-Tom utilizando qPCR. A expressão do gene β -tub do patógeno foi normalizado pelo gene UBI3 da planta. As colunas indicam o número de vezes que o DNA do patógeno aumentou em relação as plantas tratadas com Th1. As letras indicam diferença estatística entre plantas induzidas e não induzidas por Th1 (n=5), de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05). As colunas representam a média de 5 plantas e as barras verticais o erro padrão da média. UFRGS, Porto Alegre, 2014.

A determinação da biomassa do patógeno por qPCR é rápida, sensível, específica e muito eficaz para a detecção mesmo nas fases iniciais da infecção quando existe pouca biomassa do patógeno. Portanto, as diferenças observadas no desenvolvimento dos sintomas e no crescimento de *A. alternata* nas plantas previamente tratadas com Th1, foram respostas resultantes da proteção sistêmica induzida por *T. harzianum*.

4.3 Efeito da aplicação exógeno de MeJA e etileno no desenvolvimento dos sintomas causados por *A. alternata*

No presente estudo, as folhas de tomate cv. Micro-Tom exibiram lesões necróticas 96 hpi da *A. alternata*. Para avaliar os efeitos dos hormônios ET e JA no desenvolvimento dos sintomas causados por *A. alternata*, foi realizada aplicação dos tratamentos de ET (na forma de etefon) e MeJA nas raízes 24 hai de *A. alternata*. Quando as folhas das plantas foram inoculadas na presença de etefon a severidade da doença foi de 82,7% nas folhas. Já a severidade após o tratamento com MeJA foi de 45,7%. Ambos os hormônios resultaram em um aumento significativo da severidade em relação às plantas controle que foi de 26,5% (Figura 4). A severidade da doença foi medida em um único tempo, 96 hpi com *A. alternata*.

Etefon é utilizado como regulador de crescimento e maturidade da planta, rapidamente penetra nos tecidos (Tian *et al.*, 2014). O Etefon pertence ao grupo de precursores do ET, quando utilizados na planta, rapidamente são convertidos em ET podendo executar as condições fisiológicas deste hormônio no crescimento vegetal.

As vias de sinalização dependentes de JA e ET já foram investigadas durante a morte celular por *A. alternata* e/ou tratamento com AAL toxina, baseado na combinação da aplicação de hormônios exógenos e uso de mutantes de tomate para

as vias hormonais alteradas (Zhang *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2013). O tratamento exógenos de MeJA e etileno afetaram negativamente a resistência em diferentes níveis contra *A. alternata* em plantas de tomate (Jia *et al.*, 2013). Curiosamente, *A. alternata* usa em seu favor tanto a via do JA como a via do ET para promover a infecção (Zhang *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2013). Recentemente foi relatado que as vias de JA e ET agem sinergicamente para promover a suscetibilidade, enquanto AS antagoniza com a sinalização do ET para promover a resistência durante a infecção de *A. alternata*. Logo, a resistência aumentada por AS na infecção por *A. alternata* pode ser correlacionada com a diminuição da via de sinalização do ET (Jia *et al.*, 2013).

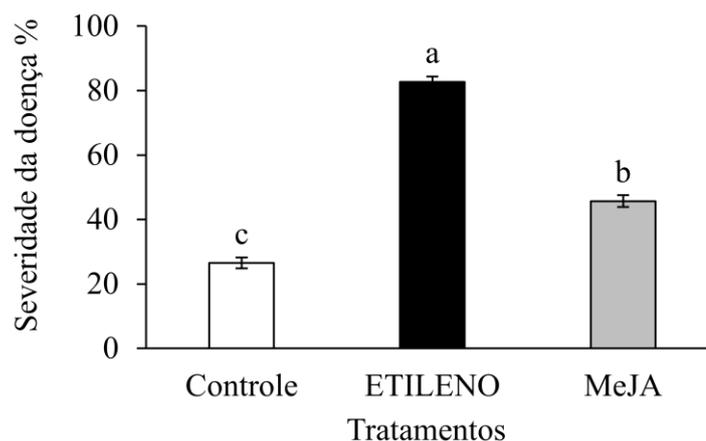


FIGURA 4. Severidade da doença (%) em tomate causada por *A. alternata* 96 hpi sob diferentes tratamentos. A coluna branca representa as plantas somente inoculadas com *A. alternata* (C), a coluna escura representam as plantas tratadas com etileno 24 hai com *A. alternata* e a coluna cinza representa as plantas tratadas com MeJA 24 hai com *A. alternata*. Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam a média de 12 plantas e as barras verticais o erro padrão da média. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Tian *et al.* (2014) observaram que as folhas de tomate que receberam tratamento com etefon aumentaram significativamente os níveis endógenos de AS e diminuíram os níveis endógenos de JA. Os dados do presente estudo, pode-se afirmar

que a via de sinalização do ET está envolvida na suscetibilidade em tomate para *A. alternata*. Tian *et al.* (2014) relataram que o tratamento com exógeno MeJA não aumentou significativamente os níveis de AS que foi acompanhado por um aumento sistêmico dos níveis de JA. É indicado que a ação do AS não tem nenhuma relação com JA nos processos de infecção por *A. alternata* em tomate (Egusa *et al.*, 2009). Estudos anteriores verificaram que existe uma associação entre o efeito do tratamento com MeJA com o aumento da atividade de enzimas da biossíntese do ET em tomate (Yu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011). E essa circunstância reflete o fato de que a função do JA na suscetibilidade à *A. alternata* está correlacionada com o aumento da ação do ET. Portanto esse efeito sinérgico inibe a resistência em tomate contra doença causada por *A. alternata*. Além disso, aplicação exógena com MeJA em plantas mutantes deficientes ou insensíveis ao ET antes da inoculação com *A. alternata* resultou na similar porcentagem de doença em relação as plantas controle não tratadas, mas menos lesões que o tratamento com MeJA nas plantas tipo selvagens, indicando que o efeito de JA na suscetibilidade para *A. alternata* depende parcialmente da sinalização do ET (Jia *et al.*, 2013). No presente estudo foi mostrado que as plantas tratadas com MeJA foram menos suscetíveis que as plantas tratadas com ET. Estes resultados sugerem que a via de sinalização dependente de JA e ET são indispensáveis para resistência/suscetibilidade contra *A. alternata* em tomate. Porém, o efeito do JA e SA depende da ação da via de sinalização do ET, o principal modulador da suscetibilidade do tomate em resposta a *A. alternata*.

4.4 Silenciamento do gene ERF1 em tomate

Para avaliar o envolvimento de ERF1 durante a IR por Th32, foi investigado o efeito deste isolado Th32 após a inoculação com *A. alternata* em plantas

previamente agroinfiltradas com TRV-ERF1. No estudo foram utilizadas plantas silenciadas para o gene ERF1 deficientes na resposta ao ET. Foi observado uma redução significativa nos sintomas nas plantas controle TRV2b-GFP tratadas com Th32 (10%) em relação as plantas não tratadas (27,7%), o que indica que as plantas controle apresentaram um resultado similar aos experimentos anteriores sem o uso da agroinfiltração (Figura 5). Já o resultado do silenciamento de ERF1 indicou uma redução dos sintomas (17,7 %) nas plantas não tratadas e para as plantas tratadas (10,3%), no caso das plantas TRV-ERF1 (Figura 5). O resultado indica que o silenciamento do gene ERF1 não afeta o desenvolvimento de sintomas por *A. alternata* nas plantas previamente tratadas com Th32 em comparação com as plantas não tratadas.

Para analisar as vias de sinalizações necessário para o estabelecimento da ISR por *Trichoderma* sp., alguns estudos tem realizado análises fenotípicas da doença em plantas mutantes silenciadas e transgênicas. Recentemente, plantas de tomate mutantes superexpressando o cDNA da pró-sistemina, molécula precursora da sistemina, um peptídeo hormonal de defesa, tratadas e não tratadas com *T. harzianum* foram mais resistentes ao necrotrofíco *B. cinerea*, o que confirma o envolvimento desta molécula na resistência basal contra *B. cinerea*. Com o uso de plantas silenciadas para o gene pró-sistemina, a ISR foi demonstrada efetiva por *T. harzianum*, sugerindo que a IR mediada por *T. harzianum* contra *B. cinerea* não depende da sinalização por sistemina (Martínez-Medina *et al.*, 2013). Já plantas mutantes deficientes na sinalização do JA (*mc*, *def1*, *p1 II*, e *ps*) e mutantes na sinalização do ET, (*gluB*, *etr1* e *ein2*) mostraram-se deficientes na ISR por *Trichoderma* spp. evidenciando o papel do JA e ET na regulação da ISR no patossistema estudado (Mathys *et al.*, 2012; Martínez-Medina *et al.*, 2013).

Porém os resultados do presente estudo demonstram que a IR por Th32 em tomate contra *A. alternata* não envolve a via de resposta ao ET. Esta diferença em relação a outros estudos pode dever-se a especificidade do patossistema *A. alternata*-tomate. Neste caso, o ET notadamente apresenta um papel importante como fator desencadeador da doença induzido pelo patógeno. Possivelmente, *T. harzianum* tenha um papel moderador deste aumento de ET pelo patógeno no tecido infectado e desta forma reduz a severidade dos sintomas.

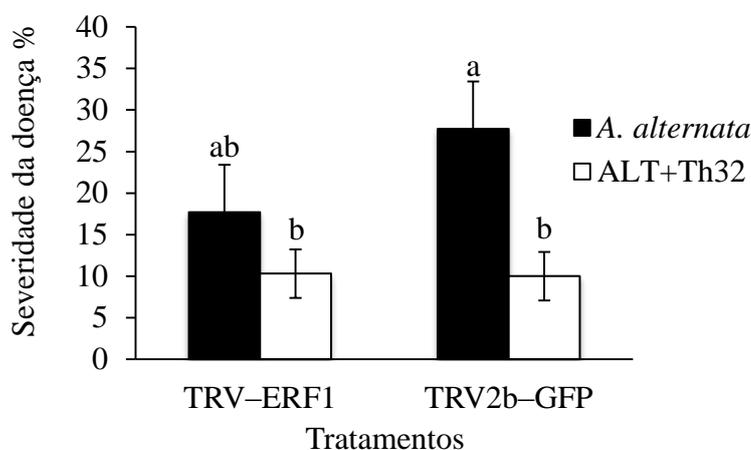


FIGURA 5. Efeito da IR por *T. harzianum* 32 na severidade da doença avaliada 12 dpi com *A. alternata* nas plantas silenciadas para o gene ERF1 (TRV-ERF1) e nas plantas não silenciadas, controle (TRV2b-GFP). As colunas escuras representam as plantas desafiadas com *A. alternata*. As colunas brancas representam as plantas tratadas com *T. harzianum* 32 após desafiadas com *A. alternata*. Tratamentos seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam a média de 6 plantas e as barras verticais o erro padrão da média. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

4.5 Expressão de genes envolvidos na defesa

Para analisar os mecanismos de defesa ativados durante a IR por Th1, a expressão de genes marcadores das vias de sinalização do AS, JA e ET foi monitorada por RT-qPCR. O resultado da regulação dos genes de defesa determina o tipo da via de sinalização envolvido na IR por Th1 contra *A. alternata*.

A via de transdução de sinal através do acúmulo do AS é encontrado na SAR, induzida por ataque de patógenos, enquanto se considera que JA e/ou ET são sinalizadores para a ISR por agentes de controle biológico, como as de *Trichoderma* spp. Entretanto, alguns estudos indicam que isolados de *Trichoderma* spp. desencadeiam um tipo de ISR dependente da sinalização do AS que se assemelha com a SAR induzida por patógenos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011; Mathys *et al.*, 2012; Martínez-Medina *et al.*, 2013). As PRs são codificadas por genes marcadores de AS, e atuam nas vias de sinalização do AS. Geralmente, os genes PRs são fortemente induzidos nas plantas previamente tratadas com *Trichoderma* spp. antes da inoculação com os patógenos (Tucci *et al.*, 2011; Mathys *et al.*, 2012). Entretanto, no presente estudo foi verificado que a indução de PR1-1a, não apresentou diferença significativa após o tratamento com Th1 em relação ao controle (Tabela 3). Resultado semelhante foi encontrado para PR5 (Tabela 3). Há casos que *Trichoderma* spp. não induz as PRs durante a defesa da planta ou faz isso apenas transitoriamente (Tucci *et al.*, 2010). Pouca alteração da expressão de genes de defesa pode estar relacionada com a habilidade de Th1 estabelecer-se na rizosfera das plantas, podendo coincidir com o crescimento do fungo nas raízes ou até mesmo estabelecer o sucesso de infecção devido ativação das respostas de defesa contra futuros ataque de patógenos. Os fungos benéficos têm demonstrado estratégias adaptativas para suprimir de forma eficaz as respostas de defesa desencadeadas por AS, para estabelecer infecções bem sucedidas (Hermosa *et al.*, 2013).

A expressão de PR1-1a e de PR5 foi significativamente induzida após a infecção por *A. alternata* (731 e 277 vezes, respectivamente) nas plantas de tomate em relação às plantas controle (Tabela 3). O aumento da expressão das PR1-1a e PR5 podem estar relacionados com o aumento das lesões causadas por *A. alternata*,

além disso, pode estar associado com a sinalização de SAR dependente de AS em tomate contra *A. alternata*. Glazebrook *et al.*, (2005) relataram que a resistência contra agentes patogênicos necrotróficos baseia-se em mecanismos relacionados ao JA enquanto a resistência contra os biotróficos está associada com a ativação da sinalização dependente do AS. Recentemente foi relatado o papel do AS e JA na suscetibilidade das plantas de tomate para *A. alternata* é diferente das outras interações plantas-necrotrófico (Zhang *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2013). Levanta-se, portanto a hipótese de que a proteção da cultura do tomate por *Trichoderma* spp. ao patógeno necrotrófico *A. alternata* seja usualmente controlado pelas respostas sistêmicas de defesa dependente de JA ou AS e através da atenuação da via de sinalização do ET, podendo render mais resistência ao patógeno.

TABELA 3. Valores de expressão relativa de PR1-1^a e PR5 em relação à UBI3 em folhas de tomate. O quadro mostra os valores de expressão relativa (alteração em vezes em relação expressão as plantas controle, cujo valor da expressão é 1,0) avaliada por RT-qPCR. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Tratamentos	Expressão relativa da PR1-1 ^a	Expressão relativa da PR5
Controle (- <i>T. harzianum</i> 1/ - <i>A. alternata</i>)	1 ± 0,3	1 ± 0,6
<i>T. harzianum</i> 1	2 ± 0,8	1 ± 0,0
Controle (- <i>T. harzianum</i> 1/ - <i>A. alternata</i>)	1 ± 0,1	1 ± 1
<i>A.alternata</i>	731 ± 244*	277 ± 84*
Controle (- <i>T. harzianum</i> 1/ + <i>A. alternata</i>)	1 ± 0,6	1 ± 0,0
<i>T. harzianum</i> 1 + <i>A. alternata</i>	1 ± 0,2	2 ± 1

Os valores são referentes as média de três replicatas biológicas e triplicata técnica e ao erro padrão (\pm) da média para cada tratamento. Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$) entre: plantas tratadas com *T. harzianum* 1 vs. plantas não tratadas (C), plantas inoculadas com *A. alternata* vs. não inoculadas (C) e plantas tratadas com *T. harzianum* 1 desafiadas com *A. alternata* vs. plantas desafiadas com *A. alternata* não tratadas com *T. harzianum* 1 (- *T. harzianum* / + *A. alternata*).

Os estudos anteriores tenham apontado que durante a ISR por *Trichoderma* spp., não houve ativação da PR1 em *Arabidopsis* (Mathys *et al.*, 2012) e em tomate (Martínez-Medina *et al.*, 2013) em resposta a infecção do fungo *B. cinerea*. A IR está frequentemente associada com o acúmulo das proteínas PRs (Van Loon *et al.*, 2006). A IR sem acúmulo de PRs pode indicar que o *priming* de defesa da planta é um mecanismo possivelmente envolvido nas respostas das plantas mediadas por *T. harzianum*. Os resultados obtidos sugerem que a IR por Th1 em tomate contra *A. alternata* ocorre sem a indução de PR1-1a e PR5. Portanto, a sinalização de defesa mediada por AS é reduzida durante a IR por Th1 contra *A. alternata*.

A expressão do gene NIM1/NPR1 nas plantas tratadas com Th1 apresentou expressão semelhante ao controle, mas sem diferença estatística significativa entre os tratamentos (Figura 6). O gene NIM1/NPR1 foi induzido fortemente em resposta à infecção por *A. alternata*, mesmo assim não foi constatada diferença significativa em relação ao controle (Figura 7). Durante a IR a expressão do gene NIM1/NPR1 foi reprimido nas plantas tratadas com Th1 após a inoculação com *A. alternata*, mas não foram encontradas diferenças significativas na comparação com as plantas controle (Figura 8). Em células não induzidas, NPR1 permanecem no citoplasma como um oligômero através das pontes dissulfeto intermoleculares (Durant & Dong, 2004; Fu *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2012). Durante a indução de SAR, AS provoca uma alteração bifásica no potencial redox celular que leva a redução das ligações de dissulfeto. Isto resulta na conversão de NPR1 na forma monomérica no qual é translocado para o núcleo (Durant & Dong, 2004). Logo NPR1 interagem com membros da família de transcrição TGA que, juntamente com fatores de transcrição WRKY, se ligam aos promotores de genes de defesa responsivos ao AS, resultando em sua ativação (Durant & Dong, 2004; Fu *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2012). O

funcionamento adequado de NPR1 requer que a proteína seja degradada pelo proteossoma, possivelmente permitindo-lhe fazer novas proteínas NPR1 para reiniciar o ciclo de transcrição (Spoel *et al.*, 2009). Mas no caso da ISR, evidências indicam que o acúmulo citosólico de NPR1 modula as respostas de defesa dependente de JA por meio de uma função ainda desconhecida no citosol (Spoel *et al.*, 2003). Os resultados achados demonstram a não indução de NPR1, isso reflete em estado basal na qual a NPR1 encontra-se no citoplasma.

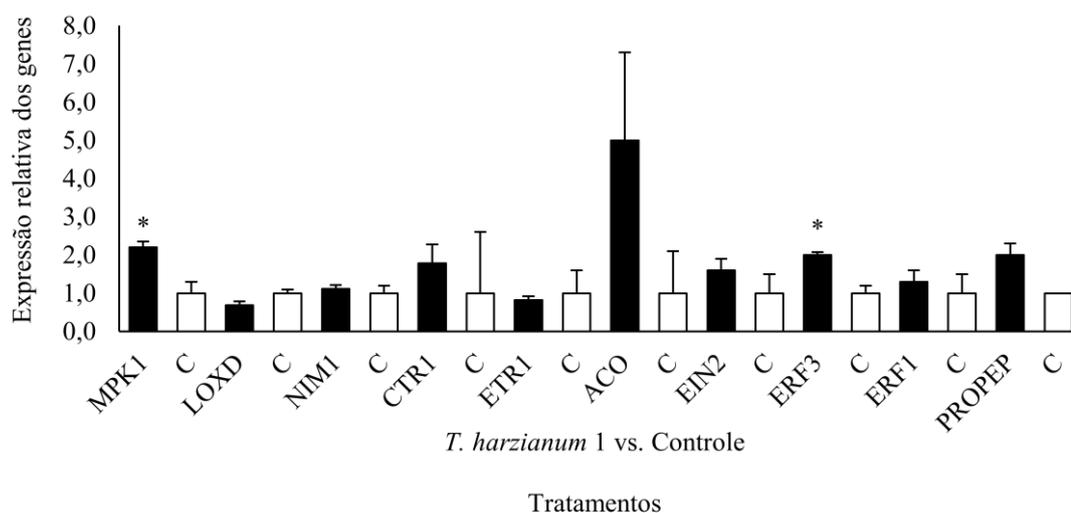


FIGURA 6. Valores de expressão relativa dos genes em folhas de tomate: MPK1, LOXD, NIM1, CTR1, ETR1, ACO, EIN2, ERF3, ERF1 e PROPEP. As barras representam os valores de expressão. A figura representa os valores de expressão relativa (alteração em vezes em relação expressão as plantas controle, cujo valor da expressão é 1,0) avaliada por RT-qPCR. Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam a média de três replicatas biológicas e triplicata técnica e as barras verticais o erro padrão da média para cada tratamento: plantas tratadas com *T. harzianum* 1 (Th1) e plantas controle (C). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Existem relatos que a ISR é regulada pelas vias de sinalização do ET e JA com a mediação de NPR1, mas sem a indução das PR1, PR2 e PR5 (Pieterse *et al.*, 2009). A sinalização do AS, e da proteína regulatória NPR1 foram identificadas como sendo importante nas respostas desencadeada por *T. hamatum* T382

subsequente à infecção por *B. cinerea* (Mathys *et al.*, 2012). *T. harzianum* 22 reprimiu a expressão de genes dependentes da via do AS em cinco diferentes cultivares de tomate após o desafio com *B. cinerea* (Tucci *et al.*, 2010). Existe evidências que sob indução da ISR, NPR1 foi induzida durante a ISR dependente da sinalização do JA desencadeada por *Piriformospora indica* (Stein *et al.*, 2008). Um mecanismo subjacente a ISR mediada por RPCPs na proteção contra o vírus do mosaico do pepino envolveu uma via de sinalização independente de NPR1 e AS, mas dependente de JA (Ryu *et al.*, 2004). Durante a SAR, NPR1 atua como coativador de transcrição dos genes PR; a ISR por *T. harzianum* ocorreu sem ativação dos genes PRs (Mathys *et al.*, 2012; Martínez-Medina *et al.*, 2013). Logo, o papel de NIM1/NPR1 na ISR é diferente do que em SAR.

Um processo que parcialmente dependeu da participação de NPR1, foi mostrado quando as plantas de *Arabidopsis* foram desafiadas com patógeno biotrófico *Pseudomonas syringae*, na qual levou a ativação da defesa mediada por AS e a repressão da via de JA, resultando em uma resposta de resistência eficaz contra este patógeno. Neste caso *Arabidopsis* colonizadas por *Pseudomonas syringae*, induziu a defesa mediada por AS, aumentando a suscetibilidade para o patógeno necrotrófico *Alternaria brassicicola* por supressão da via de sinalização de JA. No entanto, através da comunicação cruzada entre AS-JA mediada por NPR1, à sinalização de JA foi suprimido, o que tornou as folhas infectadas mais suscetíveis ao fungo *A. brassicicola* (Spoel *et al.*, 2007). No entanto se isso ocorrer de maneira sistêmica pode ter um efeito sobre a sobrevivência das plantas, por exemplo, um aumento na resistência a um invasor conduz a um aumento na suscetibilidade para outro invasor. Os resultados obtidos no presente trabalho através da expressão dos genes marcadores de AS, não indicaram a expressão gênica de NIM1/NPR1, portanto

a IR mediada por Th1 em tomate provavelmente é regulada por uma via de sinalização independente das respostas de defesa do AS.

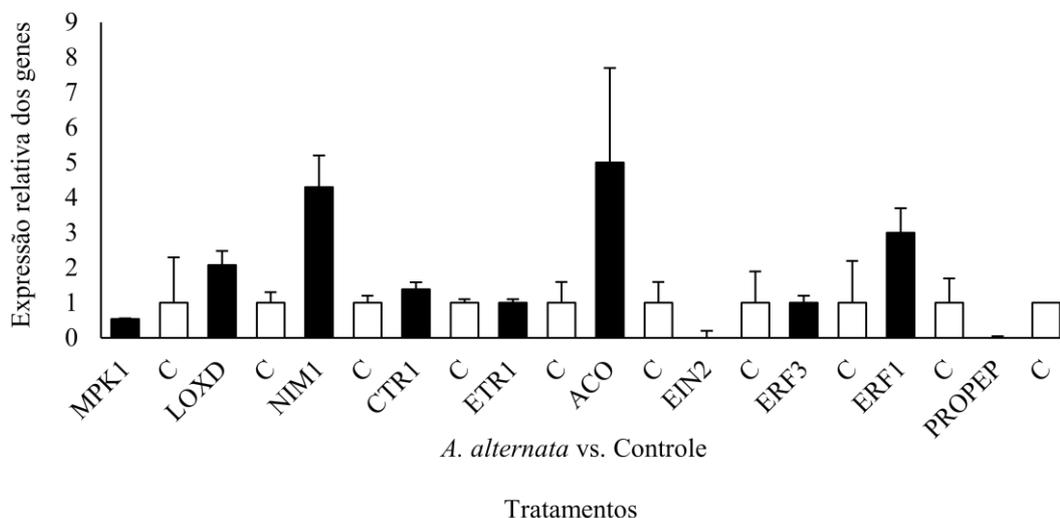


FIGURA 7. Valores de expressão relativa dos genes nas folhas de tomate: MPK1, LOXD, NIM1, CTR1, ETR1, ACO, EIN2, ERF3, ERF1 e PROPEP. As barras representam os valores de expressão. A figura representa os valores de expressão relativa (alteração em vezes em relação expressão as plantas controle, cujo valor da expressão é 1,0) avaliada por RT-qPCR. Ausência do asterisco indica que não houve diferença estatística significativa em relação ao controle, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam a média de três replicatas biológicas e triplicata técnica e as barras verticais o erro padrão da média para cada tratamento: plantas inoculadas com *A. alternata* e plantas controle (C). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Os resultados demonstraram o aumento significativo na indução de MPK1 nas plantas tratadas com Th1 em relação às plantas controle (Figura 6). No entanto, a expressão de MPK1 foi reprimida, não havendo diferença significativa nas plantas desafiadas com *A. alternata* em relação às plantas controle (Figura 7). Nas plantas previamente tratadas com Th1 a expressão de MPK1 se manteve reprimida após o desafio com *A. alternata*, porém não foi significativo na comparação com as plantas controle (Figura 8). O resultado da análise fenotípica mostrou que as plantas previamente tratadas com Th1 reduziram os sintomas de mancha de alternária.

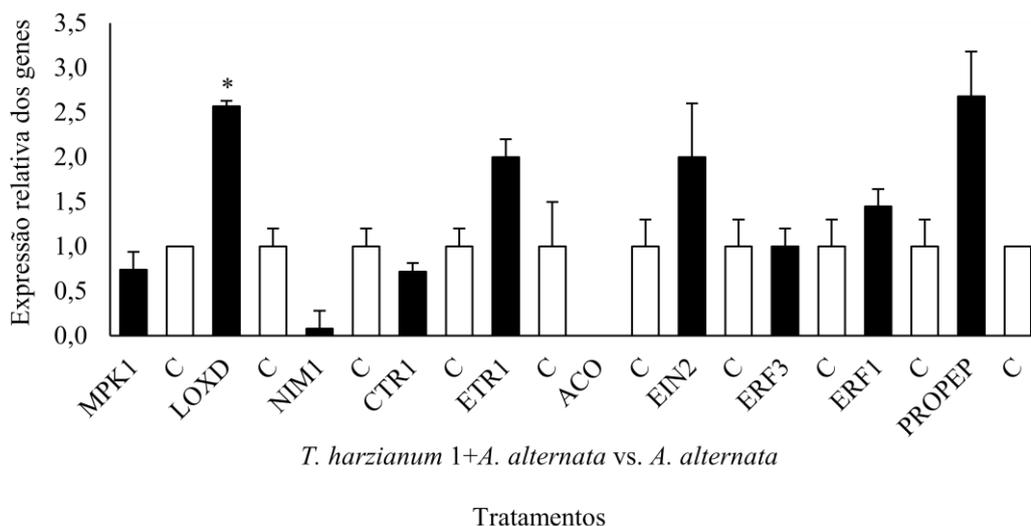


FIGURA 8. Valores de expressão relativa dos genes: MPK1, LOXD, NIM1, CTR1, ETR1, ACO, EIN2, ERF3, ERF1 e PROPEP. As barras representam os valores de expressão. A figura representa os valores de expressão relativa (alteração em vezes em relação expressão as plantas controle, cujo valor da expressão é 1,0) avaliada por RT-qPCR. Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam a média de três replicatas biológicas e triplicata técnica e as barras verticais o erro padrão da média para cada tratamento: plantas tratadas com *T. harzianum* 1 e inoculadas com *A. alternata* (Th1+Alt) e plantas inoculadas com *A. alternata* controle (Alt). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

MAMPs derivados de *T. harzianum* ativaram as respostas de defesa no início da ISR, ou seja, antes do desafio com o patógeno (Mathys *et al.*, 2012). A ativação da MAPK tem sido observada durante a resposta de defesa induzida por *Trichoderma* spp. (Shoresh *et al.*, 2006). As proteínas MAPKs são moléculas de sinalização envolvidas no *priming* de defesa. Em *Arabidopsis* o acúmulo de mRNA e proteínas inativas de MPK3/6 aumentou a habilidade de defesa contra *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) em plantas previamente tratadas com BTH (*S-METHYL-1,2,3-BENZOTHIADIAZOLE-7-CARBOETHIOATE*). Depois da infecção com *Pst*, o aumento dos níveis destes componentes de sinalização foi ativado, resultando o aumento da expressão do gene PR-1 e o desenvolvimento da imunidade sistêmica em plantas. Os autores propuseram que o acúmulo pré-estresse das enzimas de

sinalização MPK é um importante caminho para o fenômeno *priming* de defesa em plantas (Beckers *et al.*, 2009). A MPK provavelmente participa na indução de dois complexos bem conhecidos: proteínas WRKYs, que desempenham um papel importante na modificação da cromatina e MYC conhecido por ativar genes relacionados com a patogênese (Conrath, 2011; Mathys *et al.*, 2012). Após a percepção de MAMPs por PRRs é desencadeado um conjunto de defesas, incluindo alterações no fluxo de íons, ROS, ativação das MAPKs, produção de ET, deposição de calose, e extensas reprogramações transcricionais e alterações metabólicas (Mathys *et al.*, 2012). O envolvimento da MPK1 não foi demonstrado durante a IR por *T. harzianum* 1.

Os resultados mostram que a expressão do gene LOXD foi reprimida, contudo não houve diferença significativa nas plantas tratadas com Th1 em relação ao controle (Figura 6). A expressão de LOXD não foi significativamente induzida nas plantas inoculadas com *A. alternata* em comparação com as plantas controle (Figura 7). No entanto, a infecção de *A. alternata* em plantas pré-tratadas com Th1 resultou na indução muito mais forte das respostas de defesa através da expressão do gene relacionado com a defesa LOXD, nas folhas da planta de tomate em relação às plantas não tratadas (Figura 8).

O gene LOXD é uma enzima chave para a síntese de JA, ele codifica uma enzima da família lipoxigenase que é necessária para a produção de JA e defesa. O gene LOXD participa da oxidação dos fosfolipídios, proporcionando substrato para outras enzimas envolvidas na biossíntese de JA, como AOS (*ALLENE OXIDE SYNTHASE*) e HPL (*HYDROPEROXIDE LYASE*) (Lyons *et al.*, 2013). Além do gene LOXD, outras enzimas estão envolvidas na via do JA, incluindo AOC (*ALLENE OXIDE CYCLASE*), OPR3 (*OPDA REDUCTASE*), e JAR1 (*JASMONIC*

ACID-AMIDO SYNTHETASE), que são induzidos após o tratamento com JA ou por ferimentos (Browse, 2009). A expressão do gene LOXD tem sido verificada nas respostas a estresses bióticos, nas interações de suscetibilidade e na HR em plantas (Shibu *et al.*, 2013). Em tomate, a ativação do gene LOX foi associada com o aumento da defesa induzida por *Trichoderma* spp., possivelmente como consequência do efeito *priming*, na qual resultou no aumento da resistência contra *B. cinerea*, causada pela ativação das respostas mediada por JA (Tucci *et al.*, 2011). O resultado do presente estudo indica que a colonização por Th1 pode iniciar respostas de defesa sistêmica em tomate após a infecção por *A. alternata* e que a via JA está envolvida no *priming* de defesa por *T. harzianum*.

Em relação ao ET, não foi observada a indução significativa de ACO nas folhas das plantas tratadas com Th1 em relação ao controle (Figura 6). Uma resposta semelhante foi obtida após o desafio com *A. alternata*, na qual houve a indução de ACO em resposta a infecção por *A. alternata*, mas não houve diferença significativa em relação às plantas controle (Figura 7). Entretanto a expressão de ACO foi reprimida nas plantas tratadas com Th1 após inoculação com *A. alternata*, porém, não foi encontrada diferença significativa na comparação com as plantas controle (Figura 8). Os genes ACO regulam a biossíntese de ET, e os valores da expressão relativa de mRNA do gene ACO, sugerem que o controle transcricional deste gene contribui para a regulação e produção do ET (Broekaert *et al.*, 2005). Os resultados indicam que a colonização por Th1 nas raízes do tomate não induziu o gene codificante de enzima envolvida na biossíntese do ET, mas enzimas envolvidas na produção do JA, como a LOXD, foram induzidas. Este estado da planta é uma consequência das múltiplas interações entre os hormônios, e tem o efeito direto sobre os processos de IR mediado por Th1 e na patogenicidade de *A. alternata*.

Nenhuma diferença significativa na expressão dos genes ETR1, CTR1 e EIN2 foi observada nas folhas das plantas tratadas por Th1 em relação às plantas controle (Figura 6). As análises da expressão destes genes foram baixas para ETR1 e CTR1 e reprimida para EIN2 em resposta a *A. alternata* quando comparadas com as plantas controle (Figura 7). Finalmente, a expressão de CTR1 e EIN2 não foi significativamente induzida em resposta a *A. alternata* nas plantas previamente tratadas com Th1 em relação às plantas controle (Figura 8).

De acordo com Shores *et al.*, (2010), as proteínas ETR1 e CTR1 operam em conjunto para regular negativamente a via de resposta do ET na ausência do ET. A ligação ao receptor do ET, ETR, regula negativamente a atividade deste complexo, e, após ativação resulta na desrepressão da via do ET. A baixa expressão de ambos os genes inibe a regulação negativa da resposta do ET. Isso pode aumentar a sensibilidade ao ET nas folhas, levando a uma maior resposta de defesa após o desafio com patógenos. Recentemente foi demonstrado que *A. alternata* modula a síntese do ET para promover os sintomas em tomate (Zhang *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2013), a mesma via que leva a resistência para um grande número de patógenos. A colonização na raiz em *Arabidopsis* por RPCPs indutoras de ISR não aumentou a produção desses hormônios nos tecidos, e não induziu a expressão dos genes responsivos às vias de sinalização do JA-ET sugerindo que a ISR baseia-se na sensibilidade aumentada a esses hormônios, em vez do aumento da biossíntese de ambos os hormônios (Pieterse *et al.*, 2000). Em geral, a ISR mediada por rizobactéria benéficas não está associadas com a grande mudança na expressão de genes relacionados com a defesa (Pieterse *et al.*, 2002). Os resultados por RT-qPCR sugerem que os genes da biossíntese e percepção do ET não foram induzidos durante IR por Th1 contra *A. alternata* em tomate. Assim os mecanismos envolvidos no

controle da mancha de alternária por Th1 em tomate, parecem estar relacionados não só com a IR em plantas, mas também na capacidade de atenuar as perturbações hormonais causadas pela doença.

Os resultados demonstraram o aumento significativo na indução de ERF3 nas plantas tratadas com Th1 em relação às plantas controle (Figura 6). A expressão de ERF3 nas plantas desafiadas com *A. alternata* e nas plantas previamente tratadas com Th1 após desafiadas com *A. alternata* não foi significativa em relação aos respectivos tratamentos controle (Figura 7 e 8, respectivamente). Os fatores de resposta APETALA2/ET (ERF) são fatores de transcrição que desempenham um papel importante no desenvolvimento das plantas e nas respostas a estresses bióticos e abióticos, incluindo as infecções por patógenos (Licausi *et al.*, 2013). Os ERFs podem ser agrupados em diferentes classes e eles atuam como ativadores ou como repressores de transcrição de genes dependendo da sequência da região interna da proteína (Chen *et al.*, 2008; Licausi *et al.*, 2013). Em *Arabidopsis* o envolvimento de ERF1 e seus homólogos têm sido amplamente caracterizados em respostas a patógenos (Lorenzo *et al.*, 2003). O gene ERF3 são categorizados como classe II de ERFs, são proteínas regulatórias que atuam como repressoras de transcrição (Ohta *et al.*, 2001).

Nessa pesquisa, a expressão do gene ERF1 foi elevada nas plantas após a inoculação de *A. alternata*, não diferindo de forma significativa do controle (Figura 7). Recentemente foi relatada que o fator de resposta ERF regula a sinalização do ET durante a PCD desencadeada pela AAL toxina em *Nicotiana umbratica* (Mase *et al.*, 2013). Este fator de transcrição é conhecido por responder alterações nas vias do ET e JA em nível de expressão gênica em resposta AAL toxina (Zhang *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2013). Em *Thinopyrum intermediumis* a expressão relativa de TiERF1 foi

rapidamente induzida em resposta a *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium graminearum* e *Blumeria graminis* (Liang *et al.*, 2008). A expressão de ERF1 é induzida em resposta à via de sinalização do ET ou JA, ou ambos de forma sinérgica em *Arabidopsis* contra patógenos necrotróficos (Lorenzo *et al.*, 2003). Esses fatores de transcrição são conhecidos por permanecer inativo em condições livres de patógenos, mas fornece à planta a capacidade de reagir com uma resposta de defesa rápida na percepção de um patógeno.

A expressão de ERF1 não foi significativamente diferente nas plantas tratadas com Th1 em relação ao controle (Figura 6). Estudos relatam que a expressão constitutiva de ERF1 ativa a resposta de defesa e fortemente reduz a colonização por *Piriformospora indica* suprimindo os benefícios para a planta (Camehl *et al.*, 2009). Por outro lado, o fator de transcrição responsivo ao ET, ERF13 foi fortemente induzido durante a ISR mediada por *T. asperelloides* T203 contra o patógeno *Pst*-DC3000 em *Arabidopsis* apoiando que as respostas de ET é ativada por T203 (Brotman *et al.*, 2012). Em *Arabidopsis*, um grupo de fatores de transcrição da família AP2/ERF foi diretamente responsivo ao *priming* durante a ISR. Entre estes está o gene ERF1, que é o principal regulador na integração das vias de sinalização dependente do ET-JA (Van de rent *et al.*, 2009). A estabilidade de EIN regula o gene ERF1, que inicia uma cascata transcricional e resulta na ativação e repressão de centenas de genes (Solano *et al.*, 1998). O gene ERF1 é considerado um regulador positivo na resistência para necrotróficos, pois ele ativa os mesmos genes que reprimem MYC2 em respostas a infecções por agentes patogênicos e reprime aqueles que regulam MYC2 após ferimentos (Mengiste, 2012). MYC2 é o principal elemento de comutação para resolver o antagonismo da planta em optar entre a defesa e crescimento durante a colonização por *Trichoderma* spp. (Hermosa *et al.*, 2013). A

baixa expressão do gene ERF1 pode facilitar atividade transcricional de MYC2, que rapidamente contribui para ativação da sinalização de JA e defesa. Os resultados sugerem que as resposta de defesa regulada por ET não foram ativadas por Th1 durante a IR contra *A. alternata* em tomate. Portanto a IR mediada por Th1 em tomate contra *A. alternata* é regulada por uma via de sinalização independente de ET.

A expressão do gene PROPEP foi baixa após o tratamento com Th1, porém, não houve diferença significativa em relação ao controle (Figura 6). Após 48 hpi com *A. alternata*, expressão de PROPEP foi reprimida, não apresentando diferença significativa em relação ao controle (Figura 7). A indução de PROPEP foi verificada durante a IR, na qual a expressão de PROPEP foi de 2,7 vezes em relação às plantas controle, porém não houve diferença significativa (Figura 8). A expressão PROPEP pode resultar na produção de peptídeos que pode amplificar a sinalização para ambas as vias JA/ET. A via de sinalização PROPEP-AtPep-PEPR não só ajuda à sinalização do ET, mas também compensa a sua ausência aumentando a resistência das plantas em *Arabidopsis* (Tintor *et al.*, 2013). É possível que esses peptídeos, exerçam um papel durante a sinalização sistêmica em tomate, tanto para amplificar a sinalização de defesa, quanto manter os níveis de JA, ET e AS durante a sinalização de defesa local e sistêmica contra patógenos (Huffaker & Ryan 2007; Tintor *et al.*, 2013). Portanto a IR por Th1 contra *A. alternata* não afetou a expressão de PROPEP durante o fenótipo de IR para *A. alternata* em tomate.

5 CONCLUSÕES GERAIS

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

T. harzianum induz resistência nas plantas de tomate contra a mancha foliar causada por *A. alternata*.

Os tratamentos com etefon ou MeJA aumenta a suscetibilidade à *A. alternata*, porém MeJA desempenha um importante papel na defesa em tomate contra *A. alternata*.

A análise do desenvolvimento da doença nas plantas silenciadas para o gene ERF1 demonstrou que a via do ET não é importante na sinalização da IR por *T. harzianum* contra *A. alternata*.

A IR por *T. harzianum* é controlada pelas respostas do JA combinada com a atenuação da resposta do AS e da biossíntese do ET no aumento da resistência contra *A. alternata*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A verificação do padrão de expressão dos genes responsivos aos hormônios permite identificar genes que são induzidos durante as interações entre os três componentes, tomate, *T. harzianum* e *A. alternata*, isto revela componentes das vias de sinalização envolvidas na resistência induzida. Porém a apresentação de uma via de sinalização específica durante a IR por *T. harzianum*, bem mais detalhado, é através de ensaios de desenvolvimento dos sintomas utilizando múltiplas linhagens de mutantes deficientes e/ou transgênicas para as vias dos hormônios. Finalmente, este estudo identificou novos isolados capazes de eliciar a IR e que podem ser candidatos promissores na estratégia de controle biológico para proteger as plantas contra doenças.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. et al. Cytological and physiological basis for tomato varietal resistance against *Alternaria alternata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 93, p. 2315-2322, 2013.

ATANASOVA, L. et al. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC Genomics**, Londres, v. 14, p. 121-136, 2013.

BECKERS, G. J. et al. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 944-953, 2009.

BECKERS, G. J.; CONRATH, U. Priming for stress resistance: from the lab to the field. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, p. 425-431, 2007.

BROEKAERT, W. F. et al. The role of ethylene in host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 393-416, 2006.

BRANDWAGT, W. F. et al. Most AAL toxin-sensitive *Nicotiana* species are resistant to the tomato fungal pathogen *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 460-470, 2001.

BROTMAN, Y. et al. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. **Microbiology**, Londres, v. 158, p. 139-146, 2012.

BROTMAN, Y. et al. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS Pathogens**, Florida, v. 9: p. 1-15, 2013.

BROWSE, J. Jasmonate Passes Muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 183-205, 2008.

CAMEHL, I. et al. Ethylene signalling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and nonbeneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 185, p. 1062-1073, 2009.

CHEN, G. et al. Differential regulation of tomato ethylene responsive factor LeERF3b, a putative repressor, and the activator Pti4 in ripening mutants and in response to environmental stresses. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 165, p. 662-670, 2008.

CHUNG, K. R. Stress response and pathogenicity of the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*. **Scientifica**, Cairo, v. 2012, p. 1-17, 2012.

CONRATH, U. et al. Priming in plant-pathogen interactions. **TRENDS in Plant Science**, Londres, v. 7, p. 2010-2016, 2002.

CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **TRENDS in Plant Science**, Londres, v. 16, p. 524-531, 2011.

CONRATH, U. Priming of induced plant defense responses. In: VAN LOO, L. C. (Ed.). **Advances in Botanical Research**. London: Academic, 2009. v.51, p.331-395

CONTRERAS-CORNEJO, H.A. et al. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 6, p. 1554-63, 2011.

DEVELEY-RIVIERE, M. P.; GALIANA, E. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. **The New Phytologist**, Lancaster, v. 175, p. 405-416, 2007.

DUDLER, R. Manipulation of host proteasomes as a virulence mechanism of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 521-542, 2013.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

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.

ESHEL, D. et al. Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 3, p. 347-358, 2002.

FONTENELLE, A. D. B. et al. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp., **Crop Protection**, Arkansas, v. 30, p. 1492-1500, 2011.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo alto, v. 64, p. 839-63, 2013.

FU, Z.Q. et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. **Nature**, Londres, v. 486, p. 228-232, 2012.

GALUN, E. RNA silencing in plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Heidelberg, v.41, p. 113-123, 2005.

GARCIN, C. et al. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D. et al. (Org.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Nova Jérsei: Blackwell Publishing, 2007. p.109-123

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

GROGAM, R.G. et al. A stem canker disease of tomato by *Alternaria alternata* f.sp. *Lycopersici*. **Phytopathology**, California. v. 65, p. 880-886, 1975.

HARMAN, G. E. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 2, p. 43-56, 2004.

HERMANN, M. et al. The *Arabidopsis* NIMIN proteins affect NPR1 differentially. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-15, 2013.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, Londres, v.158, p. 17-25, 2012.

HERMOSA, R. et al. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **International Microbiology**, Barcelona, v. 16, p. 69-80, 2013.

HOLESKI, L. M. et al. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. **TRENDS in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 27, p. 618-626, 2012.

HÜCKELHOVEN R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 101-127, 2007.

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, p. 10732-10736, 2007.

JIA, C. et al. Multiple phytohormone signalling pathways modulate susceptibility of tomato plants to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 64, p. 637-650, 2013.

JONES, J. D; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, Londres, v. 444, p. 323-9, 2006.

KOROLEV, N. et al. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **BioControl**, Dordrecht, v. 53, p. 667-683, 2008.

LIANG, H. et al. A novel activator-type ERF of *Thinopyrum intermedium*, TiERF1, positively regulates defence responses. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, p. 3111-3120, 2008.

LICAUSI, F. et al. APETALA2/Ethylene responsive factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. **The New Phytologist**, Lancaster, v. 199, p. 639-649, 2013.

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

LIU, Z. et al. BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 6205-6210, 2013.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻Delta Delta C (T) method. **Methods**, Minneapolis, v. 25, 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. 165-178, 2003.

LORITO, M. et al. Translational research on *Trichoderma*: From 'omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 395-417, 2010.

LYONS, R. et al. Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview. **Plant Cell Reports**, Bruxelles, v. 32, p. 815-827, 2013.

MARTÍNEZ - MEDINA, A, et al. Deciphering the hormonal signaling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-12, 2013.

MASE, K. Ethylene signaling pathway and MAPK cascades are required for AAL toxin-induced programmed cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 25, p. 1015-1025, 2012.

MATHYS, J. et al. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 3, p. 1-25. 2012.

MENGISTE, T. Plant immunity to necrotrophs. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 267-94, 2012.

NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. **Biological Control**, Philadelphia, v. 67, p. 149-156, 2013.

OHTA, M. et al. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. **The Plant Cell**, Norfolk, v. 13. p. 1959-1968, 2001.

PERAZZOLLI, M. Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. **BMC Genomics**, Londres, v. 13, p. 660-679, 2012.

PIETERSE, C. M. et al. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p.123-34, 2000.

PIETERSE, C. M. et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, Cambridge, v. 5, p. 308-316, 2009.

PIETERSE, C. M. et al. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, Freiburg, v. 4, p. 535-544, 2002.

PIETERSE, C. M. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual review of cell and developmental biology**, Palo Alto, v. 28, p. 428-521, 2012.

PRASAD, V.; UPADHYAY, R. S. *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* and its toxin trigger production of H₂O₂ and ethylene in tomato. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 91, p. 103-108, 2010.

ROBERT-SEILANIANTZ, A. et al. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 317-343, 2011.

RODRIGUES, T.T.M.S. et al. In vitro production of conidia of *Alternaria solani*. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 35, p. 203-212, 2010.

RYU, C. M. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. **The Plant Journal**, Malden, v. 39, p. 381-392, 2004.

SAMOLSKI, L. et al., The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. **Microbiology**, Londres, v. 158, p. 129-138, 2012.

SCHNEIDER, D.J.; COLLMER, A. Studying plant-pathogen interactions in the genomics era: beyond molecular Koch's postulates to systems biology. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 457-479, 2010.

SHIBU, M. A. et al. *Trichoderma harzianum* ETS 323-mediated resistance in *Brassica oleracea* var. *capitata* to *Rhizoctonia solani* involves the novel expression of a Glutathione S-Transferase and a deoxycytidine deaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 60, p. 10723-10732, 2012.

SHORESH, M. et al. Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required for *Trichoderma*-conferred plant resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 142, p. 1169-1179, 2006.

SHORESH, M. et al. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 21-43, 2010.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, p. 71-78, 2002.

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

SONG, W. et al. Abscisic acid enhances resistance to *Alternaria solani* in tomato seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, p. 693-700, 2011.

SPOEL, S. H. et al. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. **Cell**, Cambridge, v. 137, p. 860-872, 2009.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Natural review: Immunology**, Londres, v. 12, p. 89-100, 2012.

STEIN, E. et al. Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1, **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 11, p. 1747-1751, 2008.

THOMMA, B. P. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 4, p. 225-236, 2003.

TIAN, D. et al. Roles of ethylene and jasmonic acid in systemic induced defense in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Helicoverpa zea*. **Planta**, Berlin, v. 239, p. 577-589, 2014.

TIAN, J. et al. TRV-GFP: a modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, p. 311-322, 2014.

TRIVILIN, A. P. et al. Components of different signalling pathways regulated by a new orthologue of *AtPROPEP1* in tomato following infection by pathogens. **Plant Pathology**, Londres, p. 1-9, 2014.

TRIVILIN, A. P. **Identificação e caracterização de genes de resistência a *Pythium dissotocum* em *Arabidopsis* e tomate**. 2012. 129 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

TSUGE, T. et al. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, Londres, v. 37, p. 44-66, 2013.

TUCCI, M. et al. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 12, p. 341-354, 2011.

UNVER, T.; BUDAK, H. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene 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 DE RENT, S. et al. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and beta-aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. **New Phytologist**, Lancaster, v. 183, p. 419-431, 2009.

VAN LOON, L. C. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **TRENDS in Plants Science**, Londres, v.11, p. 184-91, 2006.

VARGAS, W. A. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 151, p. 792-808, 2009.

WEßLING, R.; PANSTRUGA, R. Rapid quantification of plant-powdery mildew interactions by qPCR and conidiospore counts. **Plant Methods**, Londres, v. 8, p. 35-45. 2012

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

WOO, S. L. et al. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p.181-185, 2006.

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.

YU, M. et al. Methyl jasmonate-induced defense responses are associated with elevation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in *Lycopersicon esculentum* fruit. **Journal of Plant Physiology**. Stuttgart, v. 168, p. 1820-1827, 2011.

ZHANG, L. The involvement of jasmonates and ethylene in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin-induced tomato cell death. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 62, p. 5405-5418, 2011.

ZHAO, J. et al. Chilling stress-the key predisposing factor for causing *Alternaria alternata* infection and leading to cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf senescence. **Plos one**, São Francisco, v. 7, p.1-11, 2012.