

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

**IDENTIFICAÇÃO DO GENE *PROPEP1* EM *Nicotiana benthamiana* E SEU  
ENVOLVIMENTO NA RESISTÊNCIA A *Botrytis cinerea***

Julie Graziela Zanin  
Bióloga/UFRGS

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

Porto Alegre (RS), Brasil  
Maio de 2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Zanin, Julie Graziela  
IDENTIFICAÇÃO DO GENE PROPEP1 EM *Nicotiana benthamiana* E SEU ENVOLVIMENTO NA RESISTÊNCIA A *Botrytis cinerea* / Julie Graziela Zanin. -- 2014.  
98 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. Biotecnologia vegetal. 2. *Nicotiana benthamiana*. 3. silenciamento gênico. 4. peptídeo sinal. I. Moraes, Marcelo Gravina de, orient. II. Título.

JULIE GRAZIELA ZANIN  
Bióloga - UFRGS

## **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: 19.05.2014  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 06.01.2017  
Por

MARCELO GRAVINA DE MORAES  
Orientador - PPG Fitotecnia

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

VALMIR DUARTE  
PPG Fitotecnia/UFRGS

ELIANE ROMANATO SANTARÉM  
Dep. de Biologia Celular e  
Molecular - PUCRS

ANA PAULA TRIVILIN  
Universal Leaf Tabacos

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## DEDICO

*Aos meus queridos pais Alcindo e Jandira que foram sempre meus maiores incentivadores. Que me mostraram que com dedicação e trabalho alcançamos nossos sonhos. Meu eterno agradecimento por todo apoio e por todo amor.*

*Ao meu amor Jeferson, meu muito obrigado, por me compreender, me incentivar a não desistir, por todo carinho e por estar sempre ao meu lado.*

*A minha irmã Kelen, ao Jeferson e ao pequeno Arthur por compreenderem as ausências necessárias.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo em minha vida.

À minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao professor e orientador Marcelo Gravina de Moraes, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela paciência e por todo auxílio.

Aos atuais e antigos colegas e amigos do LFM: Guilherme, Gustavo, Leonardo e Aline. Em especial à Ana, Sara e Fernanda. A todas pelo companheirismo, pela amizade, pelos momentos de descontração necessários e apoio durante momentos difíceis. A Ana e a Sara pelos ensinamentos constantes ao longo dos quatro anos de laboratório.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade.

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

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

Aos meus amigos sempre presentes em todos os momentos: Jú, Ataíde, Kekê, Kéllin, Aline e Ká por compreenderem os momentos de ausência.

Às colegas de pensionato, em especial a Maria, que sempre me ajudou, mesmo que inconscientemente.

Às famílias Kelermann e Jesus por todo carinho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos que viabilizou a realização deste trabalho.

Enfim a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

# IDENTIFICAÇÃO DO GENE *PROPEP1* EM *Nicotiana benthamiana* E SEU ENVOLVIMENTO NA RESISTÊNCIA A *Botrytis cinerea*<sup>1</sup>

Autor: Julie Graziela Zanin

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

## RESUMO

O gene *PROPEP1* codifica o peptídeo sinal AtPep1 em *Arabidopsis thaliana* e está relacionado à amplificação de sinais de defesa. Este peptídeo aumentou a resistência de *A. thaliana* contra o patógeno necrotrófico *Pythium irregulare*, tendo sido caracterizados ortólogos deste peptídeo em milho, soja e tomate. Devido a sua importância na resistência de plantas a patógenos necrotróficos, o objetivo deste estudo foi caracterizar o gene *PROPEP* em *Nicotiana benthamiana* e sua importância na resistência a *Botrytis cinerea*. A partir das buscas *in silico*, foi encontrado um EST e a partir deste, dois genes, identificados como *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*. Estes genes possuem os 23 aminoácidos da região C-terminal de suas proteínas preditas idênticas entre si. Comparados a outras espécies, assemelhando-se em 39% com a sequência de *A. thaliana*, 60% com *Solanum tuberosum* e 65% com *Solanum lycopersicum*, indicando ser um possível peptídeo sinalizador. Estes genes foram avaliados quanto a sua expressão em diferentes órgãos e durante o desenvolvimento, apresentando mais alta expressão de *NbPROPEP1* na raiz e caule e *NbPROPEP2* no caule. Além disso, as plantas com 6 e 8 semanas foram aquelas com maior expressão de ambos os genes e redução em tempos mais avançados. Para investigar o possível envolvimento deste peptídeo na resistência a *B. cinerea*, foi empregado o método VIGS, a fim de silenciar a região correspondente ao peptídeo, bem como a síntese e infiltração do peptídeo em folha. O silenciamento resultou no aumento da lesão em folha, além da morte celular sistêmica. O peptídeo infiltrado resultou em níveis de expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* e média de lesão, semelhantes as encontradas nas plantas silenciadas. Plantas com os dois tratamentos juntos apresentaram o dobro de lesão. Os resultados obtidos indicam que os mecanismos induzidos em plantas silenciadas e infiltradas com o peptídeo sintético foram semelhantes, permitindo o avanço do patógeno e induzindo a expressão de genes envolvidos na defesa. Conclui-se que NbPep pode estar envolvido na resistência de *N. benthamiana* a *B. cinerea*, permitindo maior severidade da doença quando reduzido ou em excesso na planta.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98f.) Maio, 2014.

# IDENTIFICATION OF *PROPEP1* GENE IN *Nicotiana benthamiana* AND HIS INVOLVEMENT IN RESISTANCE TO *Botrytis cinerea*<sup>1</sup>

Author: Julie Graziela Zanin  
Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

## ABSTRACT

*PROPEP1* gene encodes the peptide signal AtPep1 in *Arabidopsis thaliana* and is related to the amplification defense signal. This peptide increase the resistance of *A. thaliana* against necrotrophic pathogen *Pythium irregular*. Orthologs of this peptide have been characterized in maize, soybean and tomato. Due to this importance in plant resistance to necrotrophic pathogens, the aim of this study was to characterize *PROPEP* in *Nicotiana benthamiana* and its importance in resistance to *Botrytis cinerea*. In silico search was found one EST and from this, two genes, identified as *NbPROPEP1* and *NbPROPEP2*. These genes have the 23 amino acid C-terminal region of their predicted proteins identical to each other. Compared to other species, resembling in 39 % with the sequence of *A. thaliana*, *Solanum tuberosum* with 60 % and 65 % with *Solanum lycopersicum* and could be a possible peptide signal. These genes were measured their expression in different organs and during development, with the highest expression of *NbPROPEP1* in the root and stem and *NbPROPEP2* in stem. In addition, the 6th and 8th week were those with higher expression of both genes and reduction in more advanced times. To investigate the possible involvement of this peptide in resistance to *B. cinerea*, VIGS was used in order to silencing the region corresponding to the peptide, the peptide synthesis and infiltration of the sheet. The silencing resulted in increase of leaf lesion and systemic cell death. The infiltrate peptide resulted in expression levels of *NbPROPEP2* and *NbPROPEP1* genes and average lesion, similar to that found in the silenced plants. Plants with two treatments together demonstrated double of lesion. The results indicate that the mechanisms induced in silencing and infiltrating with synthetic peptide were similar, allowing the advance of the pathogen and inducing the expression of defense genes. We conclude that NbPep may be involved in resistance of *N. benthamiana* to *B. cinerea*, allowing greater disease severity when reduce or excess in the plant.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (98p.) May, 2014.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Mecanismos de resistência de plantas a patógenos.....	3
2.1.1 Interação patógeno-hospedeiro.....	3
2.1.2 Peptídeos sinalizadores endógenos.....	5
2.2 Patógenos necrotróficos e sua relação com o hospedeiro.....	8
2.2.1 <i>Botrytis cinerea</i> .....	12
2.2 Genômica funcional.....	16
2.2.1 O uso de plantas modelo.....	16
2.2.2 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS).....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Material Vegetal.....	19
3.2 Isolado de <i>Botrytis cinerea</i> .....	19
3.2.1 Teste de patogenicidade e visualização de estruturas do fungo	20
3.2.2 Quantificação do patógeno por RT-qPCR.....	21
3.3 Busca e identificação do ortólogo do gene <i>AtPROPEP1</i> em <i>N. benthamiana</i> .....	22
3.3.1 Extração de DNA total.....	23
3.3.2 Extração de RNA total e síntese do cDNA.....	24
3.3.3 Eletroforese em gel de agarose.....	25
3.3.4 Clonagem do cDNA de <i>NbPROPEP</i> no vetor p-GEM T.....	25
3.3.5 Transformação genética de <i>Escherichia coli</i> .....	25
3.3.6 Extração de plasmídeos recombinantes.....	27
3.3.7 Reação de sequenciamento.....	28
3.3.8 Análise da expressão dos genes <i>NbPROPEP</i> .....	28
3.4 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS).....	29
3.4.1 Inserção do <i>NbPROPEP</i> no plasmídeo pTRV2b.....	29
3.4.2 Transformação genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	31
3.4.3 Agroinfiltração.....	32
3.4.4 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	34
3.5 Infiltração do peptídeo.....	34
3.5.1 Teste de concentração contra a doença.....	35
3.5.2 Teste de indução da expressão de <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> .....	35

3.6 Teste de patogenicidade das plantas silenciadas e/ou infiltradas com o peptídeo.....	36
3.6.1 Avaliação da doença.....	36
3.6.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Identificação do gene ortólogo de <i>PROPEP1</i> de <i>A. thaliana</i> em <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	38
4.1.1 Análise da expressão dos genes <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> nos diferentes órgãos da planta.....	41
4.1.2 Análise da expressão dos genes <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> ao longo do desenvolvimento.....	43
4.2 Teste de patogenicidade.....	45
4.2.1 Inoculação.....	45
4.2.2 Estruturas do patógeno.....	46
4.2.3 Quantificação do patógeno por RT-qPCR.....	47
4.3 Caracterização do papel de <i>NbPROPEP</i> na defesa de <i>Nicotiana benthamiana</i> à infecção por <i>Botrytis cinerea</i> .....	49
4.3.1 Silenciamento gênico induzido por vírus de <i>NbPROPEP</i> .....	49
4.3.2 Efeitos da agroinfiltração de TRV- <i>NbPROPEP</i> e TRV-SIPROPEP.....	50
4.3.3 Desenvolvimento da doença em plantas TRV- <i>NbPROPEP</i> e TRV-SIPROPEP inoculadas com <i>B. cinerea</i> .....	53
4.3.4 Análise da expressão gênica .....	57
4.4 Avaliação da importância do peptídeo <i>NbPep</i> para <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	60
4.4.1 Infiltração do peptídeo sintético e desenvolvimento da doença em plantas inoculadas com <i>B. cinerea</i> .....	60
4.4.2 Indução da expressão dos genes <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> pelo peptídeo sintético infiltrado.....	62
4.4.3 Infiltração do peptídeo sintético e desenvolvimento da doença por <i>Botrytis cinerea</i> .....	64
4.4.4 Análise da expressão gênica.....	68
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
7. APÊNDICES.....	81

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e qRT-PCR.....	23

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Comparação entre ortólogos de <i>AtPROPEP</i> .....	40
2. Expressão relativa dos genes <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> de <i>N. benthamiana</i> nos diferentes órgãos.....	42
3. Expressão relativa dos genes <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> em <i>N. benthamiana</i> ao longo das semanas de desenvolvimento.....	44
4. Folhas de <i>N. benthamiana</i> 2 dias após a inoculação em câmara úmida..	46
5. Folhas de <i>N. benthamiana</i> apresentando estruturas de <i>B. cinerea</i> .....	47
6. Avaliação da doença.....	48
7. Expressão relativa dos genes <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> em <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas com o vetor viral TRV-NbPROPEP.....	50
8. Clorose e morte celular em <i>N. benthamiana</i> .....	52
9. Área da lesão e expressão de <i>NbPROPEP1</i> em <i>N. benthamiana</i> .....	54
10. Relação da agroinfiltração de TRV-NbPROPEP, TRV-SIPROPEP e o peptídeo sintético em <i>N. benthamiana</i> .....	56
11. Área da lesão em folhas de <i>N. benthamiana</i> infiltradas com diferentes concentrações do peptídeo sintético NbPep.....	62
12. Expressão relativa de <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> infiltradas com NbPep.....	64
13. Expressão relativa de genes relacionados a defesa de plantas infiltradas com o peptídeo sintético ou infiltradas com TRV-NbPROPEP e o peptídeo.....	70

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Sequência do EST de <i>Nicotiana benthamiana</i> encontrado no banco de dados SolGenes.....	81
2. Sequenciamento de <i>Nicotiana benthamiana</i> identificado como <i>NbPROPEP1</i> , amplificado de DNA e RNA.....	82
3. Sequenciamento de <i>Nicotiana benthamiana</i> identificado como <i>NbPROPEP2</i> , amplificado de DNA e RNA.....	83
4. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor TRV com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R.....	84
5. Expressão relativa dos genes <i>NbPROPEP1</i> e <i>NbPROPEP2</i> em diferentes tempos após infiltração de NbPep.....	84

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADE – água destilada autoclavada/esterilizada

AS – ácido salicílico

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

cDNA - DNA complementar ao mRNA

Ct – Ciclo limiar

CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio

dNTPs – desoxirribonucleotídeos tri-fosfato

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido ET diamino tetracético

ET – etileno

ETI – Imunidade desencadeada pelos efetores

ETS – suscetibilidade desencadeada por efector

HR – resposta de hipersensibilidade

AJ – ácido jasmônico/jasmonato

LB – meio de cultura Luria-Bertani

mRNA – RNA mensageiro

MES - ácido 2-morfolino etanosulfônico

NB-LRRs – proteínas ligantes de nucleotídeos ricas em repetições de leucina

NCBI – National Center for Biotechnology Information

D/M/PAMPs – padrões moleculares associados ao dano/microorganismo/patógeno

pb – pares de bases

PCD – morte celular programada

PCR – reação em cadeia da polimerase

pGEM-T – vetor de clonagem

PR – proteínas relacionadas à patogênese

PRRs – receptores de reconhecimento de padrões

PTGS – silenciamento gênico pós-transcrição

PTI – Imunidade desencadeada pelas D/M/PAMPs

qPCR – PCR quantitativo

R – proteínas de resistência

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio

RT – transcriptase reversa

RT-qPCR - PCR quantitativa em tempo real

SDS - dodecil sulfato de sódio

SHR – resposta de hipersensibilidade sistêmica

SOLGENES – SOL Genomics Network

Taq – DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

TRV – Vírus Pedicular do Tabaco

VIGS – silenciamento gênico induzido por vírus

v:v – volume por volume

x g – força centrífuga relativa à aceleração padrão da gravidade

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são constantemente sujeitas a uma variedade de estresses bióticos causados por diferentes organismos como nematóides, bactérias, fungos e vírus. Devido a essa diversidade de interações, as plantas desenvolveram mecanismos para impedir ou limitar o desenvolvimento da doença. O processo de defesa inicia pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno, microrganismos em geral ou a danos à parede celular das plantas, denominados PAMPs, MAMPs e DAMPs, respectivamente. No caso de DAMPs, o reconhecimento pode tanto ocorrer através de partes da parede celular que são liberadas durante sua degradação ou por pequenas moléculas sinalizadoras, como fragmentos proteicos. A família de peptídeos efetores de planta (Peps) foi primeiramente encontrada em *Arabidopsis thaliana* com o peptídeo endógeno sinalizador AtPep1, o qual é proveniente da clivagem proteolítica de AtproPep1. Assim como este, outros seis genes parálogos com seus respectivos peptídeos foram identificados em *A. thaliana*. AtPep1 induz a expressão de genes envolvidos na resistência, além de conferir resistência ao oomiceto *Pythium irregulare*. Após a descoberta dos peptídeos endógenos e de seu envolvimento na sinalização através da amplificação de sinais de defesa em *A. thaliana*, outras espécies tem sido investigadas. Peptídeos com semelhanças estruturais e/ou funcionais ao AtPep1 já foram identificadas em milho, soja e tomate. Em todos os casos houve a relação positiva do peptídeo com a sinalização de defesa, bem

como um aumento na resistência das plantas a diferentes patógenos. Tais evidências mostram que o estudo de peptídeos sinalizadores é importante para o melhor conhecimento dos mecanismos de defesa desenvolvido pelas plantas durante sua interação com patógenos.

Técnicas de biologia molecular têm sido amplamente usadas para identificar a função dos genes nas plantas. O silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) é muito utilizado na espécie *Nicotiana benthamiana* devido à facilidade e rapidez na observação dos resultados fenotípicos.

Patógenos necrotróficos são aqueles que se nutrem dos tecidos mortos das plantas, através da liberação de toxinas que danificam as células e lhes auxiliam no processo de infecção. O fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, que causa o mofo cinzento em mais de 200 espécies de plantas, é capaz de gerar extensos danos e perdas pelo rápido desenvolvimento de necrose nas diferentes partes da planta. Seu controle é feito principalmente através do uso de fungicidas, pois não existem ainda espécies com resistência genética.

Devido à promissora descoberta dos peptídeos endógenos sinalizadores e seu envolvimento na resistência, além da escassez de conhecimento sobre mecanismos de resistência a patógenos necrotróficos, o objetivo deste estudo foi a identificação de ortólogos do gene *AtPROPEP1* em *N. benthamiana* e sua relação na resistência a *B. cinerea*.

### **Objetivos**

Identificar o gene ortólogo *PROPEP1* de *A. thaliana* em *N. benthamiana*.

Avaliar a expressão de *NbPROPEP* em *N. benthamiana*.

Verificar a importância de *PROPEP* na resistência de *N. benthamiana* a *B. cinerea* através do método VIGS e da infiltração do peptídeo sintético.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Mecanismos de resistência de plantas a patógenos**

#### **2.1.1 Interação patógeno-hospedeiro**

A interação entre patógenos e plantas é um dos fenômenos biológicos mais complexos, pois envolve uma variedade imensa de organismos causadores de doença, além de diferentes tecidos, vias de sinalização e síntese de metabólitos pela planta (Schneider & Collmer, 2010). Dentre os grupos de patógenos de plantas se destacam as bactérias e os fungos. As bactérias se proliferam no apoplasto após entrarem no tecido por aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou por ferimentos. Enquanto os fungos poderão entrar diretamente pela epiderme da célula, expandindo suas hifas sobre, entre e através das células do hospedeiro. Em alguns casos os fungos têm a capacidade de formar estruturas especializadas para a nutrição, os haustórios (Glazebrook, 2005; Jones & Dangl, 2006). Além disso, todos os patógenos têm a capacidade de sintetizar e liberar compostos, conhecidos como fatores de virulência. Esses fatores lhes favorecerão a infecção, sendo essenciais para a capacidade de colonização de algumas espécies (Jones & Dangl, 2006; Koeck *et al.*, 2011; Mengiste, 2012). Tais substâncias podem ser secretadas em meio extracelular, como alguns tipos de toxinas e efetores, ou serem diretamente injetadas nas células do hospedeiro. Alguns microrganismos são capazes também de produzir fitohormônios, os quais alteram e/ou controlam, até certo nível, algumas rotas celulares da planta (Robert-

Seilaniantz *et al.*, 2011). *B. cinerea*, por exemplo, apresenta a capacidade de sintetizar o ácido abscísico (ABA)(Sharon *et al.*, 2007).

Em resposta a invasão do patógeno, a planta inicia uma sequência de eventos para restringir e/ou impedir o avanço do patógeno: a primeira etapa é o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno, microrganismo ou a danos na parede celular (PAMPs, MAMPs ou DAMPs). Este reconhecimento ocorre através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), resultando na ativação da imunidade inata ou desencadeada por PAMPs (PTI), que é uma resposta de defesa fraca, mas que pode deter a colonização. Na segunda etapa o patógeno suprime a PTI através da liberação de efetores, que resulta na suscetibilidade desencadeada por efector (ETS). Na terceira etapa, a planta reconhece os efetores através de proteínas ligantes de nucleotídeos ricas em repetições de leucina (NB-LRRs), iniciando então a imunidade desencadeada por efector (ETI). A ETI confere resistência à doença além de, usualmente, desenvolver uma resposta de hipersensibilidade (HR) no local da infecção. Na quarta e última etapa o patógeno, através de mutações nos genes que codificam os efetores, supera a ETI. Por sua vez, a planta adquire novas proteínas R através de recombinações, a fim de reconhecer este novo efector. A terceira e quarta etapa podem repetir-se indefinidamente (Glazebrook, 2005; Jones & Dangl, 2006; Bouarab *et al.* 2009; Schneider & Collmer, 2010).

Os patógenos necrotróficos, que nutrem-se do tecido morto do hospedeiro, serão aqueles que poderão ter seu crescimento impedido durante a ativação da PTI (Lai & Mengiste, 2013). Por outro lado os biotróficos mantêm as células da planta vivas para nutrirem-se, sendo capazes de produzir os efetores para suprimir a PTI, resultando na sequência descrita de reações na planta e no patógeno.

Concomitantemente às etapas citadas, ocorre a liberação de hormônios que ativam a expressão e/ou repressão de genes na planta (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). A via hormonal controlada por ácido salicílico (AS) é geralmente associada à defesa contra patógenos biotróficos. Oposta a essa via, está a via do ácido jasmônico (AJ) e do etileno (ET), que são normalmente relacionadas à defesa contra necrotróficos (Lai & Mengiste, 2013). Este antagonismo afetará fortemente a resistência, pois o aumento de AS e, por consequência, a maior capacidade de defesa contra biotróficos, reduz os níveis de AJ e ET, reduzindo a resistência a necrotróficos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Thomma *et al.* (1998) demonstraram que plantas de *Arabidopsis thaliana*, alteradas para bloquear a sinalização por AS, perdem resistência ao biotrófico *Peronospora parasitica*, mas não tem efeito na resistência contra o necrotrófico *Alternaria brassiccola*. Em contrapartida, a infecção de *A. thaliana* com o biotrófico *Pseudomonas syringae*, que induz à defesa mediada por AS, torna as plantas mais suscetíveis ao patógeno necrotrófico *A. brassiccola*, pela supressão da sinalização de AJ (Spoel *et al.*, 2007). No entanto, estudos indicam que a via sinalizada por AS pode estar envolvida também na resistência da planta a patógenos necrotróficos, como apresentam Díaz *et al.* (2002). Tomateiros previamente tratados com AS exógeno são menos suscetíveis a *B. cinerea* (Díaz *et al.*, 2002). Devido a essas diferentes interações, a ação dessas rotas nas plantas motivam estudos que incluem a investigação das sinalizações envolvidas na biossíntese desses hormônios e principalmente as respostas que eles desencadeiam.

### **2.1.2 Peptídeos sinalizadores endógenos**

As primeiras repostas de defesa da planta são induzidas por PAMPs, MAMPs ou DAMPs. As DAMPs podem ser partes da parede celular da planta

liberadas durante o dano ao tecido, ou pequenas moléculas sintetizadas pela planta, como fragmentos de oligossacarídeos e proteínas. Além de induzirem a defesa, essas moléculas amplificam sinais através da retroalimentação controlada (Yamaguchi & Huffaker, 2011). O primeiro peptídeo sinalizador endógeno identificado foi a sistemina de tomate (*Solanum lycopersicum*), proveniente da proteína precursora, a ProSys. Esta proteína passa por processo de clivagem proteolítica para gerar o peptídeo. A sistemina induz o acúmulo de proteínas inibidoras de protease, que agem na defesa da planta contra herbívoros (Pearce *et al.*, 1991).

Além da sistemina, outro peptídeo com proteína precursora sem um sinal de secreção na região N-terminal é o AtPep1 (Yamaguchi & Huffaker, 2011). Huffaker *et al.* (2006a) isolaram um peptídeo endógeno de *A. thaliana* que ativa a expressão de genes de defesa durante a resposta desencadeada pela imunidade inata e o identificaram como AtPep1. Este peptídeo abrange os 23 aminoácidos finais da porção C-terminal da proteína precursora AtproPep1 expressa pelo gene *AtPROPEP1* após a detecção de PAMPs. Ou seja, após a percepção de PAMPs, ocorre a indução de expressão do *AtPROPEP1* em AtproPep1. A proteína é processada no peptídeo AtPep1, o qual é posteriormente transportado para o apoplasto onde interage com os receptores PEPR1 e PEPR2. Esta interação ativa a expressão de *PDF1.2* e do próprio *AtPROPEP1* através da via de sinalização AJ e ET. A ativação da expressão de *AtPROPEP1* por seu próprio produto (AtPep1) forma um mecanismo de retroalimentação que amplifica as vias de AJ e ET após o sinal inicial originado por PAMPs (Huffaker *et al.*, 2006a; Huffaker & Ryan, 2007). AtPep1 conferiu resistência ao oomiceto necrotrófico *Pythium irregulare* e suprimiu a proliferação da bactéria biotrófica *Pseudomonas syringae*

pv. tomato DC3000, ambos em *A. thaliana* (Huffaker *et al.*, 2006a; Yamaguchi *et al.*, 2010).

Huffaker *et al.* (2006a) constataram que *AtPROPEP1* pertence a uma família de genes classificada em 3 subfamílias em *A. thaliana*, identificados no GenBank (National Center of Biology Information). A subfamília I, que inclui *AtPROPEP1* (At5g64900), *AtPROPEP2* (At5g64890) e *AtPROPEP3* (At5g64905); a subfamília II que inclui *AtPROPEP4* (At5g09980), *AtPROPEP5* (At5g09990) e o gene não detalhado *AtPROPEP7*, e a subfamília III contendo o gene *AtPROPEP6* (At2g22000) (Huffaker *et al.*, 2006b).

Após a caracterização do AtPep1, outros peptídeos sinalizadores foram identificados e isolados em outras espécies de plantas. Em milho (*Zea mays*), foi encontrado o ZmPep1, um ortólogo funcional de AtPep1. Este peptídeo apresenta características conservadas na região C-terminal da proteína que lhe permite ser funcionalmente ativo e envolvido nas respostas de sinalização de defesa através das vias de AJ e ET, similar ao AtPep1 em *A. thaliana*. Além disso, folhas de milho previamente tratadas com ZmPep1 apresentaram uma redução no tamanho das lesões, bem como na morte celular quando inoculadas com o necrotrófico *Cochliobolus heterostrophus* e o hemibiotrófico *Colletotrichum graminicola* (Huffaker *et al.*, 2011).

Em soja (*Glycine max*), o peptídeo GmSubPep foi identificado devido a sua capacidade de alcalinização do meio de células em suspensão, uma característica geralmente associada a peptídeos sinalizadores. O gene que codifica este peptídeo não foi induzido por ferimento, AJ, AS ou ET, entretanto o peptídeo sintetizado induziu a expressão de genes reconhecidamente relacionados à defesa em cultura de tecidos de soja (Pearce *et al.*, 2010). Ainda em soja, Yamaguchi *et al.* (2011) identificou os menores peptídeos até então

encontrados em planta, GmPep914 e GmPep890 compostos de 8 aminoácidos e provenientes de uma pró-proteína, GmproPEP914 e GmproPEP890, respectivamente. Ambos os peptídeos, além de alcalinizarem o meio de cultura celular, induziram a expressão de vários genes de defesa, principalmente da rota de biossíntese de fitoalexinas (Yamaguchi *et al.*, 2011).

Em tomate foi também encontrado o ortólogo *SIPROPEP*, com características estruturais e funcionais semelhantes à *AtPROPEP1*, que codifica o peptídeo SIpep1. O silenciamento deste gene em tomateiro tornou as plantas mais suscetíveis à *Pythium dissotocum* e reprimiu a expressão de *ACS*, *ERF1*, *LOXD*, *PR-1*, *PR-5* e *DEF2* - genes relacionados com a defesa de plantas contra patógenos e com as vias de sinalização AJ/ET (Trivilin *et al.*, 2014). Adicionalmente, ortólogos de *AtPROPEP1* estão presentes em outras espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas, como arroz, trigo, cevada, canola, batata, uva, entre outras (Huffaker *et al.*, 2006).

Devido as características apresentadas pelos peptídeos sinalizadores, principalmente de *AtPROPEP1*, um estudo aprofundado de sua rota e principalmente em outras espécies de plantas podem oferecer uma alternativa para o controle de doenças de plantas ocasionadas por patógenos necrotróficos.

## **2.2 Patógenos necrotróficos e sua relação com o hospedeiro**

Patógenos necrotróficos são aqueles que matam as células do hospedeiro e a partir delas extraem seus nutrientes (Mengiste, 2012). Este grupo de patógenos é subdividido conforme sua interação com o hospedeiro: os necrotróficos com ampla variedade de hospedeiros (BHN), que são capazes de infectar diferentes espécies de plantas, e os necrotróficos hospedeiro-específicos

(HSN), que infectam apenas uma espécie, e que são capazes de produzir toxinas hospedeiro-específicas (HSTs) (Laluk & Mengiste, 2010; Mengiste, 2012).

O processo de infecção geralmente inicia-se na adesão ao hospedeiro, geminação e penetração, seguida da colonização com a formação das primeiras lesões, expansão e destruição do tecido. Após, inicia sua reprodução, incluindo a esporulação (Prins *et al.*, 2000). Antes e durante essa colonização do tecido, esses patógenos possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas, como celulasas e pectinases. Estas enzimas são conhecidas por degradarem a parede celular (CWDEs), permitindo ao patógeno o acesso aos nutrientes celulares (Dickinson, 2003; Laluk & Mengiste, 2010). Além destas enzimas, os patógenos produzem uma imensa variedade de compostos fitotóxicos, que podem ser essenciais para a capacidade de virulência e patogenicidade (Mengiste, 2012). Estes compostos podem também ser tóxicos em produtos utilizados para alimentação. Várias espécies de fungos produzem toxinas, como *Cochliobolus victoriae* (Wolpert *et al.*, 1985), *C. carbonum* (Walton, 2006), *Botrytis cinerea* (Valero *et al.*, 2008), *Pyrenophora tritici-repentis* (Pandelova *et al.*, 2012), *Penicillium sp.* (Bellí *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2008), *Fusarium oxysporum* (Laluk & Mengiste, 2010), *Rhizoctonia solani* (Laluk & Mengiste, 2010), *Alternaria alternata* (Gilchrist & Grogan, 1975; Markham & Hille, 2001), *Alternaria brassicicola* (Pedras *et al.*, 2009), entre outras. Essa diversidade de compostos, tanto produzidos e liberados pelo patógeno, como aqueles provenientes da degradação da parede celular da planta, é que irá desencadear o processo da PTI.

A fase inicial da doença causada por necrotróficos ativa diversas respostas imunes da planta, que envolve complexos eventos celulares, histológicos, bioquímicos e moleculares, e que juntos, limitam a proliferação do patógeno

(Mengiste, 2012). A principal característica neste processo é o surgimento da morte celular, que é em parte decorrente do efeito das enzimas liberadas pelo patógeno e pode também ser uma reação da planta, favorecendo os necrotróficos (Laluk & Mengiste, 2010). Existem patógenos que causam a morte celular pela alteração de mecanismos da planta, como é o caso de *B. cinerea*, que é capaz de induzir a expressão de genes de autofagia em *Arabidopsis*, gerando morte do tecido (Lai *et al.*, 2011).

Simultaneamente ocorre a formação e acúmulo de calose e modificações na parede celular no local da infecção, a fim de reforçá-la para evitar a proliferação do patógeno. Além destes mecanismos, a planta produz compostos como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e metabólitos secundários com ação antimicrobiana, que são amplamente chamados fitoalexinas (Mengiste, 2012). As ROS são sintetizadas pela planta para tentar evitar o crescimento do patógeno. Estas moléculas possuem ação antimicrobiana, e ao mesmo tempo agem como sinalizador de mecanismos de resistência, pois ao ser liberada no apoplasto, ativam os canais de  $Ca^{2+}$ . Este íon terá sua concentração aumentada e, além de induzir a “explosão” oxidativa, também irá causar várias respostas celulares, inclusive de defesa (Yoshioka *et al.*, 2009). Em geral, ROS facilita a morte celular e, devido a isso, beneficia o sucesso da infecção por necrotróficos, sendo que algumas espécies também possuem a capacidade de síntese de ROS (Mengiste, 2012). As fitoalexinas são um grupo heterogêneo de compostos, considerados marcadores moleculares de resistência a doenças, além de contribuírem efetivamente na defesa (Ahuja *et al.*, 2012). Podem ser citados exemplos importantes como a camalexina em *Arabidopsis*, escopoletina em solanáceas e resveratrol na videira, entre outros tipos de fitoalexinas produzidas em plantas após contato com o patógeno (Ahuja *et al.*, 2012).

Ainda durante o processo de infecção, temos a sinalização através de hormônios como o ET, AJ, AS e ABA, entre outros. A alteração homeostática destes hormônios pode encaminhar a planta à suscetibilidade ou resistência (Mengiste, 2012). O efeito sinérgico do AJ e ET na defesa contra necrotróficos foi verificado através de diversas evidências genéticas, bem como o antagonismo com a defesa sinalizada por AS. Porém, de forma independente, o AS pode estar envolvido na resistência a patógenos necrotróficos, como já relatado na defesa em diversas espécies de plantas a *B. cinerea* (Díaz *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 2007; El Oirdi *et al.*, 2011). O hormônio ABA está geralmente associado ao aumento de suscetibilidade da planta a patógenos necrotróficos como *Fusarium oxysporum*, *B. cinerea* e *Plectosphaerella cucumerina*. Mas também contribui para a defesa contra *Alternaria brassicicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Leptosphaeria maculans* (Laluk & Mengiste, 2012). Quanto a resistência genética, com exceção da proteína RLM3, uma proteína R envolvida na imunidade de *Arabidopsis* a vários patógenos necrotróficos (Staal *et al.*, 2008), não existem genes R associados à resistência a necrotróficos.

O processo de interação planta-necrotrófico apresenta diversas vias de infecção, por parte do patógeno, e de reconhecimento, por parte da planta (Mengiste, 2012). Essa complexidade acarreta em dificuldade de controle. Perdas de colheitas resultantes das doenças causadas por esses fungos são elevadas, mas as estatísticas sobre os danos totais são difíceis de obter. Apesar de considerável, grande perda de rendimento causada por fungos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*, relatado por Laluk & Mengiste (2010), representa apenas uma pequena fração do impacto econômico mundial de patógenos necrotróficos, não se sabendo, ao certo, a magnitude e prevalência do prejuízo causado por esses agentes. Assim, como resultado do alto custo do controle, bem

como da frequência de resistência a fungicidas, é importante haver um aumento na identificação da resistência genética a patógenos necrotróficos (Laluk & Mengiste, 2010). A caracterização de componentes celulares envolvidos na transdução de sinais e o entendimento do papel de sinais moleculares da defesa em plantas são de grande importância para um entendimento do reconhecimento do patógeno e a ativação de respostas de defesa na planta.

### **2.2.1 *Botrytis cinerea***

A espécie *B. cinerea* Pers. (teleomórfico *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) é um fitopatógeno necrotrófico não específico, capaz de colonizar mais de 200 espécies de plantas no mundo, entre elas importantes espécies cultivadas, podendo causar grandes perdas e danos em plantações e em frutos após sua colheita. Dentre as espécies estão videira, morangueiro, tomateiro, pepino, batata e tabaco (Williamson *et al.*, 2007; Zhang & Van Kan, 2013). Essa ampla gama de hospedeiros se deve a capacidade de *B. cinerea* em infectar diferentes partes da planta como folhas, flores, frutos, caules, e em alguns casos a parte superior da raiz, a base do caule e órgãos de armazenamento, como a cenoura (Droby & Lichter, 2007). Além disso, sua capacidade de sobreviver por extensos períodos e nas mais diversas faixas de temperatura, seja na forma de estrutura de resistência, o escleródio, ou de micélios e conídios, faz com que esta espécie seja um dos fungos patogênicos necrotróficos mais estudados e, ainda assim, com grande dificuldade de controle.

O processo de infecção de *B. cinerea* ocorre através da penetração da hifa ou do conídio por ferimentos, aberturas naturais, como os estômatos, e também diretamente, através da formação de apressório, que é distinto dos tipos clássicos encontrados em *Colletotrichum* ou *Magnaporthe* (Tenberge, 2007; Williamson *et*

*al.*, 2007). Após penetrar no tecido do hospedeiro, através do tubo germinativo do conídio, haverá a liberação de enzimas para degradação do tecido, como cutinases e lipases, que acarretará na morte celular, formando a primeira lesão. Com a expansão da lesão, e conseqüentemente, colonização pelas hifas, haverá a esporulação, permitindo a dispersão dos novos conídios (van Kan, 2006; Holz *et al.*, 2007). Durante este processo, assim como grande parte dos patógenos necrotróficos, há liberação de metabólitos fitotóxicos, sendo a toxina botrytial a mais conhecida e estudada (Nakajima & Akutsu, 2013). Devido as suas características, este patógeno é a segunda espécie mais estudada em pesquisas moleculares (Dean *et al.*, 2012) na interação com diferentes hospedeiros.

Nessa relação planta-patógeno, várias pesquisas foram feitas relacionando as principais vias hormonais – ET, ácido salicílico (AS) e do ácido jasmônico (AJ) – com a defesa a *B. cinerea* em diferentes espécies. Classicamente, a sinalização por AS está envolvida na resistência a biotróficos e hemibiotróficos, enquanto que a combinação de AJ e ET sinalizam a resistência contra patógenos necrotróficos (Rowe *et al.*, 2010; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). No entanto, essa relação não é encontrada na defesa contra *B. cinerea*.

Diaz *et al.* (2002) verificaram a influência do ET e do AS na resistência de tomate à *B. cinerea*. Neste estudo, quando tomateiros foram tratados simultaneamente com ET e AS exógenos apresentaram menor suscetibilidade a *B. cinerea*, do que quando os hormônios foram aplicados separadamente. O ET acelera a senescência em folhas, estimulando o desenvolvimento de necrose, que, por sua vez, facilitaria a disseminação do patógeno (Diaz *et al.*, 2002).

A indução de resistência a *B. cinerea* pelo tratamento com AS foi também relatado em feijão (Meyer & Höfte, 1997) e em tabaco (Murphy *et al.*, 2000). El Oirdi *et al* (2011) mostraram que *B. cinerea* produz um exopolissacarídeo (EPS),

considerado um fator de virulência chave, que ativa a rota do AS em plantas de tomate. Esse acúmulo suprime a sinalização por AJ após sua síntese, através da manipulação do NPR1, que está envolvido na supressão da sinalização de AJ mediada por AS (El Oirdi *et al.*, 2011).

Em *A. thaliana*, a resistência à *B. cinerea* envolve a contribuição das rotas mediadas por AJ e ET, enquanto que a via do AS não apresenta efeitos significativos. Plantas mutantes insensíveis a AJ apresentaram maior suscetibilidade à *B. cinerea*, enquanto que mutantes insensíveis na resposta por AS foram tão resistentes quanto às selvagens (Thomma *et al.*, 1998). Já as plantas de *Arabidopsis* mutantes defectivas na rota de sinalização do foram mais suscetíveis à *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1999).

Outros fitohormônios têm sido estudados na interação com *B. cinerea*, inclusive mostrando a capacidade do patógeno em produzir tais hormônios, como é o caso do ABA (Sharon *et al.*, 2007). Beyers *et al.* (2014) concluíram, a partir de estudos em tomate, que a resistência absoluta a *B. cinerea* não depende das vias de sinalização principais apenas, mas da combinação entre elas, que pode apresentar grandes variações conforme o hospedeiro (Diaz *et al.*, 2002; Beyers *et al.*, 2014).

Outros compostos produzidos pela planta durante o processo de resistência foram estudados quanto a sua capacidade de ação contra *B. cinerea*. Os metabólitos secundários denominados fitoalexinas são os mais conhecidos, pois são produzidos em diferentes espécies de plantas, com ação antimicrobiana já conhecida (Van Baarlen *et al.*, 2007). Em tabaco, por exemplo, podem aumentar a resistência à *B. cinerea* a partir da inibição da germinação do esporo (El Oirdi *et al.*, 2010).

Os oligogalacturonídeos (OGAs), liberados da parede celular da planta durante a invasão de patógenos, também induzem várias respostas de defesa no hospedeiro. No estudo de Ferrari *et al.* (2007), foi verificado que os OGAs aumentaram a resistência em *Arabidopsis* contra *B. cinerea* independentemente da sinalização mediada por AJ, AS e ET.

A sistemina, encontrada em espécies da família *Solanaceae*, como tomate, batata, pimenta e fumo, é outro destes compostos (El Oirdi *et al.*, 2011). Este oligopeptídeo está envolvido na resistência de tomate à *B. cinerea*, independentemente da via do ET (Diaz *et al.*, 2002). Além destes, foi encontrada uma atividade inibitória causada por proteínas PR extracelulares no crescimento das hifas de *B. cinerea in vitro*. Porém na planta a indução de tais proteínas ocorreu em baixos níveis, levando os autores a sugerir que a infecção agressiva de *B. cinerea* pode ter causado a morte das células do hospedeiro antes que a resposta de defesa pudesse ter ocorrido (Murphy *et al.*, 2000).

Além desse envolvimento de diferentes compostos na defesa, o modo de infecção de *B. cinerea* pode estar envolvido na capacidade do hospedeiro em ativar suas rotas de defesa. Como é o caso da espécie *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana, que apresentou sintomas mais severos da doença quando infectada com fragmentos de meio contendo micélio do que quando inoculada com esporos. Os autores sugerem que o maior acúmulo de escopoletina, que é um metabólito antimicrobiano sintetizado pelo tabaco, e de proteínas PR nas plantas inoculadas com esporos, é parte da resposta. Além disso, o micélio do fungo é capaz de metabolizar a escopoletina e de produzir mais proteínas de virulência efetivas, dessa forma causando mais sintomas da doença (El Oirdi *et al.*, 2010).

Todos estes estudos apresentados demonstram que a planta pode usar diversas rotas e compostos na tentativa de impedir a infecção por *B. cinerea*.

Devido a isso, o controle da doença através de resistência genética é considerado muito difícil de ser alcançado. Atualmente, o controle através do uso de químicos continua sendo o principal meio de reduzir a ocorrência de *B. cinerea* nas principais culturas, devido à ausência de cultivares resistentes (Nakajima & Akutsu, 2013). O mais comum é o uso de fungicidas por pulverização das partes aéreas da planta e também nos frutos após sua colheita (Leroux, 2007). Porém, o uso intensivo de fungicidas, como o benzimidazol e a dicarboximida, levou a uma rápida seleção de linhagens resistentes em vários países (De Miccolis Angelini *et al.*, 2014a). Conforme o caso, a aplicação de múltiplos fungicidas, intercalados numa mesma estação, é indicada para evitar o surgimento de resistência (Williamson *et al.*, 2007; De Miccolis Angelini *et al.*, 2014b).

Por essas razões, existe a necessidade de uma maior compreensão da interação de *B. cinerea* com seus hospedeiros específicos. O custo para gerar um novo fungicida é tão grande que apenas as principais culturas atraem interesse suficiente para isso (Williamson *et al.*, 2007). Para desvendar essa complexidade é necessário entender melhor o papel de diferentes vias de resistência da planta, e, especialmente, os métodos pelos quais *B. cinerea* interfere e explora os sistemas de defesa de plantas para o seu próprio benefício (Williamson *et al.*, 2007).

## **2.2 Genômica funcional**

### **2.2.1 Uso de plantas modelo**

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, cada vez mais sofisticadas e caras, é necessário seu uso de forma mais eficiente facilitada pelo uso de organismos modelo (Dickinson, 2003). O uso de plantas modelo para estudos de rotas metabólicas e principalmente para descoberta de genes e outros

fatores relacionados à resistência em plantas é devido à facilidade de manutenção e ciclo de vida mais curto (Dickinson, 2003). Dentre as espécies de planta modelo mais utilizadas em estudos estão *Arabidopsis thaliana* (Dickinson, 2003; Burch-Smith *et al.*, 2006; Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker & Ryan, 2007; Laluk & Mengiste, 2010) e *Nicotiana benthamiana* (Dean *et al.*, 2005; Goodin *et al.*, 2008; Lico *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2010; Schneider & Collmer, 2010).

*N. benthamiana* é uma espécie suscetível a uma ampla variedade de fitopatógenos, tornando-a importante nos estudos de interação planta-patógeno, principalmente em estudos da imunidade inata e sua sinalização (Zhu *et al.*, 2012). Seus primeiros usos foram no estudo de doenças causadas por vírus. Posteriormente tornou-se popular em outras áreas devido ao avanço tecnológico, principalmente de três técnicas: a expressão local de genes externos à planta através do uso de vetores, a técnica de VIGS e a agroinfiltração. A expressão local, por exemplo, é utilizada para visualização de proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes como a proteína verde fluorescente (GFP), através de sua expressão transiente que permite localização celular (Goodin *et al.*, 2008). Estas ferramentas têm sido muito utilizadas em *N. benthamiana* e pouco em *A. thaliana*, a planta mais utilizada no estudo de genética molecular (Burch-Smith *et al.*, 2006).

### **2.2.2 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)**

Em plantas, o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) é um importante e eficiente mecanismo natural de defesa contra a infecção viral (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). As plantas de interesse podem ser infectadas por vírus recombinante, induzindo o mesmo mecanismo natural de defesa, que por sua vez terá como alvo o RNA correspondente ao transgene inserido (Voinnet, 2001). Dessa forma, a técnica de VIGS permite o estudo da função de

genes por meio da utilização de vetores virais, nos quais é inserido um fragmento de interesse para formar o RNA dupla fita (dsRNA) (Unver & Budak, 2009). Após a formação do dsRNA, este é clivado em fragmentos de 21 a 26 nucleotídeos pela DICER, uma enzima com domínios de RNase III. Estes fragmentos resultantes, denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs), são incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que irá degradar os RNAs mensageiros (mRNAs) que possuam identidade com a sequência do siRNA (Baulcombe, 2004; Unver e Budak, 2009).

Diversos autores relatam o sucesso do silenciamento de genes, em espécies do gênero *Solanum*, através da utilização do vetor baseado em TRV (Hartl *et al.*, 2008; Jablonska *et al.*, 2007). Velásquez *et al.*(2009) estabeleceram um protocolo de silenciamento utilizando TRV em tomateiro e em *N. benthamiana*, onde apresentam o silenciamento do gene da fitoeno desaturase (*PDS*), o qual codifica uma enzima que catalisa as reações iniciais na conversão do fitoeno em carotenóides coloridos. As plantas silenciadas apresentam fotobranqueamento característico que pode ser usado como controle do método. Outros autores já utilizaram TRV para silenciamento em *N. benthamiana* (Senthil-Kumar *et al.*, 2007; Senthil-Kumar & Myrose, 2011) e em outras solanáceas. Senthil-Kumar & Myrose (2011) utilizaram VIGS em *N. benthamiana* e tomate, através do uso de TRV, para genes marcadores que provocavam fenótipo visível, incluindo o gene *PDS*. Os autores relataram a capacidade do silenciamento gênico ocorrer por mais de dois anos, pela transmissão de VIGS para a progênie via semente. Essa capacidade pode facilitar estudos de genes relacionados ao desenvolvimento da planta e a sua resistência a estresses (Senthil-Kumar & Myrose, 2011).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Material vegetal**

As sementes de *Nicotiana benthamiana* foram desinfestadas por 5 min em álcool etílico 70%, 5 min em hipoclorito de sódio 1,75%, acrescido de 0,1% de Tween-20 seguidas de cinco lavagens com água destilada e autoclavada (ADE) (Steenkamp, 2011). Em seguida foram dispostas em copos de 400 mL contendo substrato comercial (Garden Plus®) previamente autoclavado e vermiculita expandida (Carolina Soil®) na proporção 2:1, respectivamente. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 h de luz por um período específico, conforme cada experimento.

### **3.2 Isolado de *Botrytis cinerea***

O isolado de *B. cinerea* utilizado neste trabalho foi coletado de *Petunia hybrida* e faz parte da coleção do Laboratório de Fitopatologia Molecular, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS. O isolado foi mantido em meio de cultivo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) em placas de Petri, contendo 2% sacarose, 2% ágar e 30% de caldo de batata.

### 3.2.1 Teste de patogenicidade e visualização de estruturas do fungo

Para o teste de patogenicidade foram preparadas duas metodologias: um inóculo a partir de uma suspensão de esporos e outro constituído de micélio em um cilindro de BDA com 5 mm de diâmetro do isolado de *B. cinerea*, denominado plug. Para o método de suspensão de esporos, um plug de BDA com micélio foi transferido para uma placa de Petri contendo BDA e mantido sob fotoperíodo de 16 h de luz por 21 dias, a  $25 \pm 2$  °C. Esta placa foi então lavada com 3 mL de ADE para retirada dos esporos e a suspensão foi observada em microscópio, com uso da câmara de Neubauer, para contagem de esporos. Foram utilizadas as concentrações de  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> aplicadas de dois modos distintos: 10 µL aplicados sobre a face adaxial na forma de gota ou 50 µL aplicados com um pincel também na face adaxial. O método de plug com micélio, também utilizado no item 3.6, foi realizado conforme Oirdi *et al.* (2011). Um plug foi transferido para uma nova placa de Petri contendo BDA, que foi mantida sob fotoperíodo de 16 h de luz por 7 dias, a  $25 \pm 2$  °C. Após este tempo, foram retirados plugs e depositados cuidadosamente sobre a face adaxial da folha, com a superfície contendo micélio em contato direto com a superfície da folha. Estas folhas foram mantidas em câmara úmida, que consistiu em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com 1,5 mL de ADE. As folhas foram mantidas acima do papel filtro com suportes de madeira e as placas foram vedadas com parafilme e mantidas sob fotoperíodo de 16 h de luz a  $22 \pm 3$  °C. Os sintomas foram observados diariamente e as folhas foram fotografadas entre 2 e 3 dias após a inoculação. Algumas folhas, três dias após a inoculação, foram descoloridas em metanol 100% por 24 h, coradas com azul de Trypan 0,5% (2,125 g de NaCl, 1,25 g de Azul de Trypan e 250 mL de água) e observadas em microscópio óptico.

### 3.2.2 Quantificação do patógeno por RT-qPCR

As folhas provenientes da câmara úmida foram avaliadas quanto ao crescimento do patógeno através da RT-qPCR. Para isso, algumas folhas foram separadas para extração de RNA total e síntese de cDNA (itens 3.3.2 e 3.3.3, respectivamente). Foi realizada a análise da expressão do gene de actina (*Bcactin*), um marcador de crescimento ativo de *B. cinerea* (Diaz *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2013). A expressão relativa de *Bcactin* foi determinada através da quantificação de mRNA, por meio de PCR quantitativo em tempo real – RT-qPCR. Nesta etapa incluiu os oligonucleotídeos iniciadores para o gene endógeno (*NbEF-1α*) e *Bcactin* (Tabela 1) . A RT-qPCR consistiu de 4 µL de cDNA diluído 40 vezes; tampão 1X (Invitrogen); 2mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; SYBR® Green (Invitrogen) diluído 10000X; 0,2 µL de ROX (Invitrogen); 0,25 U de Platinum® Taq e 3,05 µL de água ultrapura para completar o volume de 10 µL. As reações em tempo real foram executadas em um sistema de detecção de sequência modelo 7300 Applied Biosystems, com as seguintes condições: 2 min a 50 °C; 10 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Ao final destes ciclos foi realizada a etapa de dissociação que consistiu de 15 s a 95 °C; 1 min a 60 °C; 15 s a 95 °C; 15 s a 60 °C. A especificidade da reação foi verificada através de gel de agarose e pela curva de dissociação. O limiar de fluorescência foi estabelecido automaticamente pelo programa 7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4 (Applied Biosystem), bem como o cálculo de ciclo limiar (Ct) de cada reação. Os valores de Ct gerados foram exportados para o programa “Excel” (Microsoft). A quantificação relativa do gene de interesse em relação ao gene endógeno foi determinada conforme a função  $\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{gene endógeno}}$ . A média das plantas coletadas na segunda semana foi utilizada como padrão (calibrador) na

comparação ao longo do tempo e a média das folhas na comparação entre diferentes órgãos. Para isso foi utilizada a função  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (plantas na semana específica/órgão específico ou tratada) –  $\Delta Ct$  (plantas da primeira coleta/folha ou controle). Finalmente, a abundância de transcritos de cada gene foi determinada pela fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Todas posteriores análises de expressão relativa por RT-qPCR foram conduzidas nas mesmas condições aqui citadas, mudando apenas os oligonucleotídeos iniciadores.

### **3.3 Busca e identificação do ortólogo do gene *AtPROPEP1* em *Nicotiana benthamiana***

A busca do ortólogo do gene *AtPROPEP1* em *N. benthamiana* foi realizada com base nas sequências previamente descritas em *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* e *S. tuberosum*, através da comparação com sequências depositadas no GenBank (NCBI, Bethesda, MD, EUA) e nas bases de dados Sol Genomics Network (Bombarely *et al.*, 2011) e “The *Nicotiana benthamiana* Sequencing Consortium” [<http://www.benthgenome.com>], utilizando os programas BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul *et al.*, 1997)] e Genomatix-Software Suite v3.0 [<http://www.genomatix.de/>].

Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* (Tabela 1) foram projetados, sempre que possível, com localização nas regiões codificantes, as quais foram identificadas por meio do alinhamento entre as sequências das espécies citadas no item 3.3. Foram incluídos sítios para as enzimas de restrição *HpaI* e *EcoRI* nos oligonucleotídeos iniciadores para permitir a clonagem direcional da seqüência de cDNA no vetor viral TRV. A PCR para amplificação de partes dos genes foi composta de tampão 1X (Invitrogen), 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,1 mM de cada dNTP; 0,5  $\mu M$  de cada oligonucleotídeo

iniciador; 1 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) e 4 µL de DNA ou cDNA diluído 40 vezes, sendo o volume final ajustado com água ultrapura para 10 ou 20 µL. A reação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, pareamento a 60 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min, seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados pela comparação com o perfil eletroforético do marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen) em gel de agarose a 2% em TBE 1X. Os produtos da amplificação foram sequenciados e utilizados para inserção no plasmídeo pGEM-T© Promega®, conforme descrito posteriormente no item 3.3.4.

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCR e qRT-PCR.

	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
NbPROPEP_1	TGGTTAACAAAGAGAGAGGGTCGAGG TGAG	ATGAATTCGCGACTCTGGTTTTGGAGA
NbPROPEP_2	TGGTTAACCGAGAGAGAGCTCGAGT TGAT	ATGAATTCGACATACTAGAAGATGAAG
NbPep2_TRV	TGGTTAACAGGGGAAGAACCACC AAGACC	ATGAATTCGTTCTGAGGAGGACTTCCT CTACT
NbEF-1α <sup>1</sup>	CTGATTATTGACTCCACCACTG	CATCTTGTTACAGCAGCAAATC
NbPR1a	CAAGACTATTTGGATGCCCAT	TGACCATGAGAATGTACGAGG
NbACO1 <sup>2</sup>	ATGCTTGTGAGAACTGGG	GCCACCAATTCTTTAAATCTC
NbETR1	CTTGATCTTTCAAGGCTTGA	CACAGATGCAATAGGCTTG
NbERF1 <sup>3</sup>	CGGCTCAAACATGCGTAAGC	TACAGTAACATCTGGAGGTTCCAAC
Bcactin	GACCTTCAACGCCCTGCATT	TGGAACAACGTGAGTAACTCCG
TRV	GAGCATAATTATACTGATT	CGAGAATGTCAATCTCGTAGG

\* As sequências em destaque representam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI* inseridos nos oligonucleotídeos iniciadores.

1 - Sequências obtidas (total ou parcialmente) do estudo de Shibata *et al.*, 2010;

2 - Sequências obtidas (total ou parcialmente) do estudo de Shan & Goodwin, 2006.

3 - Sequências obtidas (total ou parcialmente) do estudo de Todd *et al.*, 2010.

### 3.3.1 Extração de DNA total

O DNA de *N. benthamiana* foi extraído de aproximadamente 100 mg de tecido foliar pelo método CTAB, adaptado de Murray & Thompson (1980). Aproximadamente 100 mg de tecido foi triturado junto ao nitrogênio líquido. Em

seguida foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de tampão de extração CTAB (CTAB, 55 mM; Tris, 100 mM pH 8,0; EDTA, 10 mM; NaCl, 0,7 M) e 15  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 2 min, incubada a 65°C durante 30 min e, posteriormente, acrescentados 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v:v). A mistura foi novamente homogeneizada vigorosamente por 1 min e centrifugada por 10 min a 16000 x g em temperatura ambiente. A fase líquida sobrenadante foi transferida para um novo tubo ( $\approx$  500  $\mu\text{L}$ ), na qual foi adicionado igual volume de isopropanol (500  $\mu\text{L}$ ) e 50% do volume de acetato de amônio 7,5 M (250  $\mu\text{L}$ ). Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 16000 x g em temperatura ambiente. A fase sobrenadante foi desprezada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% por duas vezes, centrifugado por 5 min a 16000 x g, seco a 65 °C e solubilizado em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. O material extraído foi armazenado a – 20 °C.

### **3.3.2 Extração de RNA total e síntese do cDNA**

O RNA total foi extraído de aproximadamente 100 mg de tecido foliar triturado junto ao nitrogênio líquido. Ao tecido triturado foi acrescentado 1 mL de TRI Reagent® (Ambion) e a extração foi procedida conforme as instruções do fabricante. O RNA foi então submetido à reação com a enzima DNase I (RQ1 RNase-Free DNase – Promega) de acordo com o protocolo do fabricante.

A reação de síntese de cDNA foi composta de aproximadamente 250 ng de RNA total tratado com DNase I; tampão 1X da GoScript™; 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen); 1,3  $\mu\text{M}$  de oligo(dT) (5'- TTT TTT TTT TTT TTT T - 3'); 6 U de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) e 48 U de GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega),

totalizando um volume de 6  $\mu$ L que foi submetido às seguintes condições: 5 min a 25 °C, 1 h a 42 °C e 15 min a 70 °C.

### 3.3.3 Eletroforese em gel de agarose

A concentração e qualidade de RNA total extraído, bem como dos plasmídeos, foi estimada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 0,8%, contendo o tampão TBE 1X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de  $H_3BO_3$  e 2 mM de EDTA] sendo utilizado como marcador 500 ng de  $\lambda$ HindIII. O gel foi deixado em contato com tampão TBE 1X adicionado de brometo de etídio (0,5  $\mu$ g  $mL^{-1}$ ) por 30 min, fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado (Loccus Biotecnologia). Todas as demais separações de ácidos nucleicos por eletroforese seguiram estes mesmos procedimentos para análise de gel.

### 3.3.4 Clonagem do cDNA de *NbPROPEP* no vetor p-GEM T

A amplificação por PCR do cDNA para clonagem foi realizado conforme descrito no item 3.3.1. Nesta etapa foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) em diferentes combinações: NbPROPEP\_1 F e R, NbPROPEP\_2 F e R, NbPROPEP\_1 F e NbPep2\_TRV R, NbPROPEP\_2 F e NbPep2\_TRV R, NbPep2\_TRV F e R. Os cinco diferentes fragmento originados foram inseridos no vetor de clonagem pGEM-T© Promega® conforme indicação do fabricante.

### 3.3.5 Transformação genética de *Escherichia coli*

O produto de ligação entre os insertos e o vetor pGEM-T foram inseridos em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* XL-1 (Stratagene, CA, USA)

com auxílio do eletroporador MicroPulser™ (BIO RAD). Primeiramente, 2 µL da reação de ligação foram adicionados a 40 µL de células eletrocompetentes, sendo a mistura incubada durante 1 min em gelo. Foi aplicado um pulso de 1,8 kV para eletroporação, realizada em cubetas de 0,1 cm (BIO RAD). Imediatamente após foi acrescentado 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido contendo 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% NaCl, pH 7,5 (Sambrook et al., 1989). As células foram, então, transferidas para tubos de vidro e incubadas por 1 h a 37 °C sob agitação de 225 rpm. Após este período, uma alíquota de 100 µL da cultura foi plaqueada em meio LB sólido contendo 1,4% de ágar, acrescido de 40 µg mL<sup>-1</sup> de IPTG, 80 µg mL<sup>-1</sup> de X-Gal, 50 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina e 15 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina. As bactérias foram mantidas a 37 °C em estufa por 12 h ou mais, conforme crescimento.

Após o cultivo das células transformadas, parte de cada colônia recombinante foi utilizada na PCR para a identificação das colônias. Nesta reação, foi utilizado tampão 1X (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (pUC/M13 F 5'- CGC CAC GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3' e pUC/M13 R 5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C -3'); 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume de 20 µL. A reação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min; extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, permitindo a identificação das colônias transformadas.

### 3.3.6 Extração de plasmídeos recombinantes

A extração dos plasmídeos recombinantes a partir das colônias confirmadas foi realizada conforme protocolo descrito por Brasileiro & Carneiro (1998). Para cada um dos transformantes foram transferidas três colônias para 100 mL de meio LB líquido acrescido de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina e 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de tetraciclina. O meio foi mantido sob agitação (225 rpm) em torno de 24 h a 37 °C. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g durante 5 min à 4 °C. Em seguida, foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de solução P1 (RNase 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM), seguida da adição de 200  $\mu\text{L}$  da solução P2 (NaOH 200 mM; SDS 1 %) e inversão do tubo para completa homogeneização, observando a formação de uma solução viscosa indicando lise celular. Na etapa seguinte, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  da solução P3 (acetato de potássio 3M, pH 5,5), inversão do tubo para a homogeneização, seguida de centrifugação a 16.000 x g por 10 min. A fase superior do centrifugado foi transferida para novo tubo e realizadas duas extrações pela adição de igual volume (aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ ) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v) e agitação, seguida de centrifugação a 16.000 x g por 2 min. Para a precipitação do material, foi utilizado igual volume de isopropanol (aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ ) e 10 % de acetato de sódio 3M com pH 5,2, mantendo durante 2 h a -20 °C com posterior centrifugação a 16.000 x g por 15 min a 4 °C. O precipitado obtido foi então lavado com 1 mL de etanol 70 %, centrifugado a 16.000 x g por 5 min a 4 °C e ressuspensado em 50  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. A concentração dos plasmídeos extraídos foi estimada por eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 3.3.3.

### 3.3.7 Reação de sequenciamento

A partir da amplificação por PCR descrita no item 3.3.5 foi realizado o sequenciamento dos possíveis genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*. A reação de sequenciamento foi realizada na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. Antes do sequenciamento, o produto da PCR contendo aproximadamente 50 ng foi tratado com as enzimas exonuclease I (EXO1) e a fosfatase alcalina de camarão (SAP), por 30 min a 37 °C e 15 min a 65 °C, conforme instruções do fabricante, e 0,25 µM do oligonucleotídeo iniciador universal pUC/M13 R.

Os eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento foram analisados através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd., Version 2.01), comparando as sequências obtidas no sequenciamento com as sequências depositadas nas bases de dados.

### 3.3.8 Análise da expressão dos genes *NbPROPEP*

Plantas de *N. benthamiana* foram mantidas em câmara de crescimento a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 h de luz, conforme descrito no item 3.1. Diferentes partes de três plantas distintas foram coletadas a cada semana, iniciando na segunda semana de crescimento. Somente na segunda e terceira semanas foram coletadas as plantas inteiras. Na quinta e sexta semanas foram coletadas a parte aérea e raiz separadamente. Na oitava e décima foram coletadas separadamente a folha, raiz e caule. E na última coleta, da décima sexta semana, foi coletada a folha, raiz, caule e flor, também separadamente. A partir deste material, foi realizada a extração de RNA total e a síntese da fita de cDNA conforme anteriormente descrito no item 3.3.2 e 3.3.3, respectivamente. A partir do cDNA

foi realizada a PCR em tempo real conforme descrito no item 3.2.2, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene endógeno (*NbEF-1 $\alpha$* ) e para *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*.

### **3.4 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)**

#### **3.4.1 Inserção do NbPROPEP no plasmídeo pTRV2b**

O vetor viral TRV foi cedido gentilmente por Jane Shaw e Christophe Lacomme do Instituto de Pesquisa Agrícola da Escócia, Dundee. Este vetor é dividido em dois plasmídeos: o pTRV1 e o pTRV2b-GFP. O primeiro possui as sequências que codificam 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 (Martín-Hernández & Baulcombe, 2008). Este plasmídeo não é manipulado, sendo apenas inserido e multiplicado em bactérias. O pTRV2b-GFP codifica para a proteína responsável pela produção do capsídeo (CP) e para a proteína 2b ligada ao movimento para raiz, além de conter o sítio múltiplo de clonagem. Esta região possui os sítios de restrição das enzimas *HpaI* e *EcoRI*, entre os quais haverá a inserção da sequência que será silenciada quando infiltrada na planta. Para que esta inserção seja possível, estes sítios devem estar presentes no fragmento a ser inserido. Após a confirmação por sequenciamento dos fragmentos inseridos no plasmídeo pGEM-T, apenas o produto originado pela combinação dos oligonucleotídeos iniciadores NbPep2\_TRV F e R foi digerido com as enzimas *HpaI* e *EcoRI*, simultaneamente ao vetor TRV2b-GFP. Para isso foi utilizado 550 ng de DNA plasmidial, tampão da *EcoRI* 1X, 10 U de *EcoRI*, 5 U de *HpaI* e água ultrapura para completar o volume final de 50  $\mu$ L. As reações foram incubadas a 37 °C por 2 h. Imediatamente após o período de incubação, as

reações passaram por uma re-extração para inativar a atividade das enzimas. O volume dos produtos das digestões foi ajustado para 500  $\mu$ L, ao qual foi acrescentado igual volume de fenol. Após a homogeneização foi realizada uma centrifugação por 2 min a 16000 x g em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi acrescentado 1/2 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A nova mistura foi homogeneizada e centrifugada por 2 min a 16000 x g em temperatura ambiente. A fase aquosa foi novamente transferida para outro tubo onde foi procedida a etapa de precipitação, a qual diferiu de acordo com o tamanho do fragmento que se desejava recuperar. No caso do produto de digestão do pTRV2b-GFP a precipitação realizada favorece a recuperação de moléculas grandes, ou seja, do vetor pTRV2b e não da GFP. Já o método de precipitação realizado para o produto de digestão do pGEM-NbPROPEP visa otimizar a recuperação de fragmentos pequenos, ou seja, do inserto de *NbPROPEP* (originado da amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores NbPep2\_TRV F e R). Dessa forma, o primeiro método, para moléculas grandes, consistiu na adição de 2,5 volumes de etanol absoluto e mais 10% do volume inicial de acetato de amônio (7,5 M) sobre a fase aquosa. A mistura foi homogeneizada e incubada a -20 °C por 1 h. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação a 16000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo feita uma última centrifugação a 16000 x g por 5 min a 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspendido em 25  $\mu$ L de água ultrapura. O outro método de precipitação, para a recuperação de fragmentos pequenos, consistiu na adição de 2 volumes de etanol absoluto sobre a fase aquosa, homogeneização e incubação a -80 °C por 1 h. Subsequentemente, a mistura foi centrifugada a 16000 x g por 30 min a 3 °C. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 95%. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 16000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuscitado em 25 µL de água ultrapura. Logo após a etapa de precipitação, a concentração das moléculas digeridas foi estimada em gel de agarose a 0,8%, utilizando o λHindIII como marcador de massa molecular. Para a reação de ligação foi utilizado tampão para ligações rápidas 1X (Promega), 100 ng de vetor pTRV2b (12300 pb), 20 ng de inserto *NbPROPEP* (55 pb), 3 U de T4 DNA ligase (Promega) e água ultrapura para completar o volume final de 20 µL. Esta reação foi incubada a 4 °C por 16 h. Os produtos das ligações foram utilizados para a transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* XL1, sendo seguida a metodologia descrita no item 3.3.5. Uma alíquota de 100 µL da cultura de células transformadas foi aplicada em placa de Petri contendo meio LB sólido, acrescido de 15 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina e 100 µg mL<sup>-1</sup> de canamicina. As bactérias foram mantidas em estufa a 37 °C por 12 h.

Parte das colônias que cresceram no meio de cultura acima descrito foram avaliadas por PCR, possibilitando a identificação de colônias contendo o plasmídeo de interesse. A PCR destas colônias foi realizada conforme descrito no item 3.3.5, porém empregando os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes para este vetor (TRV, Tabela 1). As colônias que apresentaram tamanho de fragmento esperado foram utilizadas no processo de extração de plasmídeo, conforme descrito no item 3.3.6.

#### **3.4.2 Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens***

Após confirmação da obtenção do plasmídeo pTRV2b-NbPROPEP, este foi inserido em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*. As células de *A.*

*tumefaciens* GV3101 utilizadas nesta etapa foram gentilmente fornecidas por José Antônio Peters do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Sendo assim, 2  $\mu\text{L}$  de cada plasmídeo foram, separadamente, misturados à 20  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes e deixados em gelo por 1 min. A mistura foi transferida para cubetas de 0,1 cm (BIO RAD), sobre a qual foi aplicado um pulso de 2,2 kV (MicroPulser™ - BIO RAD). As células foram rapidamente ressuspensas em 1 mL de meio LB líquido, transferidas para tubos de vidro e incubadas por 3 h a 28 °C sob agitação de 190 rpm. Após este período, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de cada cultura de células transformadas foi transferidas para placas contendo meio LB sólido, acrescido de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de rifampicina e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C até a visualização das colônias transformadas (aproximadamente 48 h). As colônias obtidas foram avaliadas por PCR, possibilitando a identificação daquelas contendo o plasmídeo de interesse. A PCR destas colônias foi composta de tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (TRV F e R); 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume de 20  $\mu\text{L}$ . As reações foram submetidas às seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 45 s, pareamento a 45 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min; extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%.

### 3.4.3 Agroinfiltração

As colônias de *A. tumefaciens* transformadas e confirmadas anteriormente foram utilizadas para a agroinfiltração. Além destas, foram preparados inóculos de colônias com os plasmídeos: pTRV1, pTRV2b-GFP, pTRV2b-PDS e pTRV2b-

SIPPROPEP, previamente construídos e descritos em Trivilin *et al.*(2014). Para o pré-inóculo, foram transferidas 3 colônias, separadamente, para meio de cultura LB acrescido de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de rifampicina e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de canamicina e mantidos por 16 h a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , em agitação a 180 rpm. Após, foi preparado o inóculo, que consiste de 20 mL de LB acrescido de rifampicina e canamicina nas mesmas concentrações, 10 mM de ácido 2-morfolino etanosulfônico (MES), 20  $\mu\text{M}$  de acetoseringona e 400  $\mu\text{L}$  do pré-inóculo Este inóculo foi mantido nas mesmas condições do pré-inóculo, porém por 18 h. Após crescimento, foi realizada a leitura em espectrofotômetro ( $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ ) das cinco diferentes culturas bacterianas que foram então transferidas para tubos tipo Falcon para precipitação das células por 10 min a  $5.000 \times g$ . Em seguida o precipitado foi ressuspensionado em tampão de infiltração, contendo 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de acetoseringona e 10mM de MES, sendo a D.O. das culturas ajustada para 2.

As células ressuspensionadas foram mantidas a temperatura ambiente por 3 h. Para a infiltração, a suspensão de *A. tumefaciens* com TRV1 foi misturada a cada uma das construções na proporção 1:1 (TRV-GFP, TRV-PDS, TRV-NbPROPEP e TRV-SIPROPEP), independentemente. A agroinfiltração com estes inóculos foi realizada na face abaxial das folhas mais inferiores de *N. benthamiana* com 5 a 6 semanas de crescimento utilizando seringas de 3 mL. Foram utilizadas 10 plantas para cada evento de silenciamento e a construção TRV-PDS foi empregado em todas as repetições dos experimentos de silenciamento para o controle das condições do ambiente, os quais foram sempre realizados em câmara de crescimento a  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 h, sendo então transferidas, 3 a 5 dias após, para câmara de crescimento a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3.4.4 Análise da expressão gênica por RT-qPCR**

Nesta etapa foi realizada a análise de expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* a fim de avaliar o nível de silenciamento através da quantificação de mRNA, por meio de PCR quantitativo em tempo real – RT-qPCR. Para isto, foram utilizados oligonucleotídeos externos à sequência silenciada (*NbPROPEP\_1* e *NbPROPEP2*; Tabela 1). Foram também utilizados oligonucleotídeos iniciadores para o gene endógeno *NbEF-1 $\alpha$* . Para isto, folhas superiores da planta foram coletadas 3 a 12 dias após a agroinfiltração, conforme a necessidade, e armazenadas instantaneamente em nitrogênio líquido. A partir deste material, foi realizada a extração de RNA total e a síntese da fita de cDNA conforme anteriormente descrito no item 3.3.2 e 3.3.3. A seguir, foi realizada a RT-qPCR, nas mesmas condições e quantidades já descritas (item 3.3.8), bem como as análises de expressão relativa e a análise de significância estatística.

#### **3.5 Infiltração do peptídeo**

A síntese da sequência de aminoácidos correspondente ao possível peptídeo NbPep foi realizada pela empresa Síntese Biotecnologia. O produto foi diluído em água ultrapura para todos os testes utilizados. A infiltração foi realizada na face abaxial das folhas de *N. benthamiana* com 5 a 6 semanas, utilizando para isso uma seringa de 3 mL sem a agulha, até a folha ficar encharcada. A fim de verificar se o peptídeo sintetizado NbPep induz a expressão de genes e se apresentavam algum efeito durante a infecção por *B. cinerea* (item 3.5.2), foram utilizados os métodos descritos a seguir.

### 3.5.1 Teste da concentração contra a doença

A infiltração do peptídeo foi realizada conforme citado anteriormente (item 3.5). Foram utilizadas as seguintes concentrações: 0 (controle), 1, 10 e 1000 nM do peptídeo. Após 2 h da infiltração, a folha foi coletada para realização da inoculação em câmara úmida. A folha foi então disposta em placa de Petri contendo uma folha de papel filtro, embebido em 1,5 mL de ADE, com auxílio de suportes de madeira para evitar que a folha ficasse em contato direto com o papel. Sobre a folha foi colocado um plug de 5 mm de *B. cinerea*, conforme descrito no item 3.2.1. As placas foram vedadas com parafilme e deixadas em câmara de crescimento, em fotoperíodo de 16 h de luz, a  $24 \pm 2$  °C. As folhas foram observadas diariamente e fotografadas em 2 e 3 dias após a inoculação do patógeno. A área correspondente a lesão causada por *B. cinerea*, foi calculada através do programa AxioVision software (version 4.8.2, 2010). Foram utilizadas 10 plantas para cada concentração. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas com a aplicação do teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.2 Teste de indução da expressão de *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*

Nesta etapa o peptídeo sintético foi diluído na concentração de 20 nM, sendo a água utilizada como controle. O peptídeo foi infiltrado na segunda ou terceira folha, conforme o tamanho. Após 2 h da infiltração, uma parte da folha foi recortada e rapidamente armazenada em nitrogênio líquido, para posterior extração de RNA total. Da mesma forma, foram coletadas partes da folha nos tempos de 30, 60, 90 min; 4, 6 e 8 h após a infiltração do peptídeo. A partir destas amostras, foi realizada a extração de RNA total (item 3.3.2) e posteriormente a síntese da fita de DNA complementar (item 3.3.3). Para a expressão por RT-

qPCR foram utilizados os mesmo reagentes e condições descritos no item 3.3.8, sob as mesmas condições de temperaturas. Os oligonucleotídeos iniciadores usados para as amostras infiltradas foram aqueles que amplificam para os genes *NbEF-1 $\alpha$* , *NbPROPEP1*, *NbPROPEP2* (Tabela 1). A quantificação relativa do gene de interesse em relação ao gene endógeno foi determinada conforme descrito no item 3.3.8.

### **3.6 Teste da doença nas plantas silenciadas e/ou infiltradas com o peptídeo**

Com a finalidade de verificar a influência do peptídeo NbPep na defesa a *B. cinerea*, diferentes plantas de *N. benthamiana* receberam os seguinte tratamentos: agroinfiltração com o vetor para silenciamento TRV-NbPROPEP ou TRV-SIPROPEP em seis dias antes da inoculação do patógeno (item 3.4.3), infiltração do peptídeo sintético na concentração de 20 nM, em torno de 2 h antes da inoculação (item 3.5), infiltração do peptídeo, na mesma concentração e tempo (item 3.5) em folhas previamente agroinfiltradas com o vetor TRV-NbPROPEP, nos mesmo tempo previamente citado (item 3.4.3) e infiltração de ADE (controle). Em seguida, as plantas foram submetidas à inoculação de *B. cinerea* conforme já descrito (item 3.2.1), utilizando o método de plug.

#### **3.6.1 Avaliação da doença**

A inoculação de *B. cinerea* foi realizada em câmara úmida, conforme detalhado no item 3.2.1. A severidade da doença foi avaliada através da área correspondente a lesão causada por *B. cinerea* através do programa AxioVision software (version 4.8.2, 2010). A fim de comparação, foram utilizadas no mínimo 6 folhas em cada tratamento, com pelo menos duas repetições independentes. Os

resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas com a aplicação do teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **3.6.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR**

Para verificar a expressão de diversos genes no momento da inoculação de *B. cinerea*, foi coletada uma folha por planta por tratamento anteriormente citado e realizado todos os procedimentos já descritos para extração de RNA, síntese do cDNA, qPCR e análise de expressão relativa (itens 3.3.2, 3.3.3, 3.3.8). Nesta etapa foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes para os seguintes genes: *NbPROPEP1*, *NbPROPEP2*, *NbETR1*, *NbERF1*, *NbACO1* e *NbPR1a*, além do controle endógeno (*NbEF-1 $\alpha$* ) utilizado para normalizar os valores de Cts encontrados. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas com a aplicação do teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Identificação do gene ortólogo de *AtPROPEP1* de *Arabidopsis thaliana* em *Nicotiana benthamiana*

Inicialmente foi realizada a busca *in silico* da sequência de nucleotídeos ortóloga de *AtPROPEP* a partir das sequências obtidas em tomate (*Solanum lycopersicum*) e em batata (*Solanum tuberosum*; Huffaker *et al.*, 2006a). A partir da busca na base de dados Sol Genomics Network foi encontrado um EST (Apêndice 1), o qual apresentou similaridade de 54% com a região codificante do *SIPROPEP* de *S. lycopersicum* e 46% com a região codificante do gene correspondente de *S. tuberosum*. Quando comparadas apenas as regiões que codificam a sequência predita do peptídeo, a similaridade aumenta para 84% na comparação tanto com tomate quanto com batata. Na comparação entre as proteínas deduzidas (Figura 1A) a partir das regiões codificantes anteriormente comparadas, a similaridade foi de 37% tanto com a proteína de tomate como a de batata. A similaridade entre as sequências, principalmente na região correspondente ao provável peptídeo, indica que *N. benthamiana* possui um possível ortólogo da família PROPEP. Em milho (*Zea mays*), a proteína precursora do ZmPep apresentou identidade de apenas 14% com *AtPROPEP1* (Huffaker *et al.*, 2011). Mesmo com a baixa identidade, a sequência foi considerada um ortólogo potencial devido a características importantes presentes na proteína ZmproPep1, comparadas com AtproPep1. Essas características são

também encontradas em comum entre a proteína predita como NbproPep em *N. benthamiana* e as demais espécies, incluindo AtproPep1. Uma delas é a presença de múltiplas repetições EKE, que são altas densidades de ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E) intercalados com lisinas (K) e argininas (R) (Figura 1A). Outra característica é a presença do peptídeo sinalizador contendo 23 aminoácidos na porção C-terminal da proteína. Através da análise de similaridade, pode se sugerir a presença do peptídeo sinalizador bioativo em *N. benthamiana*, que passou a ser chamado NbPep. Entretanto não foram realizados testes com o peptídeo isolado da planta para confirmar sua atividade.

A comparação de similaridade entre a sequência de aminoácidos que corresponde ao provável peptídeo de *N. benthamiana* com as outras espécies foi de 39% com *A. thaliana*, 60% com *S. tuberosum* e 65% com *S. lycopersicum* (Figura 1B). A similaridade foi maior entre *N. benthamiana* e as sequências de tomate e batata, conforme esperado, visto que as três espécies pertencerem à mesma família (*Solanaceae*). Pearce *et al.* (2008), através de deleções e troca de aminoácidos, demonstraram que os 10 resíduos de aminoácidos finais de AtPep1 são os mais importantes para manutenção da atividade. Observando esta região no provável peptídeo de *N. benthamiana*, é possível verificar que os resíduos conservados entre as duas espécies encontram-se na mesma porção C-terminal (Figura 1B). Além disso, os aminoácidos serina (S) da posição 15, glicina (G) posição 17 e asparagina (N) posição 23, que são de extrema importância por estarem envolvidos no reconhecimento pelo receptor e sinalização em AtPep1 (Pearce *et al.*, 2008), estão presentes na sequência do peptídeo de *N. benthamiana*. O resíduo de glicina é também normalmente encontrado em homólogos e ortólogos de *AtPROPEP* (Huffaker *et al.*, 2006a; Huffaker *et al.*, 2011).

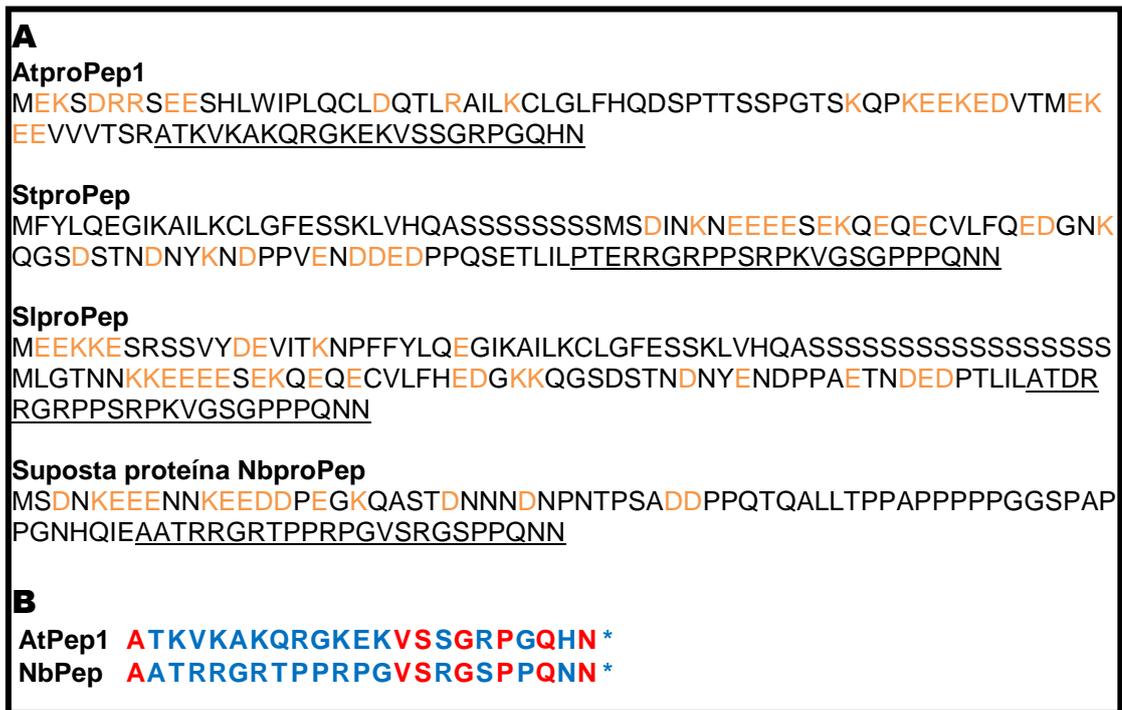


FIGURA 1. Comparação entre ortólogos de *AtPROPEP*. (A) Sequência de aminoácidos de *Arabidopsis thaliana* (AtproPep1), *Solanum tuberosum* (StproPep), *S. lycopersicum* (SlproPep) e *Nicotiana benthamiana* (NbproPep). As bases em laranja indicam as múltiplas repetições EKE e a região sublinhada representa a porção identificada como sequência predita para o peptídeo sinalizador. (B) Sequência do provável peptídeo, onde os resíduos conservados entre NbPep e AtPep1 estão indicados em vermelho.

Ainda através das análises *in silico* foram encontradas duas sequências genômicas a partir do EST encontrado previamente, nomeadas no presente estudo *NbPROPEP1* (Apêndice 2) e *NbPROPEP2* (Apêndice 3). Estas sequências apresentam total identidade na região que codifica o predito peptídeo sinalizador, mas apresentam diferenças no restante da sequência. A partir destas sequências, foram projetados oligonucleotídeos iniciadores que distinguíssem as sequências e que abrangessem toda região do peptídeo. Através da PCR com estes oligonucleotídeos iniciadores foi constatada a existência destas duas sequências em *N. benthamiana*. Após o sequenciamento desta região, a partir da sequência em DNA e RNA, foi observado que ambos possuem íntrons, que são diferentes em posição e tamanho entre *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* (Apêndice 2

e 3, respectivamente). Comparando apenas a região expressa encontrada, foi observada uma semelhança de 89%. Devido às diferenças encontradas entre os dois genes, as análises de expressão foram feitas com ambas as sequências, a partir de oligonucleotídeos iniciadores projetados na região mais distinta entre ambos.

#### **4.1.1 Análise da expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* nos diferentes órgãos da planta**

Conforme observado em outros trabalhos que identificaram peptídeos sinalizadores endógenos (Huffaker *et al.*, 2006a; Pearce *et al.*, 2010; Trivilin *et al.*, 2014), a análise da expressão dos genes codificantes da proteína que origina o peptídeo nas diferentes partes da planta é importante para indicar a possível localização e função da proteína. Além disso, devido à existência de dois genes muito semelhantes, que possuem os 23 aminoácidos finais idênticos, região considerada do peptídeo sinalizador, é importante analisar a expressão relativa de ambos os genes para fins de comparação.

Com este intuito, foram coletados diferentes órgãos de *N. benthamiana* e analisados quanto a expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* (Figura 2). Foi escolhida a 16<sup>a</sup> semana devido à presença das flores totalmente desenvolvidas, importante para a obtenção do RNA devido à quantidade de tecido. Para ambos os genes a folha foi o órgão que apresentou menor expressão, e por isso foi utilizada como calibrador nos cálculos de expressão relativa. A expressão no caule mostrou-se elevada para ambos os genes, apontando para a possibilidade de alguma função neste órgão da planta ou ainda devido à presença do mRNA no sistema vascular. Porém, em outros trabalhos semelhantes não houve essa distinção neste tecido. Na raiz, *NbPROPEP1*

(Fig.1A) foi significativamente mais expresso do que *NbPROPEP2* (Fig.1B). A superexpressão de *AtPROPEP1* e *AtPROPEP2* em *A. thaliana* resultou em plantas com raízes maiores e com mais volume, comparadas as plantas controles (Huffaker *et al.*, 2006a), indicando que pode haver alguma relação desta família gênica com as raízes, bem como encontrado no presente estudo para o gene *NbPROPEP1*. Yamaguchi *et al.* (2011) também encontraram uma alta expressão dos peptídeos GmPROPEP914 e GmPROPEP890 nas raízes de plantas.

Nas flores a expressão dos dois genes é semelhante à expressão nas folhas, que não é baixa, mas menor que no caule. Em *A. thaliana*, Huffaker *et al.* (2006a) encontraram *AtPROPEP1* sendo expresso em baixa quantidade igualmente em todos os órgãos e por isso não foi possível relacionar o local da expressão com sua respectiva função.

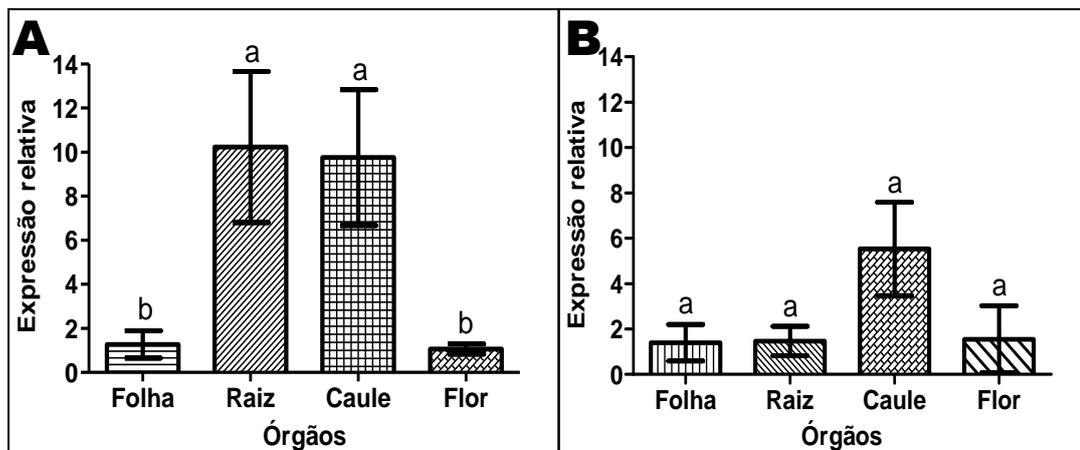


FIGURA 2. Expressão relativa dos genes (A) *NbPROPEP1* e (B) *NbPROPEP2* de *Nicotiana benthamiana* nos diferentes órgãos. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (*NbEF-1α*). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador (folha). Dados transformados por log (Y). Resultados com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A análise da expressão nos diferentes órgãos apresentou variações, tanto entre órgãos como entre os genes. Em conjunto a outros dados também obtidos no presente estudo, é possível observar que a expressão de cada um dos genes

é bastante diferente e variável, o que indica que eles podem possuir funções diferentes na planta. Além disso, a expressão de ambos os genes apresenta variações ao longo de seu desenvolvimento, o que possibilita supor que esses valores encontrados para os diferentes órgãos poderiam variar conforme a idade da planta.

#### **4.1.2 Análise da expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* ao longo do desenvolvimento**

A expressão e controle dos genes nas plantas podem variar não apenas em diferentes órgãos da planta, conhecida como regulação de expressão espacial, como também em diferentes etapas de seu crescimento, indicando possíveis relações entre o gene e a etapa de desenvolvimento, gerando uma regulação temporal (Cullis, 2004). Devido a isso, *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* foram analisados quanto a sua expressão ao longo do crescimento da planta. A amostra coletada na segunda semana foi utilizada como calibrador nos cálculos de expressão.

A Figura 3 apresentam a expressão nas plantas de *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* nas diferentes semanas. As semanas iniciais de desenvolvimento (3ª e 5ª semanas) apresentaram expressão semelhante à primeira semana (S2) para ambos os genes. As plantas com seis e oito semanas apresentaram a maior expressão de *NbPROPEP1* (Figura 3A) e *NbPROPEP2* (Figura 3B), mas significativo apenas para o primeiro gene. Conforme observado, as plantas iniciaram a formação das flores em torno da 9ª e 10ª semana. Em *A. thaliana*, a superexpressão de *AtPROPEP1* e *AtPROPEP2* proporcionou aumento no volume da raiz, melhorando o crescimento (Huffaker *et al.*, 2006a), indicando uma relação com o desenvolvimento da planta. O mesmo pode estar ocorrendo em *N.*

*benthamiana*. O gene *NbPROPEP1* pode estar envolvido nesta etapa de desenvolvimento, visto que apresenta expressão significativamente maior nas semanas que antecedem a formação da flor e sementes. Todos os experimentos de agroinfiltração foram realizados próximos a 6ª semana, na tentativa de fazer um silenciamento mais eficiente por ser o momento do desenvolvimento em que ambos os genes apresentam maior expressão, além de ser o tamanho adequado de folha, geralmente utilizado em outros trabalhos com esta espécie.

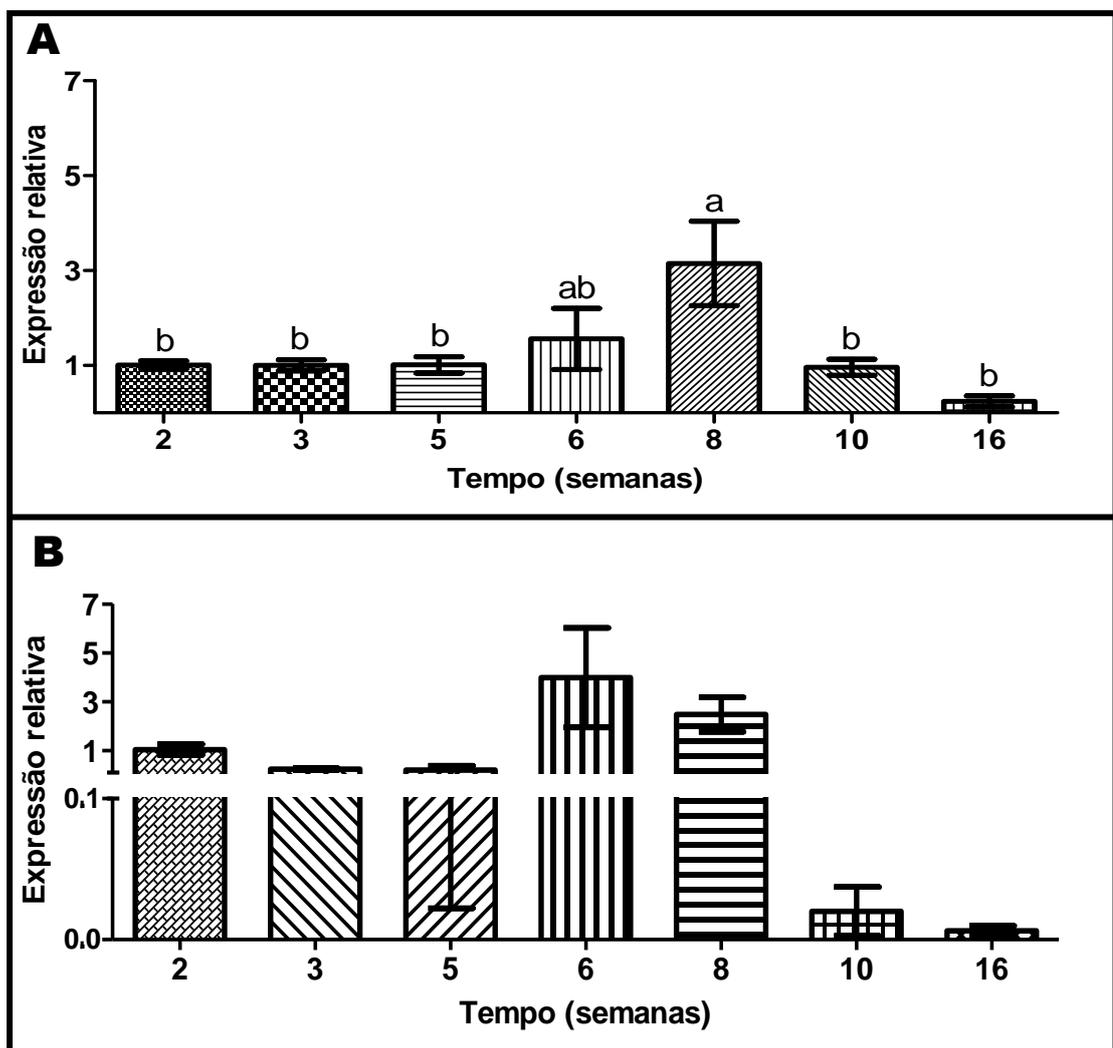


FIGURA 3. Expressão relativa dos genes (A) *NbPROPEP1* e (B) *NbPROPEP2* em *Nicotiana benthamiana* ao longo das semanas de desenvolvimento. S0 corresponde a semana na qual as sementes são plantadas. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (*NbEF-1 $\alpha$* ). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumentou ou diminuiu em relação ao calibrador (S2). Resultados com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 4.2 Teste de patogenicidade

### 4.2.1 Inoculação

A fim de verificar se o isolado de *B. cinerea* causava doença em *N. benthamiana* foi realizado o teste de patogenicidade com diferentes formas de inoculação.

Inicialmente, uma suspensão de  $1 \times 10^5$  esporos. mL<sup>-1</sup> foi aplicada em plantas inteiras de *N. benthamiana* com 1 a 6 semanas. Dentre 18 plantas de diferentes idades, apenas 5 apresentaram algum sintoma, porém em uma folha cada (dados não apresentados). Com base no objetivo de avaliar a relação da doença com o peptídeo, foi necessário buscar uma metodologia que permitisse a observação dos sintomas de forma mais padronizada entre as plantas. Para tanto foi utilizado o método de câmara úmida, também empregado em outros trabalhos com *B. cinerea* (El Oirdi & Bouarab, 2007; Zhang & Van Kan, 2013). Foram testados três tipos de inóculos diferentes: suspensão de esporos dispersos na folha (Figura 4A), suspensão de esporos aplicado em gota (Figura 4B) e aplicação de plug com micélio (Figura 4C). Os três métodos utilizados resultaram em doença, conforme pode ser visualizado na Figura 4. O método de plug com micélio foi o método escolhido nos experimentos seguintes, pois foi aquele que apresentou lesão mais característica, além do seu uso comum em trabalhos com *B. cinerea* (El Oirdi *et al.*, 2010; El Rahman *et al.*, 2012).

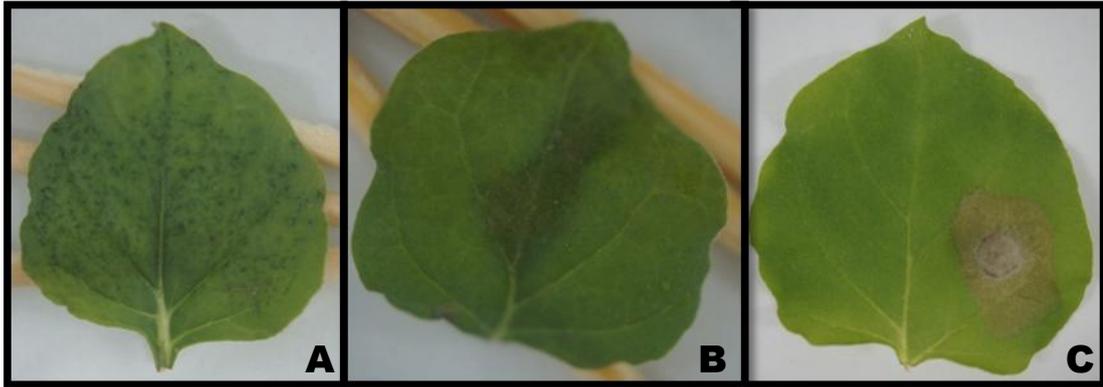


FIGURA 4. Folhas de *Nicotiana benthamiana* 2 dias após a inoculação (dai) em câmara úmida. (A) Inoculação de 50 $\mu$ L de suspensão a  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup> espalhada nas folhas com pincel. (B) Inoculação de gota com 10 $\mu$ L de suspensão a  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. (C) Inoculação de plug com micélio crescido por 7 dias.

#### 4.2.2 Estruturas do patógeno

Posteriormente ao aparecimento da lesão, as folhas foram fotografadas e passaram então por um processo de despigmentação e coloração com azul de Trypan, para visualização de estruturas do patógeno. Além disso, esta coloração permite a visualização das regiões com morte celular, processo característico decorrente da infecção por fungos necrotróficos. É possível observar que três dias após a inoculação do plug com micélio houve uma intensa esporulação, visualizada através do desenvolvimento de conidióforos e conídios característicos desta espécie (Figura 5A). Ao observar a folha no microscópio, foi possível verificar uma grande quantidade de hifas presente no tecido nas margens da lesão, indicando que o fungo era o responsável pela morte do tecido (Figuras 5B). Em meio a este micélio, e em vários pontos da lesão, foram encontrados também conídios já germinados (Figuras 5C e D). Além disso, foi possível a observação das hifas em diferentes níveis de profundidade no tecido foliar, indicando que seu crescimento ocorreu não apenas superficialmente, mas entre as células da folha. Também foi observada grande quantidade de micélio na face abaxial na região da

lesão. A presença destas estruturas comprova que a morte celular observada decorrente da infecção por *B. cinerea*.

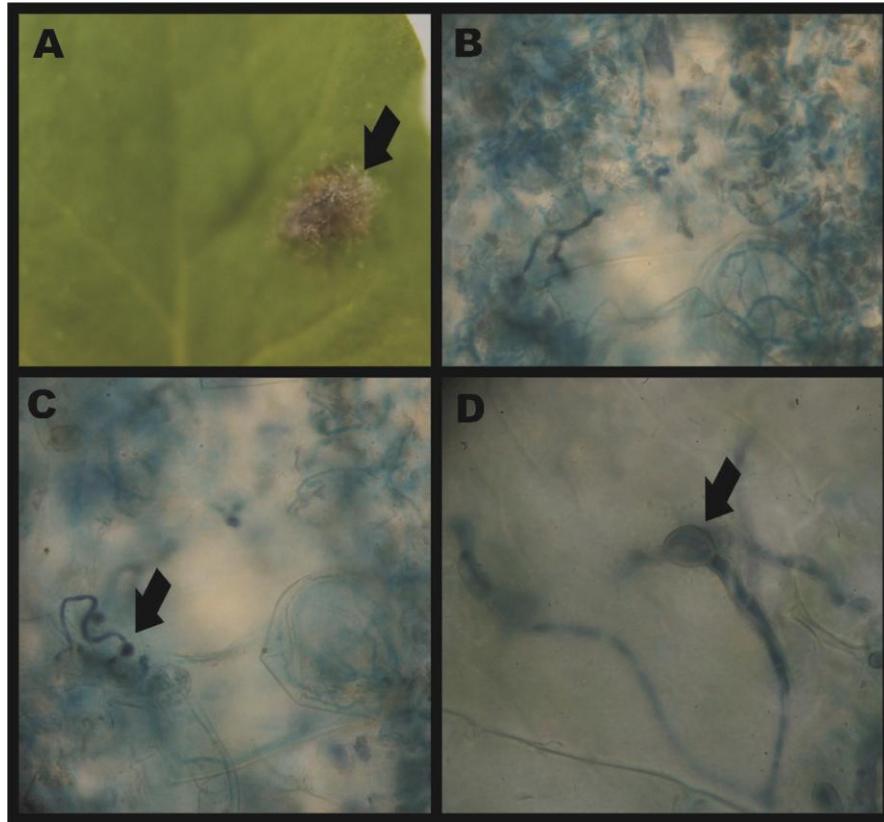


FIGURA 5. Folhas de *Nicotiana benthamiana* apresentando estruturas de *Botrytis cinerea*. (A) Folha com plug 3 dias pós inoculação com intensa formação de conidióforos e conídios característicos (seta). (B) Folha corada com azul de Trypan, apresentando intenso crescimento de micélio em diversos níveis do tecido; (C) presença de conídio germinado e (D) em detalhe (seta). (B) e (C) aumento de 400x e (D) em aumento de 1000x.

#### 4.2.3 Quantificação do patógeno por RT-qPCR

A fim de confirmar se a relação da área de lesão correspondia com o crescimento do patógeno na folha foi realizada a quantificação por RT-qPCR da expressão do gene de actina de *B. cinerea* (*Bcactin*), um marcador de crescimento ativo desta espécie (Wang *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2002). Esta avaliação permite afirmar que a área de lesão medida nos experimentos é decorrente do crescimento do patógeno e não apenas devido a processos celulares da folha em resposta à infecção.

A quantificação por RT-qPCR encontrada para as amostras de câmara úmida foi correspondentemente maior conforme a área da lesão medida para a respectiva folha (Figura 6). Apenas algumas amostras foram testadas, devido a dificuldades na obtenção do RNA das folhas já danificadas pelo patógeno. As lesões observadas apresentam correspondência com o nível de expressão, indicando que a área calculada corresponde ao crescimento de *B. cinerea*.

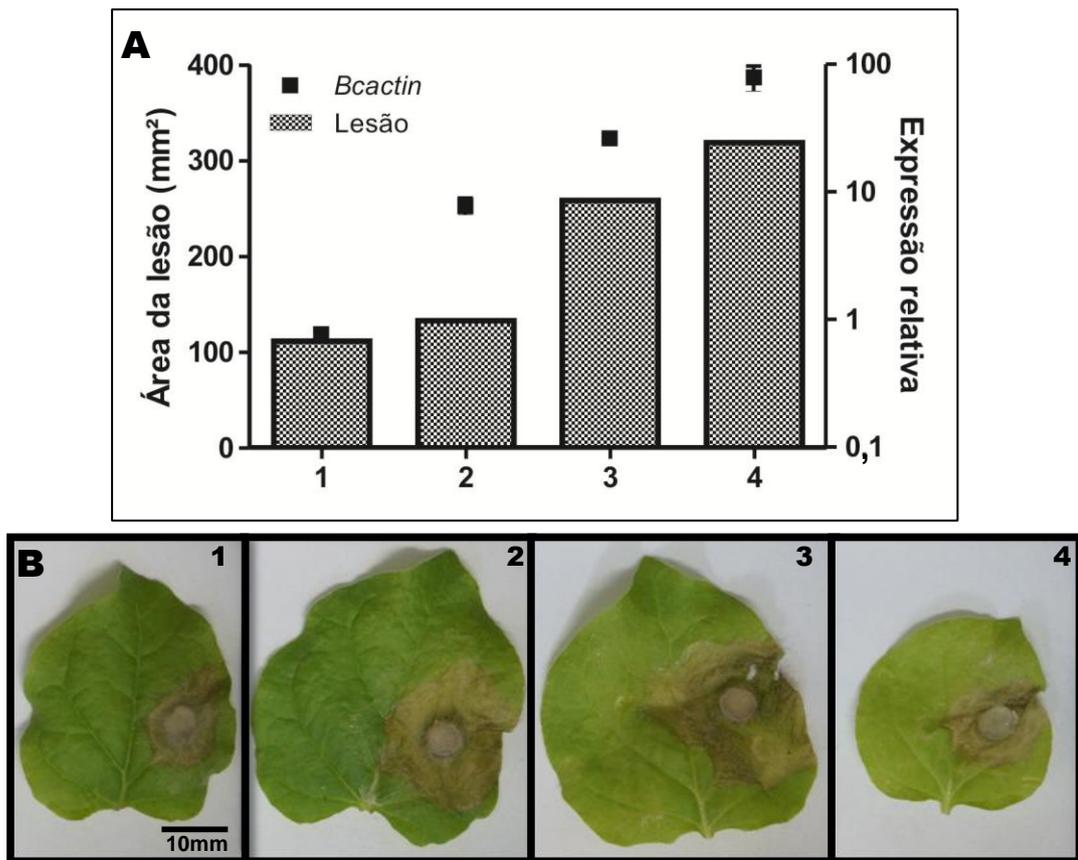


FIGURA 6. Avaliação da doença. (A) Área da lesão em folha (barras, em mm<sup>2</sup>) com a respectiva expressão relativa do gene endógeno da actina de *Botrytis cinerea* (■). Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno de *Nicotiana benthamiana* (*NbEF-1α*). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador, em escala logarítmica. (B) Folhas de *N. benthamiana* inoculadas com plug contendo micélio de *B. cinerea*, correspondentes ao número no gráfico (1, 2, 3 e 4).

### 4.3 Caracterização do papel de *NbPROPEP* na resistência de *Nicotiana benthamiana* à infecção por *Botrytis cinerea*

#### 4.3.1 Silenciamento gênico induzido por vírus de *NbPROPEP*

A avaliação do papel de um gene em um organismo pode ser obtida através de diversas técnicas, dentre elas está o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) (Senthil-Kumar *et al.*, 2007; Senthil-Kumar & Myrose, 2011). Devido à finalidade de observar a relação de ambos os genes e do peptídeo de *N. benthamiana* com a resistência à *B. cinerea*, a sequência inserida no vetor de silenciamento foi parte daquela que codifica o peptídeo. Além disso, este vetor tem como alvo o silenciamento de ambos os genes, *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*.

Através da análise da expressão de folhas em diferentes dias após a agroinfiltração, foi possível observar uma redução na expressão de ambos os genes em relação ao controle (Fig. 7). Em três dias, *NbPROPEP1* apresentou maior expressão que o controle, porém *NbPROPEP2* já apresentava redução na expressão. A partir do sexto dia após a agroinfiltração, ambos os genes já apresentavam visível redução na expressão, confirmando o silenciamento. Embora o sexto dia não apresente diferença significativa para o terceiro, as plantas são consideradas silenciadas devido à variação entre plantas, o que justifica os desvios. Velásquez *et al.* (2009) indicaram que avaliações de *N. benthamiana* silenciadas podem ser realizadas 24 dias após a agroinfiltração. No entanto, afirmam que em torno de oito dias já é possível visualizar o fenótipo do silenciamento, no caso do gene *PDS*, que desenvolve o fotobranqueamento da planta. No presente estudo, a expressão não foi avaliada após o 12º dia visto que a expressão mostrou-se igual ao 6º dia após a agroinfiltração. Portanto, pode-se afirmar que ocorreu o silenciamento dos dois genes a partir do sexto dia após a

agroinfiltração. Além disso, o silenciamento para o gene *PDS* foi também utilizado neste trabalho a fim de controlar as condições do ambiente, principalmente de temperatura.

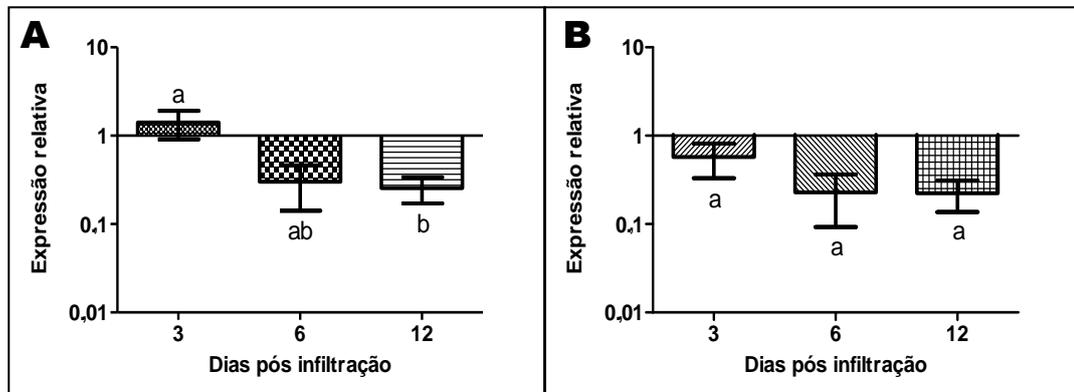


FIGURA 7. Expressão relativa dos genes (A) *NbPROPEP1* e (B) *NbPROPEP2* em folhas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas com o vetor viral TRV-NbPROPEP. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (*NbEF-1 $\alpha$* ). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador (controle, equivalente ao valor 1), em escala logarítmica. Barras com letras iguais não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.2. Efeitos da agroinfiltração de TRV-NbPROPEP e TRV-SIPROPEP

Após o processo de agroinfiltração de TRV-NbPROPEP, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento, sendo posteriormente retiradas as folhas necessárias para os experimentos. O restante de cada planta foi mantido em câmara de crescimento a  $25 \pm 2$  °C. Nestas plantas foi observado o surgimento de clorose e morte celular nas folhas em torno de 10 a 12 dias após a agroinfiltração (Figura 8). Este fenótipo foi observado em praticamente todas as folhas de plantas TRV-NbPROPEP, iniciando na região das nervuras e seguindo para o restante da folha (Figura 8H). Em 18 a 20 dias, algumas folhas já apresentavam predominância de morte celular (Figura 8I). As plantas TRV-GFP e controle (água) não apresentaram tal fenótipo (Figuras 8A e D). Interessantemente, as plantas que foram mantidas em temperaturas superiores ao padrão ( $28 \pm 2$  °C)

apresentaram o fenótipo de morte celular em menor tempo e com maior intensidade, inclusive no caule (Figura 8E) e na região da inserção das folhas, ocasionando sua curvatura para baixo (Figuras 8B e E).

A agroinfiltração do vetor TRV pode gerar sintomas nas plantas, que tendem a ser fracos (Unver & Budak, 2009). Contudo, as plantas agroinfiltradas apenas com o pTRV2b-GFP não apresentam morte celular. As plantas pTRV2b-NbPROPEP exibiram uma morte celular sistêmica, surgindo inicialmente na região mais apical das plantas. É possível supor que o vetor viral tenha desencadeado uma HR sistêmica (SHR) devido à ausência do peptídeo. Ou seja, o peptídeo codificado pelos genes *NbPROPEP1* e/ou *NbPROPEP2* estaria envolvido na sinalização e desenvolvimento da morte celular programada (PCD) na planta. Sua redução na planta permitiria o surgimento da morte celular induzida pela agroinfiltração com TRV. Outros trabalhos apresentam a morte celular como consequência de silenciamento (Lau *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007) ou super-expressão (Weingartner *et al.*, 2004) de genes envolvidos no ciclo celular. Isso indica que *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* podem também estar envolvidos na regulação e controle da PCD de forma direta. Independente do TRV, a redução na expressão dos genes alteraria rotas de sinalização, gerando o fenótipo observado. Este envolvimento pode ainda estar relacionado aos processos de senescência, visto que tais genes apresentam baixos níveis de expressão no final do ciclo de vida da planta (Figura 3). Além disso, a HR está associada à sinalização por AS (Rao & Davis, 1999). Esta indução estaria de acordo com outros resultados encontrados, como o aumento da expressão de *NbPR1a* em plantas silenciadas (Fig. 9D).

Do mesmo modo, plantas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP. Este vetor é semelhante à TRV-NbPROPEP, porém contendo a

sequência que codifica o peptídeo em *S. lycopersicum*. As plantas também apresentaram o fenótipo de morte celular (Figuras 8C e 8F). Em alguns casos, a morte celular das plantas TRV-SIPROPEP surgiu em menor tempo e avançou mais rapidamente. As observações de morte celular não foram quantificadas nem verificadas com testes estatísticos quanto à significância destas diferenças.

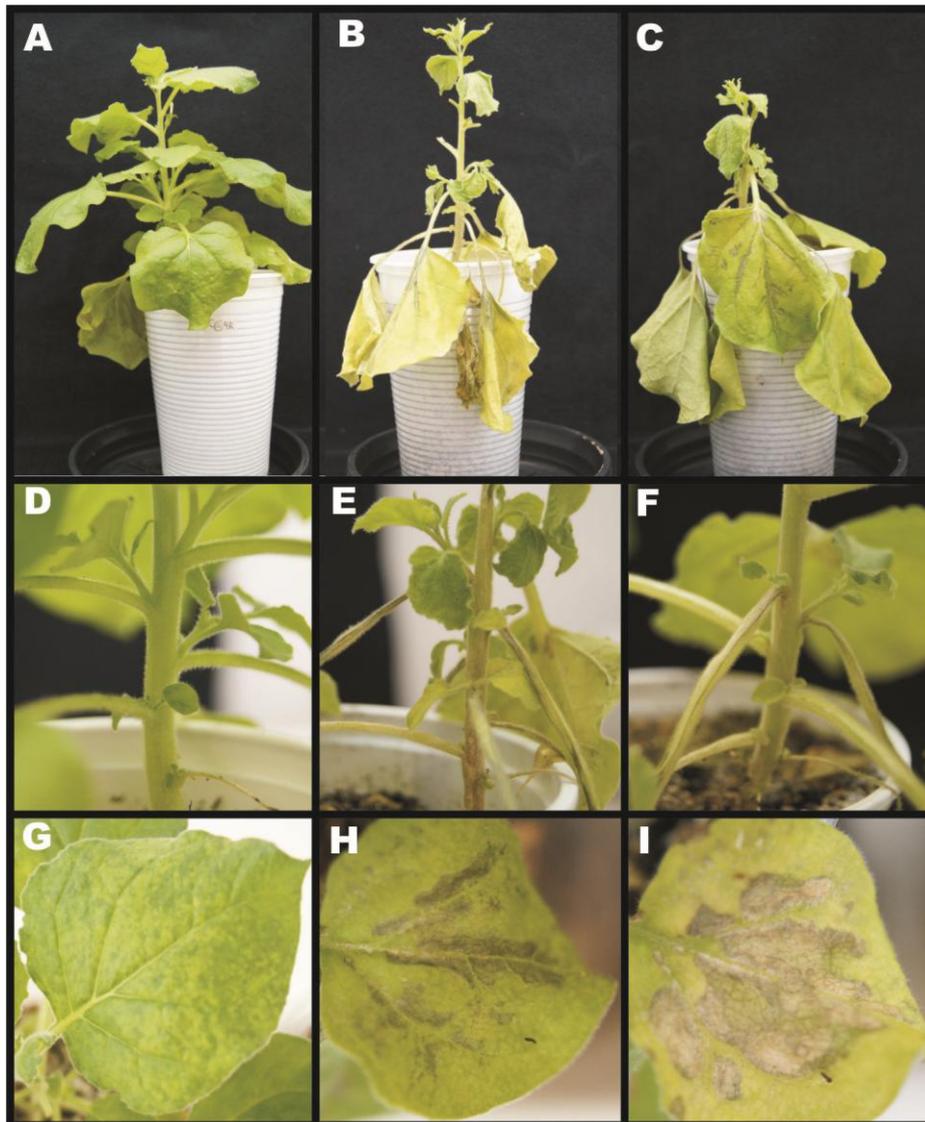


FIGURA 8. Clorose e morte celular em *Nicotiana benthamiana*. (A) e (D) Plantas agroinfiltradas com água (controle), (B) e (E) TRV-NbPROPEP e (C) e (F) TRV-SIPROPEP e fotografadas com 12 dias após a agroinfiltração. Em detalhe, folha apresentando sintoma de (G) clorose em 18 dias, e morte celular em (H) 10 e (I) 18 dias após a agroinfiltração.

O teste do efeito de genes em sistemas heterólogos é usado comumente para evidenciar a conservação de vias de transdução de sinais, como por exemplo, o gene *Sw-5* de tomateiro, que confere resistência em várias espécies da família *Solanaceae* como o tabaco e a berinjela (Lau *et al.*, 2006). No presente estudo foi utilizada a construção TRV-SIPROPEP que causa silenciamento em *S. lycopersicum* (Trivilin *et al.*, 2014). Em *N. benthamiana*, a similaridade entre as sequências é de 80%, porém não há 20 a 23 nucleotídeos idênticos (mesmo nucleotídeo e mesma posição), o mínimo necessário para a ocorrência do silenciamento. Entretanto, as plantas agroinfiltradas com TRV-SIPROPEP desenvolveram o mesmo fenótipo de morte celular. Cabe ressaltar que até o momento, nenhum trabalho com peptídeo endógeno sinalizador apresentou este tipo de fenótipo. Estes resultados indicam a possibilidade de NbPep estar relacionado com rotas de controle e regulação da PCD ou a HR ao vírus.

#### **4.3.3 Desenvolvimento da doença em plantas TRV-NbPROPEP e TRV-SIPROPEP inoculadas com *Botrytis cinerea***

A relação de peptídeos endógenos sinalizadores com a amplificação de sinais de defesa a patógenos já foi amplamente demonstrada em vários trabalhos (Huffaker *et al.*, 2006a; Pearce *et al.*, 2010; Huffaker *et al.*, 2011; Trivilin *et al.*, 2014). Devido a isso, as plantas pTRV2b-NbPROPEP e também as plantas pTRV2b-SIPROPEP foram inoculadas com *B. cinerea* seis dias após a agroinfiltração.

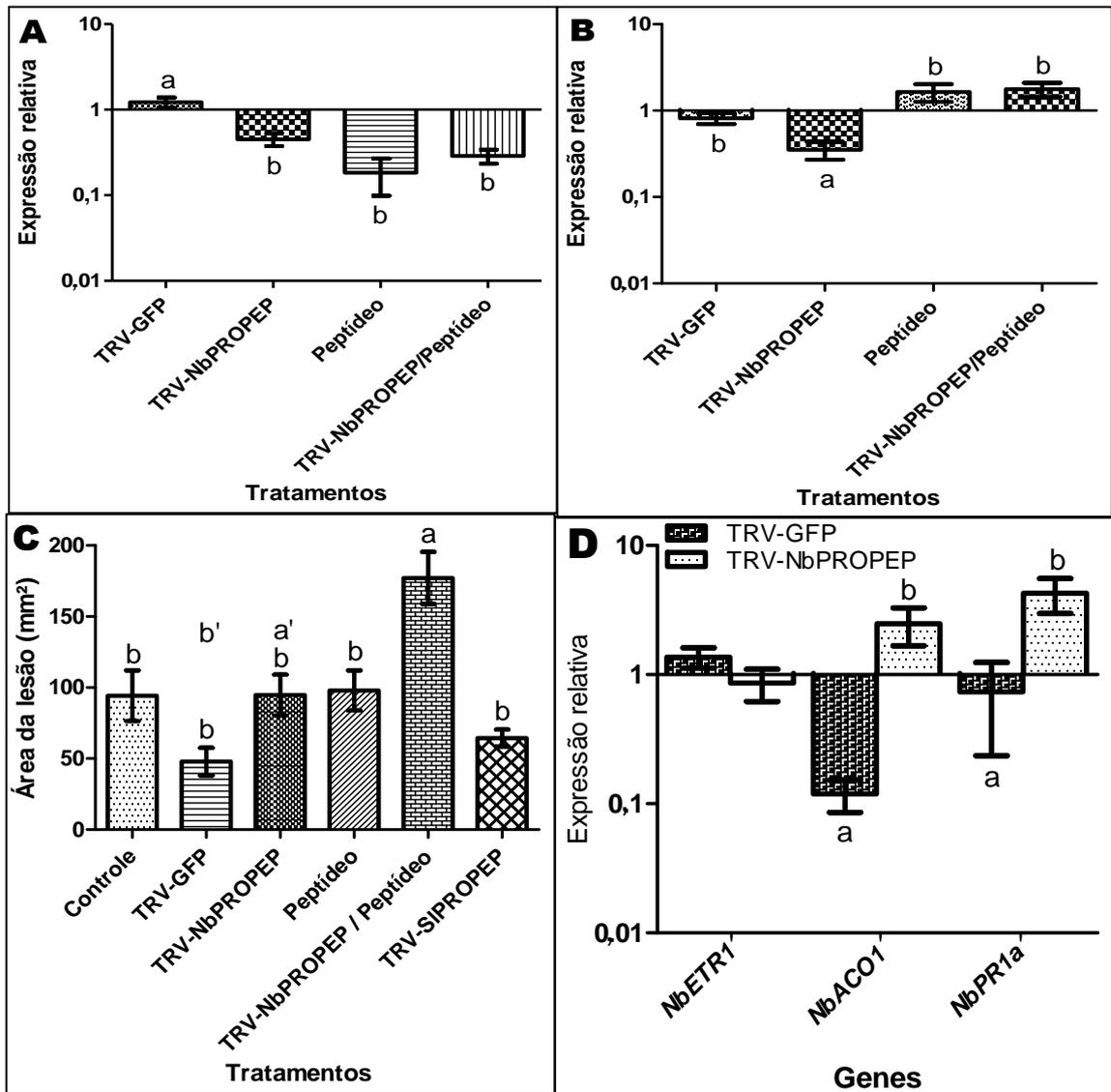


FIGURA 9. Relação da agroinfiltração de TRV-NbPROPEP, TRV-SIPROPEP e o peptídeo sintético em *Nicotiana benthamiana*. Expressão relativa de (A) *NbPROPEP1* e (B) *NbPROPEP2*. (C) Área da lesão de folhas de *N. benthamiana* inoculadas com plug contendo micélio de *Botrytis cinerea* e (D) a expressão relativa de genes relacionados a defesa. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (*NbEF-1a*). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumentou ou diminuiu em relação ao calibrador (valor 1,0), em escala logarítmica. Colunas com letras diferentes diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A expressão de *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* foi avaliada em plantas pTRV2b-NbPROPEP no momento da inoculação do patógeno. A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que ambos os genes foram silenciados com relação ao calibrador (planta controle, infiltrada com ADE) (Figuras 9A e B) e às

plantas agroinfiltradas com pTRV2b-GFP. A severidade da doença (Figura 9C) nas plantas silenciadas foi maior que das plantas TRV-GFP, mas o mesmo nível que o controle. Tais resultados indicam que a infiltração de TRV gera alguma alteração na planta, afetando a severidade da doença. Essa influência não é observada na expressão de *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*, mas de outros genes relacionados a defesa (Figura 9D). Ao observar os mesmos resultados de algumas destas amostras individualmente (Figura 10) observou-se que existe uma fraca relação. Algumas plantas com reduzida expressão do gene *NbPROPEP1* apresentaram aumento da área de lesão (Figura 10, amostras 2, 3, 8, 1 e 6), não sendo observado o mesmo para o gene *NbPROPEP2* (dados não apresentados), o que indica a possibilidade de *NbPROPEP1* estar envolvido com a doença.

O peptídeo da família PROPEP foi caracterizado por amplificar sinais de defesa relacionados à via de sinalização por ET em diversas espécies. As rotas hormonais envolvidas na defesa a *B. cinerea* variam muito, conforme a espécie da planta hospedeira, sendo a sinalização por ET necessária ou não. Em *A. thaliana* as rotas mediadas por ET, e também por AJ, têm importante contribuição na defesa a *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1999). Em tomateiro, ET induz ao aumento de resistência a *B. cinerea* quando aplicado isoladamente, pois em conjunto com AS não difere das plantas controles (Díaz *et al.*, 2002). Além disso, Chagué *et al.* (2002) mostraram que *B. cinerea* é capaz de sintetizar um composto que em presença de luz é oxidado, liberando ET, podendo afetar os níveis deste hormônio durante a infecção da planta. A presença do ET acelera a senescência, e o desenvolvimento de necrose, que beneficia patógenos necrotróficos (Díaz *et al.*, 2002), como é o caso de *B. cinerea*. Ou seja, na ausência do peptídeo para amplificar os sinais da via de sinalização por ET, o

próprio patógeno pode sintetizar o hormônio. Esta síntese pode favorecer, neste caso, o crescimento de *B. cinerea* no presente estudo. Além disso, a ocorrência de intensa morte celular nas plantas silenciadas indica que o peptídeo pode fazer parte do controle da morte PCD. A redução na expressão de seus genes precursores estaria favorecendo o avanço do patógeno, enquanto que o vetor TRV estaria induzindo à resistência, evitando níveis mais severos da doença. Devido a isso, as plantas TRV-GFP estariam mostrando mais resistência, observada através da menor área de lesão encontrada.

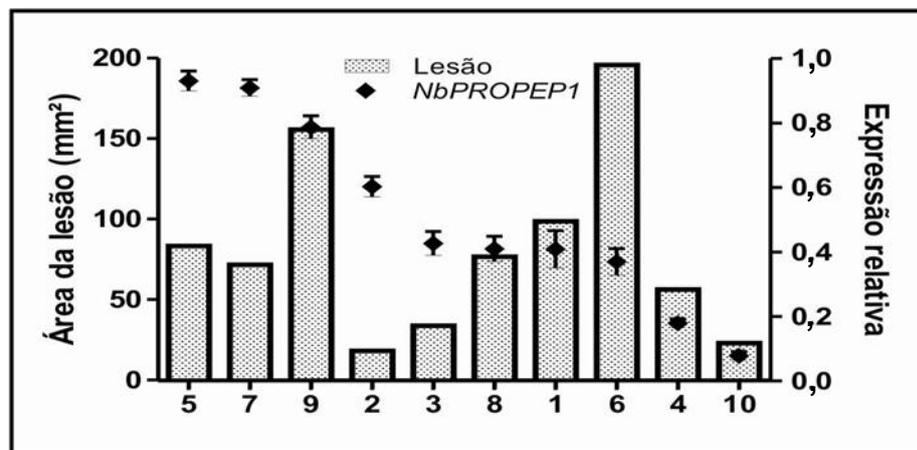


FIGURA 10. Área da lesão e expressão de *NbPROPEP1* em plantas silenciadas de *Nicotiana benthamiana*. Folhas foram inoculadas com plug contendo micélio de *Botrytis cinerea* (barras cinzas) e suas respectivas expressões relativas (pontos pretos) para o gene *NbPROPEP1*. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (*NbEF-1a*). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador (valor 1.0).

Diversos trabalhos demonstram ainda que a rota de defesa sinalizada por AS está envolvida na defesa a *B. cinerea* em outras espécies de plantas, como tomate (Díaz *et al.*, 2002, El Oirdi *et al.*, 2011) e tabaco (Murphy *et al.*, 2000). Em *A. thaliana*, o pré-tratamento com o hormônio não reduziu a doença, mas a redução de AS a níveis basais aumentou os sintomas (Govrin & Levine, 2002). Esta pode ser outra forma de sinalização envolvida na defesa de *N. benthamiana* a *B. cinerea*, que lhe permite controlar parcialmente a infecção.

As plantas de *N. benthamiana* que foram agroinfiltradas com o vetor TRV-SIPROPEP também foram inoculadas com *B. cinerea*. As pequenas diferenças na área da lesão observadas não foram significativas. Além disso, estas plantas não foram analisadas quanto à expressão de genes utilizados neste estudo. Devido a isso, e a falta de estudos complementares, não é possível afirmar qual a relação do vetor agroinfiltrado com a doença.

Com base nos resultados aqui obtidos, pode-se sugerir que o peptídeo NbPep pode estar envolvido na resistência de *N. benthamiana* a *B. cinerea*. A redução da expressão dos seus precursores não impede a ação de outras vias de sinalização, mas permite o avanço do patógeno. Junto ao peptídeo há a possível interação do vetor TRV, que estaria induzindo mecanismos de resistência. Com isso, as plantas que apresentam níveis normais de expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* e agroinfiltradas com TRV-GFP são capazes de impedir que a doença seja mais severa.

#### **4.3.4 Análise da expressão de genes relacionados à defesa**

Ao estudar vias de sinalização relacionadas à defesa, é importante avaliar a expressão de genes relacionados, conforme é visto em trabalhos deste gênero (Shan & Goodwin, 2006; Pearce *et al.*, 2010). Com isto é possível deduzir quais rotas de sinalização podem estar ativas / reprimidas e seu possível envolvimento com a defesa da espécie de planta estudada. Devido à importância da avaliação da expressão de genes relacionados com a defesa da planta, foi realizada a análise da expressão de alguns genes através da técnica de RT-qPCR.

A análise incluiu os oligonucleotídeos iniciadores para os seguintes genes: *NbERF1*, *NbETR1*, *NbACO1* e *NbPR1a* (Figura 9D). O gene *ERF1* (fator de ligação responsivo a ET) é um fator de transcrição que age na ativação das

respostas sinalizadas por ET e AJ, na defesa contra patógenos e herbívoros (Lorenzo *et al.*, 2002). No presente estudo, a expressão deste gene não foi detectada nas plantas silenciadas e pTRV2b-GFP, somente nas plantas controle (infiltradas com ADE; dados não apresentados). O uso de VIGS através da agroinfiltração pode gerar sintomas na planta, que tendem mais brandos com o uso do vetor TRV (Unver & Budak, 2009). Com isso pode-se supor que a agroinfiltração do vetor viral gerou uma ativação das rotas do ET e/ou do AS no presente estudo, mesmo que em baixos níveis. Em *A. thaliana*, a ativação de *ERF1* exige que as rotas de sinalização por ET e AJ estejam simultaneamente ativas, onde mutações em uma ou outra rota impedem sua expressão (Lorenzo *et al.*, 2002). Em geral, a ativação da rota do AS é conhecida por bloquear a sinalização por AJ (El Oirdi *et al.*, 2011). A possível indução da sinalização por AS bloquearia a rota de AJ, impedindo a expressão de *NbERF1* nas plantas que foram agroinfiltradas com o pTRV2b-GFP, e por isso encontrada nas plantas controle em níveis basais.

*ETR1* (receptor de ET) é um gene pertencente a uma família de receptores de ET, o primeiro a ser identificado em Arabidopsis (Bleecker & Kende, 2000). *ETR1* é normalmente expresso na planta, pois a sinalização por ET está envolvida com várias rotas de desenvolvimento na planta. Este receptor, em conjunto com outros controla as respostas a ET (Grefen *et al.*, 2008). Neste trabalho, a expressão deste gene não apresentou diferenças significativas (Figura 9D).

*ACO1* (ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano oxidase) é uma enzima envolvida na síntese do ET, onde faz a conversão do ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano em ET (Shan & Goodwin, 2006). *ACO1* pertence a uma família gênica que pode ser induzida por diferentes reguladores bióticos e abióticos. Em

*N. glutinosa*, dois de três genes *ACC oxidase* foram induzidos em resposta a infecção por TMV (Tobacco mosaic virus) e ao tratamento com ET. Os resultados aqui obtidos com a expressão relativa do gene *NbACO1* foram de indução nas plantas silenciadas e redução em TRV-GFP, sendo esta diferença significativa (Figura 9D). Embora haja redução na expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*, houve o aumento da expressão de *NbACO1*. Isso comprova que a via de sinalização por ET, a partir da sua síntese, continua ativa independentemente da ausência do peptídeo, sendo possivelmente induzida por outras vias de sinalização. As plantas silenciadas apresentaram morte celular sistêmica (Figura 8), que pode estar relacionada com a presença de ET. É possível que a ativação da sinalização por ET tenha induzido ao aumento de expressão de *NbACO1* nestas plantas. Já nas plantas TRV-GFP, a presença do peptídeo e do vetor reprimiu a expressão deste gene, indicando que menos ET esteja sendo sintetizado.

As proteínas PR (proteínas relacionadas à patogênese) estão divididas em 17 diferentes famílias. PR-1 desenvolve um importante papel na defesa contra patógenos, além de estar envolvida na proteção da planta a estresses abióticos (Zhu *et al.*, 2012). A expressão de seu gene precursor pode ser controlada pela sinalização por diversos fitohormônios, sendo mais induzida por AS. Em tomate foi mostrado que AS e ET agem sinergicamente na expressão de PR (Díaz *et al.*, 2002), além da sua indução por ferimento (Francia *et al.*, 2007). A expressão relativa de *NbPR1a* para as plantas silenciadas neste trabalho foi significativamente maior que a expressão de TRV-GFP. Conforme dito anteriormente, pode-se inferir que houve uma indução da sinalização por AS, bem como por ET que, por sua vez, induziram a expressão de *NbPR1a* nas plantas silenciadas. As proteínas codificadas por este gene, por estarem em alta

concentração, podem ter colaborado para que a doença não fosse mais severa nas plantas silenciadas. Em *A. thaliana*, porém, *PR1* é induzida pela inoculação de *B. cinerea* de maneira independente da sinalização por AS (Govrin & Levine, 2002), indicando que a alta expressão deste gene pode ter favorecido a doença, e não reduzido.

A partir da avaliação da expressão relativa destes genes, pode-se inferir que as vias de sinalização por AS e ET estejam induzidas nas plantas silenciadas e reduzidas nas plantas TRV-GFP. Em geral, os genes *ACO1* e *PR1* são relacionados à maior resistência. Neste estudo a expressão elevada nas silenciadas está relacionada à maior área de lesão, comparada à redução na expressão e menor área de lesão nas plantas TRV-GFP. Esses resultados corroboram a hipótese da presença do ET nas plantas silenciadas e o favorecimento da doença. Ou seja, as vias induzidas por ET e AS não estão envolvidas diretamente na resistência de *N. benthamiana* à *B. cinerea*.

#### **4.4 Avaliação da importância do peptídeo NbPep para *Nicotiana benthamiana***

Conforme já descrito anteriormente, existe uma relação bem descrita dos peptídeos sinalizadores endógenos com a amplificação de sinais através da indução de genes da planta envolvidos na resistência. Os trabalhos nesta área utilizam tanto transformantes para superexpressar o peptídeo (Huffaker *et al.*, 2006a, Trivilin, 2008), como o peptídeo sintetizado e aplicado diretamente (Huffaker *et al.*, 2006a; Pearce *et al.*, 2010, Yamaguchi *et al.*, 2011). A fim de verificar a importância do peptídeo através do aumento de sua concentração foi utilizada a infiltração local do peptídeo sintético em folha.

#### **4.4.1 Influência de diferentes concentrações do peptídeo sintético na doença por *Botrytis cinerea***

Inicialmente foi testado o efeito da concentração do peptídeo infiltrado na doença. Conforme pode ser visto na Figura 11, a infiltração do peptídeo sintético na concentração de 10 nM gerou um aumento significativo da lesão, pois a área dobrou de tamanho em relação ao controle (folha infiltrada com ADE). Semelhante resultado foi observado na concentração mais elevada (1000 nM). Em *A. thaliana* o peptídeo foi testado quanto a sua capacidade de alterar o pH em cultura de tecido, apresentando atividade em ensaios de alcalinização com 0,25 nM. Nos experimentos de resistência e expressão do mesmo estudo, utilizaram a concentração de 10 nM (Huffaker *et al.*, 2006a). Já os trabalhos que identificaram peptídeos sinalizadores em soja utilizaram 25 nM do peptídeo sintético em seus experimentos de teste de resistência (Pearce *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2011). Com base na influência significativa do peptídeo infiltrado a partir de 10 nM, e em conjunto com as informações dos estudos anteriores, a concentração de 20 nM foi utilizada nos experimentos seguintes.

É interessante observar que diferentemente de quase todos os trabalhos anteriores com peptídeos endógenos sinalizadores, principalmente da família PROPEP, a infiltração do peptídeo não favoreceu a defesa da planta, pois permitiu um maior tamanho de lesão devido ao avanço do patógeno.

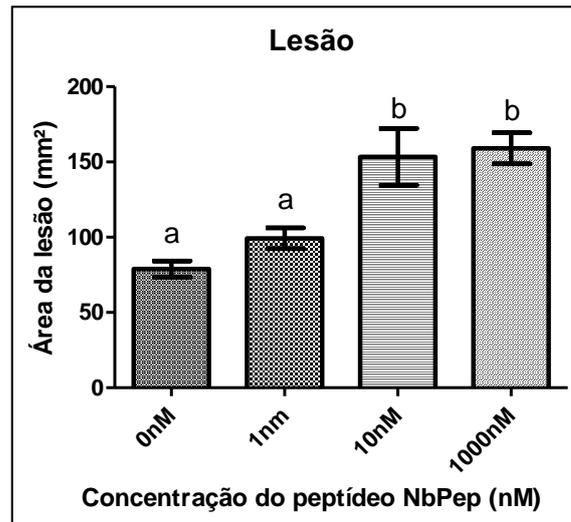


FIGURA 11. Área da lesão em folhas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas com diferentes concentrações do peptídeo sintético NbPep. As folhas foram inoculadas com plug com micélio de *Botrytis cinerea*. Colunas com letras diferentes diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.2 Indução da expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* pelo peptídeo infiltrado

Conforme o modelo sugerido por Huffaker *et al.* (2007), o peptídeo sinalizador codificado pela família gênica PROPEP amplifica os sinais de defesa através da sua síntese induzida por ET, seguida da sua auto indução, ou seja, o peptídeo induz a síntese da sua proteína precursora AtproPep. Com o propósito de averiguar se em *N. benthamiana* também ocorre esta realimentação positiva, foi realizada a infiltração do peptídeo sintético e a análise da expressão.

A expressão de *NbPROPEP1* foi induzida em 30 min após a infiltração, sendo este gene quatro vezes mais expresso que o tempo inicial. Após 90 min, a expressão do gene já estava no mesmo nível inicial, sendo reprimido em 2 h após a infiltração (Figura 12A). O gene *NbPROPEP2* foi mais expresso em 60 min. Houve uma redução em sua expressão também no intervalo de tempo de 2 h, mas permanecendo mais expresso que o tempo inicial (Figura 12B). Contudo, a expressão das plantas controles (infiltradas com ADE) apresentou níveis de

indução muito próximos e sem diferença significativa para ambos os genes (Figuras 12A e B). Conforme observado, o peptídeo sintético infiltrado não induziu a expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* de forma distinta ao controle. A indução da expressão provavelmente se deve pelo ferimento causado na folha para a infiltração do peptídeo. O ferimento da planta induz a biossíntese de diversos compostos, entre eles os hormônios também envolvidos nos processos de defesa a patógenos (Díaz *et al.*, 2002; Francia *et al.*, 2007) como o AJ, AS, ET e ABA. Tais hormônios induzem a expressão de genes responsivos ao ferimento (WR), sendo o ET quem desempenha papel essencial nessa indução (Francia *et al.*, 2007). O ferimento causado pela seringa durante a infiltração do peptídeo parece induzir a biossíntese de ET. A indução do gene *AtPROPEP* por ET é encontrada em *A. thaliana* (Huffaker *et al.*, 2006) e em soja do gene *GmPROPEP914* (Yamaguchi *et al.*, 2011). O ferimento por si só induz a expressão de *AtPROPEP1* (Huffaker *et al.*, 2006). Com a ocorrência do ferimento na folha, é provável que tenha ocorrido a liberação do ET. A possível presença de ET e o ferimento em si teriam induzido a expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*. E, diferentemente dos resultados obtidos por Huffaker *et al.* (2007), o peptídeo não apresentou a capacidade de induzir sua própria expressão.

A indução da expressão dos genes *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* foi analisada ainda em outros intervalos de tempo (Apêndice 5A e B). Esta avaliação foi realizada apenas uma vez. Estes resultados apontam para a redução na expressão de *NbPROPEP1* em 2 h, permanecendo reduzido em até 8 h após a infiltração, para o peptídeo e para o controle. Com relação à expressão do gene *NbPROPEP2* (Apêndice 5B), a expressão permaneceu induzida em relação ao tempo inicial, seguindo os resultados de curto prazo (Figura 12B). Estes resultados em conjunto indicam que a indução ou repressão dos genes

*NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* não está relacionada com a presença do peptídeo sintético infiltrado.

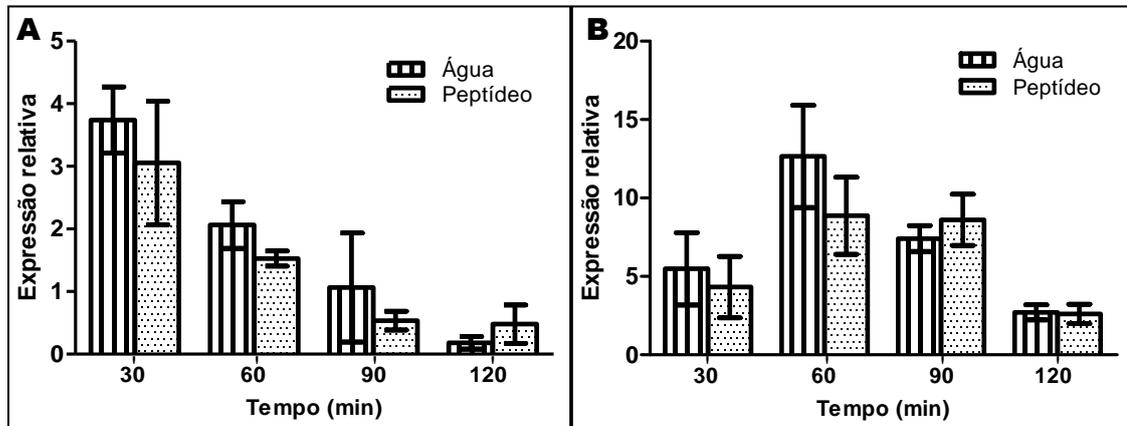


FIGURA 12. Expressão relativa de (A) *NbPROPEP1* e (B) *NbPROPEP2* em folhas infiltradas com *NbPep*. Folhas de *Nicotiana benthamiana* foram infiltradas com o peptídeo sintético na concentração de 20 nM e coletadas ao longo do tempo. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (*NbEF-1α*). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador (tempo zero; valor 1).

#### 4.4.3 Infiltração do peptídeo sintético e desenvolvimento da doença por *Botrytis cinerea*

O peptídeo sintético foi infiltrado em *N. benthamiana* para avaliação da expressão de *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2* em conjunto com a progressão da doença. As plantas infiltradas com o peptídeo sintético apresentaram redução significativa de aproximadamente 100 vezes na expressão do gene *NbPROPEP1* (Fig. 9A), e um aumento na expressão do gene *NbPROPEP2* (Figura 9B), não significativo. Esta diferença entre os genes foi igualmente encontrada na avaliação da expressão em 2 h após infiltração (Figura 12), tempo utilizado neste experimento com *B. cinerea*. Contudo, neste experimento a planta controle não

recebeu o ferimento na folha que foi utilizada (Figuras 9A, B e C), que provavelmente influenciaria nos resultados.

A área da lesão das plantas infiltradas com o peptídeo sintético foi praticamente a mesma que o controle (infiltradas com ADE). Contudo, é importante lembrar que as plantas controles deste experimento não receberam o ferimento na folha destacada. Com isso pode-se supor que a média da área de lesão da planta controle poderia ser menor. A partir disso, é possível também supor que a doença das plantas infiltradas com o peptídeo poderia ser mais severa que das plantas controle. Em acordo com outros resultados apresentados (Figura 11), o peptídeo poderia favorecer o desenvolvimento da doença, independente das rotas ativadas devido ao ferimento.

Todos os trabalhos que avaliaram esse tipo de peptídeo sinalizador encontraram resultados de aumento de resistência. Plantas de *A. thaliana* transformadas para expressar constitutivamente a proteína precursora do AtPep apresentaram elevada expressão de genes de defesa e maior resistência ao patógeno necrotrófico *P. irregulare* (Huffaker *et al.*, 2006a). O mesmo efeito de melhora na resistência foi encontrado com a aplicação direta do peptídeo AtPep em *A. thaliana*, na defesa a *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (Yamaguchi *et al.*, 2010). Em milho (*Zea mays*), o pré-tratamento com o peptídeo ZmPep melhorou a resistência a *Cochliobolus heterostrophus* (Huffaker *et al.*, 2012). Já no presente estudo, o peptídeo infiltrado permitiu o avanço da doença da mesma forma que nas plantas silenciadas. Tanto a ausência como a presença do peptídeo promoveu o desenvolvimento da lesão. O favorecimento da doença poderia estar envolvida com a redução na expressão de *NbPROPEP1*. Plantas de *A. thaliana* transformadas para expressar *PROPEP1* constitutivamente apresentaram maior incidência de plantas mortas quando inoculadas com *P.*

*graminicola* e *P. dissotocum*. Entretanto foram mais resistentes ao patógeno necrotrófico *Pythium deliense* (Trivilin, 2008). Um possível motivo é o não reconhecimento do patógeno por parte da planta. Sem o reconhecimento das PAMPs, não há ativação das vias de sinalização, inclusive do peptídeo, o que permite maior incidência de doença (Trivilin, 2008). Da mesma forma no presente estudo, *N. benthamiana* poderia não reconhecer o patógeno e, por isso, não ativar as rotas necessárias, permitindo o avanço de *B. cinerea* de forma semelhante ao controle. Outra possibilidade é a questão bem conhecida da virulência e agressividade de *B. cinerea*. Esta espécie tende a ser mais destrutiva em tecidos maduros ou senescentes, principalmente em condições favoráveis de temperatura e umidade (Williamson *et al.*, 2007). E estas condições são encontradas nos experimento com câmara úmida. A folha, por ser destacada, inicia o processo natural de senescência. Além disso, o ambiente de luz e temperatura é praticamente o ideal para o patógeno. El Oirdi *et al.* (2010) demonstraram que o tipo de inóculo de *B. cinerea* interfere no desenvolvimento da doença. A resistência de *N. tabacum* é menor quando inoculada com micélio, comparado ao inóculo de esporos. Essa diferença se deve a ação da escopoletina, que é capaz de inibir a germinação dos esporos, mas que não afeta o crescimento do micélio (El Oirdi *et al.*, 2010). Devido a essa possível diferença entre micélio e esporo o peptídeo, no presente estudo, pode não ter efeito contra este patógeno, favorecendo seu crescimento. As vias de sinalização e compostos utilizados pela planta para resistir a *B. cinerea* variam muito conforme a espécie da planta (Díaz *et al.*, 2002). Em *S. lycopersicum*, por exemplo, a sistemina é um fator importante na resistência a *B. cinerea*, independentemente de outras vias de sinalização (Díaz *et al.*, 2002). Ademais o ferimento de raízes aumenta a resistência, mesmo que parcial, a vários patógenos, entre eles *B. cinerea* (Francia *et al.*, 2007).

Conforme os resultados obtidos nesta etapa deste estudo, o ferimento em conjunto com a infiltração do peptídeo sintético não afetou a lesão, comparada ao controle. Contudo, este controle não recebeu o ferimento, permitindo supor que a doença poderia ser menor, e o peptídeo junto ao ferimento favoreceriam a doença. De qualquer forma, outros mecanismos de resistência podem estar agindo impedindo que a área de lesão fosse maior.

Na tentativa de repor a função do peptídeo silenciado, algumas folhas das plantas TRV-NbPROPEP foram infiltradas com o peptídeo sintético e avaliadas nos mesmos parâmetros. A expressão de *NbPROPEP1* (Figura 9A) nas folhas TRV-NbPROPEP / Peptídeo foi significativamente menor e de *NbPROPEP2* (Figura 9B) foi um pouco maior que o controle, semelhante ao encontrado para as plantas infiltradas com o peptídeo. O ferimento decorrente da infiltração do peptídeo pode estar ativando a via de sinalização por ET (Francia *et al.*, 2007), alterando a expressão. De mesmo modo, esta indução pode ocorrer diretamente devido ao ferimento, como visto em *A. thaliana* (Huffaker *et al.*, 2006).

A severidade da doença das plantas TRV-NbPROPEP / Peptídeo foi significativamente superior a todos outros tratamentos (Figura 9C). O efeito da infiltração do peptídeo e do silenciamento, separadamente, é de aumento da lesão a níveis praticamente iguais. Ao inserir o peptídeo em uma folha silenciada, a lesão aumenta mais rapidamente. Uma possível explicação é a influência do peptídeo em algum nível pós transcricional, não sendo o efeito direto dele na sua realimentação positiva. Teoricamente, o peptídeo está presente na folha devido a infiltração. Pearce *et al.* (2010) observaram essa possibilidade de controle na ação do peptídeo GmSubPep em soja. O gene precursor do peptídeo não foi induzido por hormônios envolvidos na defesa, mas a presença do peptídeo induziu a expressão de genes relacionados. Outra possibilidade para o resultado

observado é a ocorrência de um efeito de realimentação negativa, onde o produto final inibe ou reduz sua síntese. Os peptídeos derivados de genes *PROPEP*, conforme já evidenciado, possuem propriedade de amplificação de sinais de defesa através do mecanismo de realimentação positiva (Huffaker & Ryan, 2007). No presente estudo, o excesso de peptídeo induziria a planta a reduzir a expressão, sendo esta alteração em tempo superior ao tempo utilizado na análise de expressão. Com isso, o silenciamento acabaria sendo mais intenso. Ou seja, em ambas as situações, o peptídeo sintético influenciaria no silenciamento. Além disso, beneficiaria a doença da mesma maneira que pode ter ocorrido nas plantas infiltradas com o peptídeo. Porém ambos os tratamentos se somariam e, por isso, permitiriam que *B. cinerea* crescesse mais rapidamente.

#### **4.4.4 Análise da expressão de genes relacionados à defesa**

Assim como analisada nas plantas silenciadas, a expressão relativa de alguns genes envolvidos com a defesa foi também avaliada (Fig. 13). O intuito foi verificar se o peptídeo induziu a expressão dos genes avaliados que foram: *NbERF1*, *NbETR1*, *NbACO1* e *NbPR1a*.

*NbERF1* não apresentou expressão nas plantas infiltradas apenas com o vetor TRV-GFP. Além disso, as plantas infiltradas apenas com o peptídeo apresentaram uma indução de 10 vezes em relação ao controle. A partir do resultado encontrado para este gene (Fig. 13), em conjunto com o resultado das plantas silenciadas (Fig. 9D), pode-se afirmar de que houve sua indução nas plantas infiltradas com o peptídeo, mesmo que não significativo. Esta indução pode ser devido ao peptídeo sintético ou ao ferimento. Ambas as vias induzem a rota sinalizada por ET e, por consequência, ativariam *NbERF1*, que codifica fatores de transcrição envolvidos na defesa contra necrotróficos (Robert-

Seilaniantz *et al.*, 2011). Em *A. thaliana*, o duplo mutante para os receptores do peptídeo, *pepr1/pepr2*, implicam na redução da expressão de *ERF1* (Liu *et al.*, 2013), indicando o possível envolvimento do peptídeo com a regulação deste gene. Neste caso, porém, não houve aumento da resistência devido a esse gene.

*NbETR1* foi expresso em todas as plantas, inclusive naquelas infiltradas com o vetor viral (TRV-GFP e TRV-NbPROPEP / Peptídeo). Essa expressão foi próxima ao controle e não difere significativamente entre si. *ETR1* é um receptor de ET e por isso é normalmente encontrado na planta.

A expressão relativa do gene *NbACO1* foi reduzida nas plantas TRV-GFP e significativamente induzida em ambos os tratamentos com o peptídeo sintético infiltrado (Figura 13). Nas plantas apenas infiltradas com o peptídeo sintético, a indução da expressão de *NbACO1* pode estar ocorrendo tanto devido a presença do peptídeo na folha, bem como devido ao ferimento, visto que ambos induzem a sinalização por ET. Já as plantas TRV-NbPROPEP / Peptídeo, além das vias citadas, podem ter a sinalização por ET induzida por mecanismos relacionados ao processo de silenciamento, que leva posteriormente à morte celular (Figura 8).

Para o gene *NbPR1a*, as plantas TRV-GFP tiveram expressão abaixo do controle. Já as plantas tratadas com o peptídeo apresentaram maior expressão, não sendo esta variação significativa. O erro padrão para esse gene mostrou-se elevado devido a grande variação encontrada entre as diferentes plantas. A indução deste gene em ambos os tratamentos envolvendo o peptídeo sintético indicam que possivelmente a indução ocorreu pela presença de AS e/ou ET, em consenso com os demais resultados. Apesar da sua alta expressão, as proteínas PR não foram capazes de auxiliar na resistência.

A análise de expressão relativa destes genes relacionados à defesa em *N. benthamiana* em conjunto apontam que as respostas de sinalização entre plantas

silenciadas (Figura 9D) e infiltradas com o peptídeo (Figura 13) foram semelhantes. Possivelmente por isso apresentaram a média da área de lesão praticamente igual. Além disso, as plantas com os tratamentos unidos TRV-NbPROPEP / Peptídeo apresentaram um avanço maior da doença, e também a expressão destes genes levemente maior, porém sem diferença significativa. Ou seja, a expressão de tais genes não justifica a lesão maior, mas outros mecanismos provavelmente induzidos.

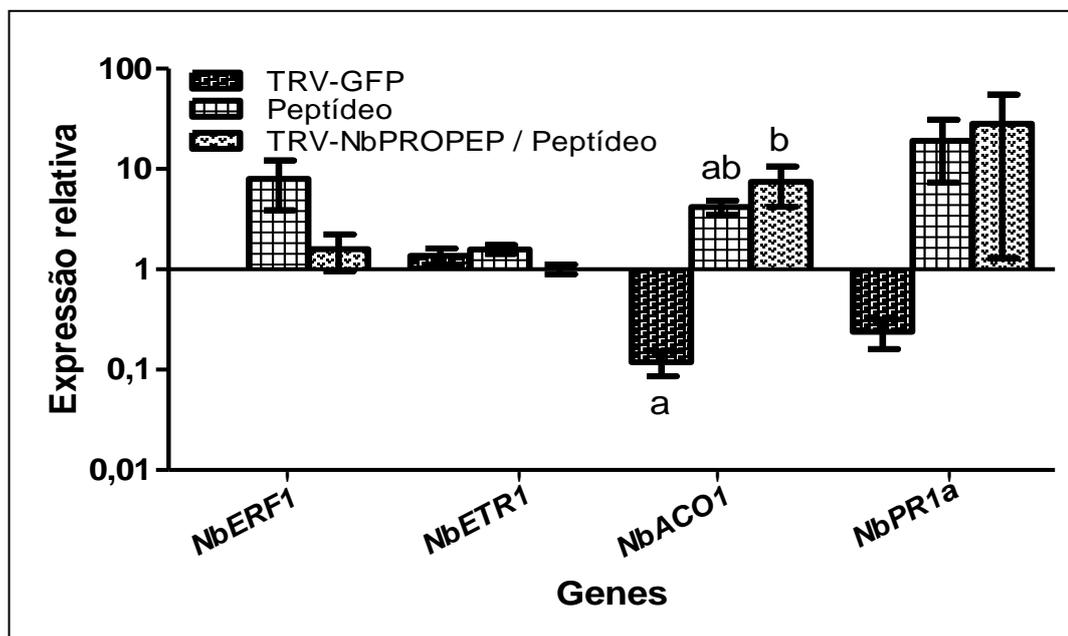


FIGURA 13. Expressão relativa de genes relacionados a defesa de plantas infiltradas com o peptídeo sintético ou infiltradas com pTRV2b-NbPROPEP e NbPep. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (*NbEF-1 $\alpha$* ). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador (plantas infiltradas com água, valor 1), em escala logarítmica. Colunas com letras diferentes diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05). As demais não apresentam diferenças significativas entre si.

## 5 CONCLUSÕES

1 – *Nicotiana benthamiana* possui ortólogos de *AtPROPEP*, sendo que a região correspondente ao peptídeo de *AtPep1* em *N. benthamiana* é idêntico entre *NbPROPEP1* e *NbPROPEP2*.

2 – Ambos os genes são expressos em *N. benthamiana* na folha, raiz, caule e flor, e também ao longo de todo desenvolvimento, tendo sua expressão reduzida próximo ao período de senescência das plantas.

3 – Este foi o primeiro trabalho que apresentou fenótipo de morte celular envolvendo o peptídeo sinalizador ortólogo de *AtPep1*, indicando seu envolvimento em outras rotas de sinalização em *N. benthamiana*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in plant science**, Kidlington, v. 17, n. 2, p. 73–90, 2012.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

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

BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 591–594, 2004.

BEYERS, T. et al. Resistance against *Botrytis cinerea* in smooth leaf pruning wounds of tomato does not depend on major disease signalling pathways. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 165–173, 2014.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual review of cell and developmental biology**, Palo Alto, v. 16, p. 1–18, 2000.

CHAGUÉ, V. et al. Ethylene biosynthesis in *Botrytis cinerea*. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 143–149, 2002.

BOMBARELY, A. et. al. The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. **Nucleic acids research**, London, v. 39, p. D1149-D1155, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935049>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

BOUARAB, K.; BRISSON, N.; DAAYF, F. **Molecular Plant - Microbe interactions**. St. Paul: CABI, 2009.

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

BURCH-SMITH, T. M. et al. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. **Plant physiology**, Rockville, v. 142, n. 1, p. 21–27, 2006.

CULLIS, C. A. **Plant genomics and proteomics**. Hoboken: Wiley Liss, 2004. p. 214.

DEAN, J. D.; GOODWIN, P. H.; HSIANG, T. Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 56, n. 416, p. 1525–1533, 2005.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DE MEYER, G.; HÖFTE, M. Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis cinerea* on Bean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 6, p. 588–593, 1997.

DE MICCOLIS ANGELINI, R. M. et al. Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. **Pest management science**, West Sussex, v. 70, n. 12, p. 1785–1796, 2014a.

DE MICCOLIS ANGELINI, R. M. M. et al. Molecular characterization and detection of resistance to SHDI fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). **Pest management science**, West Sussex, v. 70, n. 12, p. 1884–1893, 2014b.

DÍAZ, J. et al. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 3, p. 1341–1351, 2002.

DICKINSON, M. **Molecular Plant Pathology**. London: BIOS Scientific Publishers, 2003. p. 244.

DROBY, A.; LICHTER, A. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: ELAD, Y. et al. (Ed.). **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2007. p. 349–367.

EL OIRDI, M.; BOUARAB, K. Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **The New phytologist**, Oxford, v. 175, n. 1, p. 131–139, 2007.

EL OIRDI, M.; TRAPANI, A.; BOUARAB, K. The nature of tobacco resistance against *Botrytis cinerea* depends on the infection structures of the pathogen. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 239–253, 2010.

EL OIRDI, M. et al. *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. **The Plant cell**, Rockville, v. 23, n. 6, p. 2405–2421, 2011.

EL RAHMAN, T. A. et al. Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. **Molecular plant - microbe interactions : MPMI**, St. Paul, v. 25, n. 12, p. 1584–1593, 2012.

FERRARI, S. et al. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. **Plant physiology**, Rockville, v. 144, n. 1, p. 367–379, 2007.

FRANCIA, D. et al. Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection. **Plant, cell & environment**, New York, v. 30, n. 11, p. 1357–1365, 2007.

GILCHRIST, D. G.; GROGAN, R. G. Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 166, p. 165-171, 1975.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205–227, 2005.

GOODIN, M. M. et al. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, St. Paul, v. 21, n. 8, p. 1015–1026, 2008.

GOVRIN, E. M.; LEVINE, A. Infection of Arabidopsis with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 48, n. 3, p. 267–276, 2002.

GRAFEN, C. et al. Subcellular localization and in vivo interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. **Molecular plant**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 308–320, 2008.

HARTL, M. et al. Optimized virus-induced gene silencing in *Solanum nigrum* reveals the defensive function of leucine aminopeptidase against herbivores and the shortcomings of empty vector controls. **New Phytologist**, Oxford, v. 179, n. 2, p. 356–365, 2008.

HOLZ, G.; COERTZE, S.; WILLIAMSON, B. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: ELAD, Y. et al. (Ed.). **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2007. p. 9– 27.

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 26, p. 10098–100103, 2006a.

HUFFAKER A. et al. AtPep1 peptides. In: KASTIN, A. J. (Ed.). **Handbook of biologically active peptides**. San Diego: Academic Press, 2006b. p. 5–8.

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 United States of America**, Washington, v. 104, n. 25, p. 10732–10736, 2007.

HUFFAKER, A.; DAFOE, N. J.; SCHMELZ, E. A. ZmPep1, an ortholog of Arabidopsis elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. **Plant physiology**, Rockville, v. 155, n. 3, p. 1325–1338, 2011.

JABLONSKA, B. et al. The Mi-9 Gene from *Solanum arcanum* Conferring Heat-Stable Resistance to Root-Knot Nematodes Is a Homolog of Mi-1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 2, p. 1044-1054, 2007.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

KOECK, M.; HARDHAM, A.; DODDS, P. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1849-1857, 2011.

LAI, Z. et al. A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. **The Plant Journal**, Oxford, v. 66, n. 6, p. 953–968, 2011.

LAI, Z.; MENGISTE, T. Genetic and cellular mechanisms regulating plant responses to necrotrophic pathogens. **Current opinion in plant biology**, London, v. 16, n. 4, p. 505–512, 2013.

LALUK, K.; MENGISTE, T. Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, Rockville, n. 8, 2010.

LAU, D. et al. Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene de resistência Sw-5 de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 247–253, 2006.

LEROUX, P. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: ELAD, Y. et al. (Ed.). **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2007. p. 195– 222

LICO, C.; CHEN, Q.; SANTI, L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. **Journal of cellular physiology**, New York, v. 216, n. 2, p. 366–377, 2008.

LIN, Z. et al. Virus induced gene silencing of *AtCDC5* results in accelerated cell death in Arabidopsis leaves. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 87–94, 2007.

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, n. 15, p. 6205–6210, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, Duluth, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LORENZO, O. et al. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. **THE PLANT CELL ONLINE**, Rockville, v. 15, n. 1, p. 165–178, 2002.

MARKHAM, J. E.; HILLE, J. Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. **Molecular plant pathology**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 229–239, 2001.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 8, p. 4064-4071, 2008.

MENGISTE, T. Plant Immunity to Necrotrophs. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 267-294, 2012.

MURPHY, A. M.; HOLCOMBE, L. J.; CARR, J. P. Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 2, p. 47–54, 2000.

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

NAKAJIMA, M.; AKUTSU, K. Virulence factors of *Botrytis cinerea*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 1, p. 15–23, 2013.

OH, S. K. et al. Positive-selection and ligation-independent cloning vectors for large scale in planta expression for plant functional genomics. **Molecules and cells**, Seoul, v. 30, n. 6, p. 557–562, 2010.

PANDELOVA, I. et al. Host-Selective Toxins of *Pyrenophora tritici-repentis* Induce Common Responses Associated with Host Susceptibility. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 7, 2012.

PEARCE, G. et al. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, Washington, v. 253, n. 5022, p. 895-897, 1991.

PEARCE, G. et al. Structure-activity studies of AtPep1, a plant peptide signal involved in the innate immune response. **Peptides**, New York, v. 29, n. 12, p. 2083–2089, 2008.

PEARCE, G. et al. A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 33, p. 14921–14925, 2010.

PEDRAS, M. S. et al. The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: Phytotoxin production and phytoalexin elicitation. **Phytochemistry**, London, v. 70, n. 3, p. 394–402, 2009.

PRINS, T. W. et al. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In: KRONSTAD, J. W. (Ed.). **Fungal Pathology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 33-64.

RAO, M. V; DAVIS, K. R. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 603–614, 1999.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. G. 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.

RODRÍGUEZ-NEGRETE, E. A; CARRILLO-TRIPP, J.; RIVERA-BUSTAMA, R. F. RNA Silencing against Geminivirus: Complementary actio posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. **Journal of Virology**, México, v. 83, n. 3, p. 1332-1340, 2008.

ROWE, H. C. et al. Deficiencies in jasmonate-mediated plant defense reveal quantitative variation in *Botrytis cinerea* pathogenesis. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e1000861, 2010.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning**: a laboratory laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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. 457–579, 2010.

SENTHIL-KUMAR, M. et al. A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other *Solanaceae* species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. **The New phytologist**, Oxford, v. 176, n. 4, p. 782–791, 2007.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. **Plant biotechnology journal**, [Oxford], v. 9, n. 7, p. 797–806, 2011.

SHAN, X. C.; GOODWIN, P. H. Silencing an ACC oxidase gene affects the susceptible host response of *Nicotiana benthamiana* to infection by *Colletotrichum orbiculare*. **Plant cell reports**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 241–247, 2006.

SHARON, A. et al. Phytohormones in *Botrytis*-Plant interactions. In: ELAD, Y. et al. (Ed.). **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2007. p. 163– 179.

SHIBATA, Y.; KAWAKITA, K.; TAKEMOTO, D. Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, St. Paul, v. 23, n. 9, p. 1130–1142, 2010.

SPOEL, S. H.; JOHNSON, J. S.; DONG, X. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 47, p. 18842–18847, 2007.

STAAL, J. et al. RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of Arabidopsis to necrotrophic fungal pathogens. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 188–200, 2008.

STEENKAMP, L. E. **Analysis of the effects of the plant growth promoting substances GR24 and smoke water on abiotically stressed *Nicotiana benthamiana* seedlings**. 2011. 123 f. Thesis (Master of Science) - Faculty of Natural Sciences, Department of Genetics, Institute for Plant Biotechnology, Stellenbosch, 2011.

TENBERGE, K. B. Morphology and cellular organization in *Botrytis* interactions with plants. In: ELAD, Y. et al. (Ed.). **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2007. p. 67– 84.

THOMMA, B. P. et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 25, p. 15107–15111, 1998.

THOMMA, B. P. et al. Requirement of Functional Ethylene-Insensitive 2 Gene for Efficient Resistance of Arabidopsis to Infection by *Botrytis cinerea*. **Plant physiology**, Rockville, v. 121, n. 4, p. 1093–1102, 1999.

TODD, A. T. et. al. A functional genomics screen identifies diverse transcription factors that regulate alkaloid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 589–600, 2010.

TRIVILIN, A. P. **Superexpressão do gene codificante do peptídeo AtPep1 em *A. thaliana* visando a obtenção de resistência à isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium***. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

TRIVILIN, A. P.; HARTKE, S.; MORAES, M. G. Components of different signalling pathways regulated by a new orthologue of *AtPROPEP1* in tomato following infection by pathogens. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 1110-1118, 2014.

UNVER, T.; BUDAK, H. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. **International journal of plant genomics**, New York, v. 2009, 8 p. 2009.

VALERO, A. et al. Brief in vitro study on *Botrytis cinerea* and *Aspergillus carbonarius* regarding growth and ochratoxin A. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 327–332, 2008.

VAN BAARLEN, P.; LEGENDRE, L.; VAN KAN, J. Plant defence compounds against *Botrytis* infection. In: ELAD, Y. et al. (Ed.). **Botrytis: Biology, Pathology**

and Control. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2007. p. 143–162.

VAN KAN, J. A. L. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends in plant science**, Kidlington, v. 11, n. 5, p. 247–253, 2006.

VELÁSQUEZ, A. C.; CHAKRAVARTHY, S.; MARTIN, G. B. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. **Journal of visualized experiments : JoVE**, Boston, n. 28, p. 20–23, 2009.

VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **TRENDS in Genetics**, Cambridge, v. 17, n. 8, p. 449–459, 2001.

WALTON, J. D. HC-toxin. **Phytochemistry**, London, v. 67, n. 14, p. 1406–1413, 2006.

WANG, H. et al. Defence responses regulated by jasmonate and delayed senescence caused by ethylene receptor mutation contribute to the tolerance of petunia to *Botrytis cinerea*. **Molecular plant pathology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 453–69, 2013.

WEINGARTNER, M. et al. Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 3, March, p. 643–657, 2004.

WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 561–580, 2007.

WOLPERT, T. et al. Structure of victorin C, the major host-selective toxin from *Cochliobolus victoriae*. **Cellular and Molecular**, v. 168, n. 1980, p. 1524–1529, 1985.

YAMAGUCHI, Y. et al. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. **The Plant cell**, Rockville, v. 22, n. 2, p. 508–522, 2010.

YAMAGUCHI, Y. et al. GmPep914, an eight-amino acid peptide isolated from soybean leaves, activates defense-related genes. **Plant physiology**, Rockville, v. 156, n. 2, p. 932–942, 2011.

YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A. Endogenous peptide elicitors in higher plants. **Current opinion in plant biology**, London, v. 14, n. 4, p. 351–357, 2011.

YOSHIOKA, H. et al. Molecular mechanisms of generation for nitric oxide and reactive oxygen species, and role of the radical burst in plant immunity. **Molecules and cells**, Seoul, v. 28, n. 4, p. 321–329, 2009.

ZHANG, L.; VAN KAN, J. A. *Botrytis cinerea* mutants deficient in D-galacturonic acid catabolism have a perturbed virulence on *Nicotiana benthamiana* and Arabidopsis, but not on tomato. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 1, p. 19–29, 2013.

ZHU, F. et al. Prokaryotic expression of pathogenesis related protein 1 gene from *Nicotiana benthamiana*: antifungal activity and preparation of its polyclonal antibody. **Biotechnology letters**, Dordrecht, v. 34, n. 5, p. 919–924, 2012.

## 7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Sequência do EST de *Nicotiana benthamiana* encontrado no banco de dados SolGenes. Em destaque sublinhado a sequência correspondente predita para o peptídeo NbPep, ortólogos de AtPep1.

```
>SGN-U514106    Nicotiana    benthamiana    #1    (2    members)
GGGCGCGCCTACTCAGAAGAGGCTGCAAATATTACAGAGAAACGAGAGAGA
GCTCGAGTAGATGAAGAGAGTAGCTTAACTAAAGTTTATGATATTTCCAAGAA
TCCAATTTTCTACTTCCAAGAAGCCATTAGAGCTATTCTCAACTGTCTTGGTTT
TGAATCTTCAAAACCTGAGTCATCTTCTTCTTCATCTTCTAGCATGTCAGATAA
TAAAGAAGAAGAGAATAATAAAGAAGAAGATGATCCTGAAGGGAAACAGGCT
TCAACAGATAATAACAACGATAACCCTAATACTCCATCAGCTGATGATCCACC
TCAAACCCAAGCACTTCTCACACCACCAGCTCCACCACCACCACCGGGCGG
GTCACCGGCACCCCCAGGTAACCACCAGATAGAAGCAGCAACAAGGAGGGG
AAGAACACCACCAAGACCTGGAGTTAGTAGAGGAAGTCCTCCTCAGAACAAT
TAATTTAATTAATTACATCTCCTCTAAAATCTATGACCCATTTTCATACTTTGG
CTAGGGTTTTATTCAAGTTTGTTATATATATATGAGATCAACTTTCAGGAGTAA
GTTTTGCTGGTATTTTATCTTGGTTTGACTTCCGTATTTTATGTTGGTTTAGGT
CCTTCAATTGTTTATACATATTGTAATTAAGATATAAGGATCTTAATATGTGCAA
GTTAATAGTAGTACTTAATCTACAAGTTTATTGTCG
```

APÊNDICE 2. Sequenciamento de *Nicotiana benthamiana* identificado como *NbPROPEP1*, amplificado de DNA e RNA. Em destaque verde, oligonucleotídeos iniciadores utilizados para inserção da sequência no vetor plasmidial pGEM; em cinza, possível íntron e sublinhado a sequência predita correspondente para o peptídeo NbPep.

>NbPROPEP1\_DNA

**TGGTTAACAAAGAGAGAGGGTCGAGGTGAG**GAAGAGAGTAGCTTAACTAAAGT  
 TTATGATATTTCCAAGAATCCAATTTTCTACTTACAAGAAGCCATTAGAGCTAT  
 CCTCAACTGTCTTGGTTTTGAATCTCCAAAACCAGAGTCGCCGTCTTCTTCTT  
 CTTCTTCAAGTATGTCAGACAAAAAAGAAGAAGAGAATATTAAGAAGATAGT  
 AGTGCACAAGAAGAAGGGAAACAGACTTCAACAGATAATAACAACGATAACC  
 CTAATACTCCATCAGTTGATCCACCTCAAACCCAAGCACTTGTAAGACTTCTTT  
 TTTCTTTACTTCATTGCGTAATCTATATCTCTCTCACACACACTGGAAGATGT  
 AGAGCGTACGTGTGTTTATTCGAACCCTAGCTTTGACTCGAACTTTGTATACG  
 TGTTAAAATAATTCAATAAATAAGGATAAATAATTGATTTTAACTCACTAAATT  
 AAATGAGTTGAAAATATGAATTTGAAGCCATAAAATTCAAATTGGATCCTCATC  
 TTAACACACATAGATATACATGTATGACACATACACATAAAGAAAGAATTAAT  
 AATTTAATTTTTCTAATCTAATATGATATGAGTACTAAGTGTTCTTGAACAGAG  
 ACTAAAAATATATATTAATTTGAGAGATCAAAGAATAACAAGGTAATTTAATCA  
 AATAAATATATAACATTCTCTAGTTATCTCATTTGTTTTATTTGGTGTAATTT  
 CATGCAGATAGAAGCAGCAACAAGGAGGGGAAGAACACCACCAAGACCTGG  
 AGTTAGCAGAGGAAGTC**CTCCTCAGAACAATTAATTACCTAGGAT**

>NbPROPEP1\_RNA

**TGGTTAACAAAGAGAGAGGGTCGAGGTGAG**GAAGAGAGTAGCTTAACTAAAGT  
 TTATGATATTTCCAAGAATCCAATTTTCTACTTACAAGAAGCCATTAGAGCTAT  
 CCCCAACTGTCTTGGTTTTGAATCTCCAAAACCAGAGTCGCCGTCTTCTTCTT  
 CTTCTTCAAGTATGTCAGACAAAAAAGAAGAAGAGAATATTAAGAAGATAGT  
 AGTGCACAAGAAGAAGGGAAACAGACTTCAACAGATAATAACAACGATAACC  
 CTAATACTCCATCAGTTGATCCACCTCAAACCCAAGCACTTATAGAAGCAGCA  
 ACAAGGAGGGGAAGAACACCACCAAGACCTGGAGTTAGCAGAGGAAGTCT  
**CCTCAGAACAATTAATTACCTAGGAT**

APÊNDICE 3. Sequenciamento de *Nicotiana benthamiana* identificado como *NbPROPEP2*, amplificado de DNA e RNA. Em destaque verde, oligonucleotídeos iniciadores utilizados para inserção da sequência no vetor plasmidial pGEM; em cinza, possível íntron e sublinhado a sequência predita correspondente para o peptídeo NbPep.

>*NbPROPEP2\_DNA*

**TGGTTAACCGAGAGAGAGCTCGAGTTGAT** GAAGAGAGTAGCTTAACTAAAGT  
 TTATGATATTTCCAAGAATCCAATTTTCTACTTCCAAGAAGCCATTAGAGCTAT  
 TCTCAACTGTCTTGGTTTTGAATCTTCAAAACCTGAGTCATCTTCTTCTTCATC  
 TTCTAGTATGTCAGATAATAAAGAAGAAGAGAATAATAAAGAAGAAGATGATC  
 CTGAAGGGAAACAGGCTTCAACAGATAATAACAACGATAACCCTAATACTCCA  
 TCAGCTGATGATCCACCTCAAACCCAAGCACTTGTAAGACTTTTTTCCTTAATC  
 GTCATGTGCTACTTTCAATCAGGCATGCATTTCTCTTCTTCTCTGTACGGCTCT  
 TTCCCCCTCTCTCTTCTCTCTCTCTCTCTAAGCTCACACCACCAGCTCCAC  
 CACCACCACCGGGCGGGTCACCGGCACCCCCAGGTAACCACCAGGTAAGTG  
 CCACTACCCCATCTTCTCCCCCTTACCCCACTGCCCGGAACACTGTTCCG  
 ACAGTGTTCGACATCCCTCGGGAGTTTCTTGGACTCACCTCCACACCATTG  
 TGACACACAGTGTCTGGCGCACATTTTCTGAAAATTTTCGTCGCCGGAACCA  
 CAGCACGCGCGCCCATTTGTAAGGGGTCTTCTACCATTGTAATACTTCTAA  
 CATTCTCCAAGTATCAATAAGAAGAAGACTCTCTCTACTCTTCTCTTATTGCTTT  
 TGTCTTGCATTATTGTTCTTGACTTTTATATTATTTTATAACAAGAAGTAAATT  
 GAACCGATGTATGTGGTTTTATTAAGAAAAAGCCCGCAAATTAATTAAGTCAT  
 GTCACTTGTTTTATTTTGGTGTAATTTTCGTGCAGATAGAAGCAGCAACAAGG  
 AGGGGAAGAACACCACCAAGACCTGGAGTTAGTAGAGGAAGTC**CTCCTCAG**  
**AACAATTAATTTACCTAGGAT**

>*NbPROPEP2\_RNA*

**TGGTTAACCGAGAGAGAGCTCGAGTTGAT** GAAGAGAGTAGCTTAACTAAAGT  
 TTATGATATTTCCAAGAATCCAATTTTCTACTTCCAAGAAGCCATTAGAGCTAT  
 TCTCAACTGTCTTGGTTTTGAATCTTCAAAACCTGAGTCATCTTCTTCTTCATC  
 TTCTAGTATGTCAGATAATAAAGAAGAAGAGAATAATAAAGAAGAAGATGATC  
 CTGAAGGGAAACAGGCTTCAACAGATAATAACAACGATAACCCTAATACTCCA  
 TCAGCTGATGATCCACCTCAAACCCAAGCACTTCTCACACCACCAGCTCCAC  
 CACCACCGCCGGGCGGGTCACCGGCACCCCCAGATAGAAGCAGCAACAAG  
 GAGGGGAAGAACACCACCAAGACCTGGAGTTAGTAGAGGAAGTC**CTCCTCA**  
**GAACAATTAATTTACCTAGGAT**

APÊNDICE 4. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor TRV2b com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em cinza claro está a sequência de oligonucleotídeos para amplificação do inserto e as regiões em cinza escuro indicam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI*, para clonagem no vetor TRV2b.

#### >TRV-NbPROPEP1

```
GTTGTAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATT
GGGCCCACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTGGTTAACA
GGGAAGAACACCACCAAGACCTGGAGTTAGTAGAGGAAGTCCTCCTCAGA
ACAGAATTCATAATCACTAGTGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGA
GCTCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATA
GCTTGGCGTAATTCATG
```

APÊNDICE 5. Expressão relativa dos genes *NbPROPEP1* (A) e *NbPROPEP2* (B) em diferentes tempos após infiltração do peptídeo sintético NbPep na concentração de 20nM. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (*NbEF-1α*). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador (valor 1), em escala logarítmica. Comparação estatística somente entre Controle e Peptídeo, onde colunas com letras diferentes diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

