

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

IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DURANTE A INTERAÇÃO
ENTRE *Petunia hybrida* e *Botrytis cinerea*

Sara Hartke
Bióloga/UNIVALI

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Hartke, Sara
IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DURANTE
A INTERAÇÃO ENTRE *Petunia hybrida* e *Botrytis cinerea*
/ Sara Hartke. -- 2016.
113 f.

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação
em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Fitopatologia. 2. Biologia Molecular. I.
Moraes, Marcelo Gravina de, orient. II. Título.

SARA HARTKE
Bacharel em Ciências Biológicas - UNIVALI
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM FITOTECNIA

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

Aprovado em: 29.02.2016
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 25.04.2017
Por

MARCELO GRAVINA DE MORAES
Orientador - PPG Fitotecnia

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

EDSON BERTOLINI
PPG Fitotecnia/UFRGS

LORETA BRANDÃO DE FREITAS
PPG Botânica/UFRGS

ELIANE ROMANATO SANTAREM
PUC/RS

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade
de Agronomia

DEDICO

Aos meus pais Antônio A. Hartke e Schirlei B. Hartke, que nunca mediram esforços para proporcionar a melhor educação para seus filhos. Só de pensar em vocês ganho forças para superar qualquer dificuldade.

Ao meu amor Pietro F. Biasuz, o presente mais precioso que a vida poderia me dar. Vocês me fazem querer melhorar a cada dia.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

Ao Pietro, aos meus pais e meus irmãos Tina e Jordan por vibrarem mais do que eu a cada conquista e pelo apoio em todos os momentos em que me faltaram forças, vocês me fizeram levantar mais vezes do que possam imaginar.

Ao professor e orientador Marcelo Gravina de Moraes pela oportunidade e por dividir com paciência e generosidade o seu conhecimento e experiência.

Às famílias Facchini e Biasuz por ouvirem minhas aflições, pelo incentivo, pela compreensão nos momentos de minha ausência, pelas marmitas nos períodos de greve do RU e por serem pessoas tão amorosas.

À família dos meus tios Raul e Heloisa. Ainda estão por nascer pessoas mais prestativas do que vocês. Sempre me confortou saber que tenho pessoas tão boas por perto.

Aos professores André Lima e Marcos Pessatti pela ajuda e incentivo.

Aos antigos e atuais colegas do LFM, Johannes, Leonardo, Guilherme, Gustavão, Aline, Monique. Em especial à Ana, à Julie e à Fernanda. Obrigada pelas discussões científicas, pelas terapias coletivas e por serem amigas tão especiais.

Aos técnicos do Departamento de Fitossanidade, Priscila, Fernando, Helana e Fernanda por toda ajuda necessária na execução dos trabalhos. Em

especial à Priscila por ser tão prestativa e pela ajuda indispensável em todos os momentos.

Aos técnicos do Departamento de Plantas de Lavoura, Fábio e Gustavo, pela troca de informações, pelo empréstimo de materiais e equipamentos e por toda ajuda.

Aos antigos e atuais colegas da pós-graduação, Tiago, Geísa, Marciele Barbieri, Andriele, Camila Nicolli, Nicole, Liliana, Carol Wesp, Nageli, Ismail, Bruna, Marciéli Bovolini e Gerarda, pelas discussões científicas e não científicas. Muito obrigada pela ajuda de cada um de vocês.

Aos membros do Núcleo de Assessoria Estatística da UFRGS pela excelente ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores da UFRGS pelas respostas a muitas perguntas e pelo empréstimo de materiais e equipamentos.

À nossa querida Cris, que cuida da nossa segurança durante o dia.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Marisa Carvalho Bello, que opera milagres para atender a todos os alunos e professores.

À CAPES pela bolsa de estudos.

As amigas que carrego no coração, Camila Morelli, Fran, Andrea, Jana, Ananda, Aline, Bia e Lauraceae, por me ouvirem com muita paciência, pelas lindas lembranças que carrego comigo e por torcerem por mim.

IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DURANTE A INTERAÇÃO ENTRE *Petunia hybrida* e *Botrytis cinerea*¹

Autor: Sara Hartke

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

As solanáceas são particularmente afetadas por *Botrytis cinerea*, incluindo a espécie ornamental *Petunia hybrida* (petúnia). A infecção de flores por *B. cinerea* representa uma importante fase do ciclo de vida desse patógeno em inúmeras interações. Por essa razão, mecanismos de defesa que atuam em flores têm o importante papel de restringir a dispersão de *B. cinerea* para outros tecidos saudáveis dos hospedeiros. Diante disso, o presente trabalho objetivou prospectar mecanismos de resistência de petúnia à *B. cinerea* e caracterizar a função e expressão de genes em flores durante a interação petúnia-*B. cinerea*. Para tanto, cultivares comerciais de petúnia foram avaliadas quanto à resistência à *B. cinerea*. Flores da cultivar Picobella White apresentaram menor nível de colonização por *B. cinerea* em comparação com flores da cultivar Picobella Rose. No intuito de investigar as respostas de defesa que atuam em flores de Picobella White e que podem não ocorrer ou ocorrer com menor eficiência em flores de Picobella Rose, as flores dessas cultivares foram empregadas na análise de expressão de genes potencialmente envolvidos na resistência ou que atuem como potenciais alvos de manipulação por *B. cinerea*. Adicionalmente, as flores das duas cultivares foram submetidas a análises histopatológicas. Os genes codificantes das defensinas florais *PhDEF1* e *PhDEF2* foram expressos em menor nível nas flores de Picobella White em comparação com as flores de Picobella Rose, ambas desafiadas com *B. cinerea*. Portanto, os referidos genes foram submetidos à caracterização funcional por meio do silenciamento. Apesar de serem consideradas defensinas, a literatura relata que *PhDEF1* e *PhDEF2* são altamente fitotóxicas quando liberadas do vacúolo, sendo que essa liberação provavelmente ocorre em células danificadas por *B. cinerea*. O silenciamento de *PhDEF1* ou *PhDEF2* reduziu o nível de colonização das flores por *B. cinerea*. Sendo assim, os resultados sugerem que, em interação com *B. cinerea*, a ação fitotóxica das duas defensinas beneficia a colonização por *B. cinerea*, tendo em vista que a morte de células do hospedeiro é requerida para o desenvolvimento da doença. Logo, é possível que os menores níveis de expressão de *PhDEF1* e *PhDEF2* verificados nas flores de Picobella White justifiquem as diferenças observadas entre as cultivares quanto ao nível de colonização por *B. cinerea*. Além disso, compostos fenólicos autofluorescentes foram detectados na parede de células da epiderme de flores de Picobella White a partir de 12 horas após a inoculação com *B. cinerea* (hpi). Em flores de Picobella Rose, apenas uma fraca fluorescência foi detectada em 48 hpi. Em conjunto, os resultados parecem demonstrar que Picobella White ativa mecanismos de defesa capazes de limitar a proliferação de *B. cinerea* em suas pétalas.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (113p.) Fevereiro, 2016.

IDENTIFICATION OF RESISTANCE MECHANISMS IN *Petunia hybrida*-*Botrytis cinerea* INTERACTION¹

Author: Sara Hartke

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Solanaceae species are particularly affected by *Botrytis cinerea*, including the ornamental plant specie *Petunia hybrida* (petunia). Flowers infection by *B. cinerea* is a major phase of the life cycle of this pathogen in several interactions. For this reason, defense mechanisms that act in flowers have an important role in restricting *B. cinerea* spread to other host healthy tissues. Therefore, the aim of this study was prospecting petunia resistance mechanisms against *B. cinerea* and to characterize the function and expression of genes in flowers during petunia-*B. cinerea* interaction. To this end, a screening procedure for *B. cinerea* resistance was developed in petunia commercial cultivars. Flowers of Picobella White showed a lower level of colonization by *B. cinerea* when compared to flowers of Picobella Rose. In order to investigate the defense responses that were activated in flowers of Picobella White and may not occur or occur in a less efficient manner in flowers of Picobella Rose, the flowers of these cultivars were used for gene expression analysis of genes potentially involved in resistance or acting as potential targets for *B. cinerea* manipulation. In addition, the flowers of both cultivars were subjected to histopathological analysis. The genes *PhDEF1* and *PhDEF2*, which encode floral defensins, were expressed at lower levels in flowers of Picobella White compared to flowers of Picobella Rose, both challenged with *B. cinerea*. Therefore, these genes were subjected to functional characterization by means of silencing. Despite being considered defensins, the literature reports that *PhDEF1* and *PhDEF2* are highly phytotoxic when released from the vacuole, and this release is likely to occur in cells damaged by *B. cinerea*. The silencing of *PhDEF1* or *PhDEF2* decreased the level of colonization of flowers by *B. cinerea*. Thus, these results suggest that, in interaction with *B. cinerea*, the phytotoxic effect of defensins benefits colonization by *B. cinerea*, given that the host cell death is required for disease development. Therefore, it is possible that the lower levels of *PhDEF1* and *PhDEF2* expression observed in flowers of Picobella White explain the differences among cultivars regarding the level of colonization by *B. cinerea*. Moreover, fluorescent phenolic compounds were detected in the epidermis cell wall of flowers of Picobella White from 12 hours post inoculation with *B. cinerea* (hpi). In flowers of Picobella Rose only a weak fluorescence was detected at 48 hpi. Together, the results seem to show that Picobella White active defense mechanisms that may limit *B. cinerea* proliferation in its petals.

¹ Doctoral thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (113p.) February, 2016.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 <i>Botrytis cinerea</i>	4
2.2 Interação entre plantas e patógenos necrotróficos.....	6
2.2.1 Resposta hormonal.....	10
2.2.2 Mecanismos de defesa em órgãos florais.....	12
2.3 Interação entre plantas e <i>B. cinerea</i>	14
2.3.1 Resistência de plantas à <i>B. cinerea</i>	16
2.4 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS).....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Material vegetal.....	22
3.2 Isolamento e inoculação com <i>B. cinerea</i>	22
3.3 Avaliação da doença.....	25
3.3.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	26
3.3.2 Quantificação da biomassa de <i>B. cinerea</i> por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	27
3.4 Análise de expressão de genes de petúnia durante a interação com <i>B. cinerea</i> e durante a senescência induzida por polinização.....	28
3.5 Microscopia de pétalas de petúnia inoculadas com <i>B. cinerea</i>	29
3.6 Silenciamento dos genes <i>PhCHSj</i> , <i>PhPDS</i> , <i>PhDEF1</i> e <i>PhDEF2</i>	31
3.6.1 Clonagem dos genes <i>PhCHSj</i> , <i>PhPDS</i> , <i>PhDEF1</i> e <i>PhDEF2</i> no pGEM-T.....	32
3.6.2 Extração de plasmídeos recombinantes.....	34
3.6.3 Sub-clonagem dos genes <i>PhCHSj</i> , <i>PhPDS</i> , <i>PhDEF1</i> e <i>PhDEF2</i> no vetor de silenciamento.....	35
3.6.4 Infiltração com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contendo os vetores virais.....	38
3.6.5 Confirmação do silenciamento por qRT-PCR.....	40
3.6.6 Avaliação da doença nas plantas contendo as defensinas florais silenciadas.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Isolamento de <i>B. cinerea</i> de flores de petúnia.....	43

4.2	Comparação entre cultivares de petúnia quanto a resistência à <i>B. cinerea</i>	44
4.3	Perfil de expressão de genes candidatos durante a interação entre petúnia e <i>B. cinerea</i> e durante a senescência induzida por polinização.....	50
4.4	Visualização de respostas de defesa em pétalas durante a interação entre petúnia e <i>B. cinerea</i>	59
4.5	Silenciamento dos genes <i>PhCHSj</i> , <i>PhPDS</i> , <i>PhDEF1</i> e <i>PhDEF2</i>	68
4.5.1	Caracterização funcional das defensinas florais de petúnia (<i>PhDEF1</i> e <i>PhDEF2</i>).....	73
5.	CONCLUSÕES.....	85
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
7.	APÊNDICES.....	98

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR e nas clonagens no vetor TRV.....	31

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Obtenção do isolado de <i>B. cinerea</i> a partir de flores de petúnia com sintomas de mofo cinzento.....	43
2. Desafio de flores das cultivares Picobella Rose e Picobella White com esporos de <i>B. cinerea</i> (1×10^6 esporos mL ⁻¹ de água).....	45
3. Quantificação do acúmulo de mRNA de <i>BcActin</i> por qRT-PCR nas flores de petúnia inoculadas com <i>B. cinerea</i> (24 e 48 hpi).....	46
4. Quantificação dos esporos formados em flores e botões inoculados com <i>B. cinerea</i>	49
5. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos amplificados por qRT-PCR a partir do cDNA de pétalas de petúnia.....	52
6. Expressão relativa dos genes <i>PhACO1</i> , <i>PhEIL1</i> , <i>PhATG8a</i> , <i>PhDEF1</i> e <i>PhDEF2</i> em pétalas de flores das cultivares Picobella White e Picobella Rose desafiadas com <i>B. cinerea</i> (48 hpi).....	54
7. Avaliação da expressão gênica em pétalas de flores de Picobella Rose e Picobella White polinizadas.....	58
8. Microscopia óptica de pétalas de Picobella Rose (A) e Picobella White (B) inoculadas com 7 µL de uma solução de esporos de <i>B. cinerea</i>	60
9. Microscopia óptica de epifluorescência da epiderme adaxial de pétalas de Picobella Rose tratadas com ácido pícrico após a inoculação com <i>B. cinerea</i>	64
10. Microscopia óptica de epifluorescência da epiderme adaxial de pétalas de Picobella White tratadas com ácido pícrico após a inoculação com <i>B. cinerea</i>	65
11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR das colônias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas com os plasmídeos TRV2b- <i>GFP</i> (1-3), TRV2b- <i>PhPDS</i> (4-6), TRV2b- <i>PhCHSj</i> (7-9), TRV2b- <i>PhDEF1</i> (10-12) e TRV2b- <i>PhDEF2</i> (13-15).....	69

12. Fenótipos de silenciamento aos 19 dpa.....	70
13. Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA dos genes <i>PhCHSj</i> e <i>PhPDS</i> aos 19 dpa.....	71
14. Fenótipos de silenciamento do gene <i>PhCHSj</i> aos 30 dpa.....	73
15. Inoculação de <i>B. cinerea</i> em flores destacadas de plantas agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b- <i>PhDEF1</i> , pTRV1+pTRV2b- <i>PhDEF2</i> (inóculos de silenciamento) ou pTRV1+pTRV2b- <i>GFP</i> (inóculo controle).....	75
16. Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA de <i>BcActin</i> nas flores não silenciadas de Picobella Rose e Picobella White (pTRV1+pTRV2b- <i>GFP</i>), nas fores silenciadas de Picobella Rose (pTRV1+pTRV2b- <i>PhDEF2</i>) e nas fores silenciadas de Picobella White (pTRV1+pTRV2b- <i>PhDEF1</i>) inoculadas com <i>B. cinerea</i> (24 hpi).	76

RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Comparações (<i>blastn</i>) entre sequências do banco de dados do NCBI e os resultados do sequenciamento das regiões ITS1 (A) e ITS2 (B) do rDNA e da região <i>NEP2</i> (C) do DNA do isolado obtido a partir de flores de petúnia com sintomas de mofo cinzento. Essas comparações entre sequências de DNA confirmaram a espécie do isolado como <i>B. cinerea</i>	97
2. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor pTRV2b- <i>PhDEF1</i> com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em destaque está a sequência de nucleotídeos do <i>PhDEF1</i> e as regiões grifadas em cinza indicam os sítios das enzimas <i>HpaI</i> e <i>EcoRI</i>	98
3. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor pTRV2b- <i>PhDEF2</i> com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em destaque está a sequência de nucleotídeos do <i>PhDEF2</i> e as regiões grifadas em cinza indicam os sítios das enzimas <i>HpaI</i> e <i>EcoRI</i>	99

1 INTRODUÇÃO

As doenças de plantas constituem um dos principais entraves para a produção de plantas de interesse econômico. Dessa forma, o entendimento das interações planta-patógeno e a aplicação desse conhecimento na obtenção de plantas resistentes se tornam indispensáveis para uma agricultura sustentável.

As plantas possuem sistemas de defesa altamente sofisticados contra patógenos, sendo capazes de reconhecer moléculas e sinais provenientes de suas células afetadas e ativar uma efetiva resposta imune contra o patógeno reconhecido. No entanto, alguns patógenos podem superar essas respostas de defesa, desencadeando a doença. Durante a interação entre plantas e patógenos necrotróficos a morte de células do hospedeiro precede ou acompanha a colonização pelo patógeno. Comumente, compostos fitotóxicos e enzimas degradadoras de parede celular são empregadas para causar a necrose do tecido hospedeiro, ocasionando a liberação dos nutrientes. A falta de especificidade desses compostos fitotóxicos dificultam a obtenção de plantas resistentes a necrotróficos que possuem uma ampla gama de hospedeiros.

B. cinerea foi recentemente considerado o mais importante fungo necrotrófico causador de doença em plantas, tendo em vista sua capacidade de infectar mais de 200 espécies e seu impacto econômico na agricultura (despesas globais de controle de *B. cinerea* ultrapassam R\$ 3 bilhões por ano). Essas

características contribuíram para a utilização de *B. cinerea* como modelo em estudos com necrotróficos que possuem uma ampla gama de hospedeiros. Muitos cultivos utilizados na alimentação humana são afetados por *B. cinerea* tanto em pré quanto em pós-colheita. Dentre as solanáceas hospedeiras de *B. cinerea* podem ser citadas as espécies tomate, batata, berinjela e pimentão. Além de afetar a produtividade dos cultivos alimentícios e a qualidade de seus produtos, *B. cinerea* também é causador de uma das doenças mais comuns e destrutivas em plantas ornamentais cultivadas em casa de vegetação, incluindo a solanácea *Petunia x hybrida* (Hook.) Vilm.

A petúnia é uma planta ornamental de grande importância econômica na horticultura de todo o mundo. Além disso, ao longo das últimas duas décadas, a petúnia também serviu como um excelente modelo para elucidar as bases genéticas de vários processos de plantas, principalmente de solanáceas. Condições de crescimento fácil, ciclo de vida relativamente curto (aproximadamente três meses), propagação assexuada fácil, um grande número de genes bem caracterizados, disponibilidade de grandes bancos de mutantes, flores grandes que facilitam estudos nesse órgão e um grande número de ferramentas moleculares bem definidas para estudos nesse gênero contribuíram com a utilização de petúnia como um sistema modelo.

A infecção de flores em senescência por esporos de *B. cinerea* representa uma importante fase do ciclo de vida desse patógeno, tendo em vista que a colonização desse tecido debilitado contribui com inóculo para infecções secundárias de outros tecidos intactos, incluindo folhas, ramos e frutos. Sendo assim, a elucidação de mecanismos de resistência à *B. cinerea* que atuam em flores pode ter importante papel no estabelecimento de métodos de controle do

mofo cinzento. A ativação de respostas de resistência contra patógenos demanda um alto custo energético, além de comumente envolver vias hormonais que sinalizam outros processos metabólicos na planta. Por essa razão, a ferramenta molecular que foi estabelecida para a caracterização *in vivo* do papel de genes de petúnia durante a interação com *B. cinerea* consistiu na modificação da expressão gênica de forma transiente. Desse modo, podem ser evitadas interferências em outros processos da planta, uma vez que o momento da modificação da expressão pode ser controlado. Diante da carência de conhecimento sobre as repostas de defesa a patógenos que atuam em flores, o presente trabalho teve como objetivo geral prospectar, em flores, mecanismos de resistência de petúnia à *B. cinerea* e caracterizar a função e expressão de genes em flores durante a interação entre petúnia e *B. cinerea*. Os objetivos específicos estão descritos a seguir:

- 1 – Avaliar cultivares comerciais de petúnia quanto à resistência à *B. cinerea*, sendo a avaliação da doença procedida em flores;
- 2 – Realizar análises histopatológicas no intuito de identificar possíveis respostas de defesa de petúnia à *B. cinerea*.
- 3 - Selecionar genes potencialmente envolvidos na resistência de petúnia à *B. cinerea* ou genes que atuem como possíveis alvos de modulações exercidas pelo patógeno como estratégia de patogênese;
- 4 – Otimizar o método de silenciamento gênico induzido por vírus em petúnia para o estudo do efeito do silenciamento em flores;
- 5 – Silenciar os genes selecionados a fim de caracterizar suas funções em flores durante a interação entre petúnia e *B. cinerea*;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Botrytis cinerea*

B. cinerea é um fungo necrotrófico causador da doença mofo cinzento, também conhecida por podridão cinzenta, em mais de 200 espécies vegetais. Os órgãos afetados pelo mofo cinzento incluem frutos, flores, ramos, folhas e também órgãos de reserva, como tubérculos (Cantu *et al.*, 2009; B. Li *et al.*, 2012). Apesar de ser mais comum em cultivos em casa de vegetação, a doença também pode alcançar níveis consideráveis em campo aberto e em câmaras de armazenamento (pós-colheita). *Botryotinia fuckeliana* é a fase teleomórfica de *B. cinerea* que pertence ao filo Ascomycota. Contudo, não existem relatos da ocorrência da fase teleomórfica no Brasil (Töfoli *et al.*, 2011). Solanaceae é uma das famílias de maior importância econômica a nível mundial, nessa família estão contidos inúmeros hospedeiros de *B. cinerea*, tais como o tomate, pimentão, berinjela e também petúnia, uma solanácea ornamental (Smith *et al.*, 2014; Dean *et al.*, 2012; Töfoli *et al.*, 2011; El Oirdi *et al.*, 2011; van Kan, 2005). A disponibilidade da sequência do genoma de *B. cinerea*, uma variedade de ferramentas moleculares para caracterizar a função de seus genes, juntamente com a sua relevância econômica, contribuíram para o desenvolvimento de um grande número de estudos com *B. cinerea*. Esses estudos tiveram papel fundamental na elucidação de estratégias de infecção de *B. cinerea* (Dean *et al.*, 2012; Amselem *et al.*, 2011).

O ciclo da doença causada por *B. cinerea* pode ser dividido nos seguintes estádios: aderência e germinação do conídio na superfície do tecido hospedeiro sob condições de elevada umidade (aproximadamente 80%); desenvolvimento do apressório que penetra a superfície do hospedeiro; indução da morte de células hospedeiras e estabelecimento de uma lesão primária, podendo ocorrer necrose e o desencadeamento de respostas de defesa do hospedeiro; expansão da lesão e esporulação do patógeno para a produção de inóculo para infecções secundárias (van Kan, 2006). Os conídios de *B. cinerea* são considerados a principal forma de dispersão de inóculo (Holz *et al.*, 2007). Esse patógeno pode sobreviver por períodos prolongados em restos culturais através da formação de escleródios (Williamson *et al.*, 2007).

A penetração de superfícies hospedeiras intactas por *B. cinerea* ocorre através da secreção de enzimas extracelulares que degradam cutina e parede celular e não por meio de pressão física (Amselem *et al.*, 2011; Choquer *et al.*, 2007; Staples & Mayer, 1995). Além disso, *B. cinerea* também é capaz de iniciar a infecção do tecido do hospedeiro por meio de estômatos abertos, em locais contendo ferimentos ou em regiões infectadas por outros patógenos (van Kan, 2006). A análise do genoma de *B. cinerea* resultou na identificação de 118 genes relacionados com a degradação de parede celular vegetal (Amselem *et al.*, 2011). As enzimas sintetizadas por *B. cinerea*, requeridas para a penetração no hospedeiro, degradação da parede celular e lise celular, incluem cutinases, lipases, pectinases, celulases, xilanases e proteases (van Kan, 2006; Choquer *et al.*, 2007; B. Li *et al.*, 2012).

2.2 Interação entre plantas e patógenos necrotróficos

Diferentemente dos patógenos biotróficos, os quais dependem de células hospedeiras vivas para sua nutrição, os patógenos necrotróficos extraem os nutrientes necessários para seu crescimento e reprodução a partir de células hospedeiras que foram mortas previamente à colonização ou durante esse processo (Wang *et al.*, 2014). Para tanto, compostos fitotóxicos e enzimas degradadoras de parede celular são sintetizados pelo patógeno para induzir a necrose das células hospedeiras, tornando, assim, os nutrientes disponíveis para o patógeno. Os necrotróficos são subdivididos em necrotróficos com especificidade de hospedeiro (HOST-SPECIFIC NECROTROPHS – HSNs) e necrotróficos com ampla gama de hospedeiro (BROAD HOST-RANGE NECROTROPHS – BHNs) (Mengiste, 2012). Os HSNs produzem toxinas específicas ao hospedeiro, as quais são essenciais para a patogenicidade e virulência. Como exemplo pode ser citado o patógeno de trigo *Pyrenophora tritici-repentis*, produtor da toxina PtrToxA (Wang *et al.*, 2014). Essa toxina induz necrose em cultivares de trigo portadoras do alelo dominante *Tsn1*. O fenômeno descrito nesse exemplo é denominado suscetibilidade desencadeada por efetor, tendo em vista que a interação PtrToxA-Tsn1 resulta em necrose, beneficiando o necrotrófico *P. tritici-repentis* (Liu *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2012). A imunidade de plantas a HSNs pode ser conferida por genes dominantes individuais codificantes de proteínas que neutralizam a ação de toxinas do patógeno, por genes que contribuem com a tolerância aos danos causados pela toxina ou por alelos cujos produtos são insensíveis à toxina específica ao hospedeiro (Lai & Mengiste, 2013). Esse último mecanismo de resistência pode ser exemplificado por cultivares de trigo que apresentam maior resistência à PtrToxA por

possuírem somente o alelo recessivo *tsn1* (Tan *et al.*, 2012). Já os fungos *B. cinerea*, *Alternaria brassicicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* e a bactéria *Erwinia carotovora* são exemplos de BHNs (Mengiste, 2012). Os BHNs também produzem toxinas durante a interação com seus hospedeiros, contudo, essas toxinas não apresentam especificidade por hospedeiro. Apesar de os HSNs e os BHNs apresentarem o mesmo modo de nutrição, suas estratégias de patogênese são bastante diferentes, refletindo em variações nas estratégias de resistência dos seus respectivos hospedeiros (Laluk & Mengiste, 2010). Por essa razão, a partir desse ponto, a revisão será direcionada aos estudos de interação planta-patógeno que foram conduzidos com BHNs.

Para desencadear um processo de defesa a planta deve reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Windarm *et al.*, 2012; Chisholm *et al.*, 2006; Hückelhoven, 2007). Moléculas derivadas da parede celular de fungos e bactérias, tais como peptídeoglicanos, lipopolissacarídeos e fragmentos de quitina são exemplos típicos de PAMPs (Lai & Mengiste, 2013; Boller & He, 2009). Já os DAMPs são moléculas derivadas dos hospedeiros, as quais são liberadas a partir de ferimentos ou por meio da ação de enzimas hidrolíticas utilizadas pelos necrotróficos para ultrapassar as barreiras físicas impostas pela célula vegetal. Os DAMPs podem ser representados por peptídeos, oligogalacturonídeos e monômeros de cutina. Os PAMPs e DAMPs são reconhecidos pela planta mediante a interação com seus respectivos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Lai & Mengiste, 2013). A detecção do patógeno ativa mecanismos de resistência basal, também denominada imunidade desencadeada por PAMPs/DAMPs (PTI), e é a primeira linha de

defesa que os patógenos enfrentam para colonização dos tecidos das plantas (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2008). Os patógenos podem ainda utilizar moléculas efetoras para superar esta primeira linha de defesa. Os efetores podem impedir a detecção de seus PAMPs pelo hospedeiro ou suprimir a sinalização da PTI. Em contrapartida, as plantas desenvolveram uma segunda linha de defesa, na qual proteínas de resistência (R) são capazes de detectar de maneira direta ou indireta efetores específicos, o que resulta na imunidade desencadeada por efetores (ETI) (de León & Montesano, 2013). As respostas ativadas durante a PTI ou ETI podem apresentar sobreposição, o que sugere que a PTI e a ETI sejam mediadas por uma rede de sinalização integrada (Thomma *et al.*, 2011; Tsuda & Katagiri, 2010). Apesar disso, as respostas são ativadas de maneira mais rápida e amplificada durante a ETI em comparação com a PTI (de León & Montesano, 2013; Jones & Dangl, 2006). Entretanto, com exceção do gene de resistência de *Arabidopsis thaliana* *RESISTANCE TO LEPTOSPHAERIA MACULANS 3 (RLM3)*, que codifica uma proteína R com domínio Toll/interleucina-1 e atua na resistência a vários necrotróficos (Staal *et al.*, 2008), nenhum outro gene R foi relacionado com a resistência a necrotróficos. Na interação entre *A. thaliana* e o fungo hemibiotrófico *Leptosphaeria maculans*, o gene *RLM3* é requerido para uma eficiente deposição de calose (Staal *et al.*, 2008). Diante disso, nota-se que, em geral, a ETI não é responsável pela resistência de plantas a necrotróficos. A resistência a BHNs é quantitativa, sendo que a PTI representa uma resistência quantitativa independentemente do estilo de vida do patógeno (Mengiste, 2012). As respostas de defesa que ocorrem durante a PTI ou ETI dependem da ativação de múltiplas rotas de sinalização e da transcrição de genes específicos

envolvidos na limitação da proliferação do patógeno reconhecido, conseqüentemente limitando a evolução da doença (Stotz *et al.*, 2014; Gimenez-Ibanez & Solano, 2013). Comumente, a ativação da PTI mediante o reconhecimento de um BHN promoverá a indução da síntese de compostos antimicrobianos, como exemplo as fitoalexinas; acúmulo de espécies reativas de oxigênio; ativação de vias de sinalização hormonal, como exemplo as vias do ácido jasmônico (JA) e etileno (ET); modificações de parede celular (de León & Montesano, 2013; Lai & Mengiste, 2013; Pieterse *et al.*, 2012).

As células vegetais impõem diversas barreiras contra a infecção por patógenos, podendo ser barreiras físicas e químicas, constitutivas ou induzíveis. A cutícula e a parede celular vegetal são exemplos de barreiras que também atuam como fontes de DAMPs, os quais podem ativar a PTI (Lai & Mengiste, 2013). A composição das paredes celulares e a modificação dos seus constituintes podem determinar a compatibilidade (hospedeiro suscetível) ou incompatibilidade (hospedeiro resistente) de uma dada interação planta-patógeno (Mengiste, 2012). Reforços de parede celular do hospedeiro envolvem o acúmulo de compostos fenólicos, espécies reativas de oxigênio e deposição de calose nos sítios de tentativa de penetração pelo patógeno. Essas modificações podem ser induzidas como uma resposta de defesa a patógenos necrotróficos, tendo em vista que irão tornar as paredes celulares menos vulneráveis à ação das enzimas degradadoras de parede celular (León & Montesano, 2013).

2.2.1 Resposta hormonal

De modo geral, a resistência a biotróficos e hemibiotróficos requer a ativação da via do ácido salicílico (SA), enquanto que as vias do JA e do ET têm importante papel na resistência a necrotróficos (Derksen *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015). Quando as vias de sinalização do JA e ET são ativadas durante ou após o estabelecimento das respostas mediadas por SA, o SA exerce uma forte supressão sobre a expressão de genes responsivos ao JA. Contudo, quando as vias do JA e ET são induzidas previamente à indução da via do SA, o efeito antagônico do SA sobre a via do JA é completamente anulado (Pieterse *et al.*, 2012). Apesar de muitos estudos demonstrarem uma interação antagônica entre as vias do SA e do JA, interações sinérgicas ou neutras também já foram verificadas (Pieterse *et al.*, 2012; Tsuda *et al.*, 2009). O tipo de interação entre as vias hormonais é determinado por uma regulação espacial e temporal, e depende também da concentração de cada hormônio na planta (Spoel & Dong, 2008). Tanto a ativação de determinadas vias hormonais quanto a interação entre essas vias têm papel fundamental na regulação das respostas de defesa de plantas contra o patógeno reconhecido (Huang *et al.*, 2015).

Estudos sobre o papel dos hormônios vegetais em interações entre plantas e patógenos frequentemente utilizam *A. thaliana* como modelo, tendo em vista a disponibilidade de coleções de mutantes defectivos em um ou mais genes envolvidos nas vias de sinalização desses hormônios (Huang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2011; Derksen *et al.*, 2013). Em *A. thaliana*, foram descritos dois ramos principais pertencentes à via de sinalização do JA, um desses denominado ramo ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTOR), cuja ativação depende tanto da sinalização mediada por JA quanto da sinalização mediada por ET, e o outro

denominado ramo MYC, o qual depende da sinalização mediada por ácido abscísico para sua ativação. O ramo MYC é comumente associado com a resposta de defesa a insetos herbívoros e com a resposta a ferimentos (Kazan & Manners, 2012; Lorenzo *et al.*, 2004), enquanto que o ramo ERF é, em geral, associado com a resistência a patógenos necrotróficos (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003). Por essa razão, serão detalhados somente os genes que atuam no ramo ERF da via de sinalização do JA. O reconhecimento de PAMPs/DAMPs relacionados a patógenos necrotróficos poderá desencadear a liberação de ácido α -linolênico a partir de membranas celulares do hospedeiro, dando início à síntese de JA (Pieterse *et al.*, 2012). O JA pode ser então conjugado com aminoácidos, como L-isoileucina, originando o composto jasmonil-isoileucina (JA-Ile), a principal forma biologicamente ativa derivada do JA (Gfeller *et al.*, 2010). Uma vez acumulado nas células do hospedeiro, o JA-Ile irá induzir a degradação de proteínas que têm o papel de reprimir a atividade dos fatores de transcrição codificados pelos genes homólogos *ETHYLENE INSENSITIVE3 (EIN3)* e *EIN3-LIKE1 (EIL1)*. A inibição da atividade de EIN3 e EIL1 é de extrema importância em células não desafiadas por patógenos necrotróficos, tendo em vista que essa inibição garante que inúmeras respostas de defesa com alto custo energético não sejam ativadas constitutivamente na planta (Zhu *et al.*, 2011; Pieterse *et al.*, 2012). Já a síntese de ET envolve as seguintes etapas: (1) a conversão de S-adenosilmetionina (SAM), que consiste em um precursor metabólico comum, em 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela ação da enzima ACC sintase (ACS) e (2) a conversão de ACC em ET pela ação da ACC oxidase (ACO) (G. Li *et al.*, 2012). A ação da ACO representa um excelente indicador da produção de ET, a qual é induzida em

inúmeras interações entre plantas e patógenos necrotróficos (Wang *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2012). Na ausência de ET, EIN3 e EIL1 sofrem proteólise, enquanto a presença do ET promove a estabilização de EIN3 e EIL1, ressaltando o requerimento do ET na ativação do ramo ERF da via de sinalização do JA (An *et al.*, 2010). Sendo assim, nas células infectadas por patógenos necrotróficos, o acúmulo de JA-Ile e ET irá permitir que EIN3 e EIL1 induzam a expressão de novos fatores de transcrição, como ERF1 e OCTADECANOIC-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59 (ORA59). Em sequência, ERF1 e ORA59, irão induzir a expressão de outros genes, como o gene *PLANT DEFENSIN1.2* (*PDF1.2*), o qual é utilizado como um marcador típico da ativação de respostas de defesa dependentes de JA/ET e tem importante papel na resistência de plantas a necrotróficos (Huang *et al.*, 2015). A defensina PDF1.2 é considerada uma proteína relacionada à patogênese (PR), outros exemplos de genes PR responsivos à via de sinalização do JA/ET compreendem os genes codificantes da PR3 e PR4, ambas quitinases capazes de degradar a parede celular de fungos, inibindo o crescimento de patógenos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Spoel & Dong, 2012; Gu *et al.*, 2002).

2.2.2 Mecanismos de defesa em órgãos florais

Um dos principais problemas enfrentados pelo mercado de flores consiste na abscisão de botões e flores durante a manipulação de pós-colheita. A infecção de flores por *B. cinerea* representa uma das causas da queda precoce de flores, tendo em vista que, em muitas culturas, esse patógeno elicit a produção endógena de ET, resultando na abscisão de flores durante o transporte e armazenamento (Dinh *et al.*, 2011; Darras *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2015; Tomas

et al., 1995; Sharon *et al.*, 2007). Em petúnia, a senescência floral e a consequente abscisão das pétalas podem ser aceleradas pela aplicação exógena de ET ou através da polinização, esses processos irão induzir a síntese de ET de maneira autocatalítica (Shibuya *et al.*, 2004), o que significa que o acúmulo de ET acima de um determinado limiar irá induzir a síntese de mais ET (Durner, 2013). O estudo de Wang *et al.* (2013) demonstrou que *B. cinerea* também atua como um elicitador da via do ET em folhas de petúnia, sendo verificado um aumento da expressão do gene *PhACO*, responsável pela síntese de ET. Em muitas culturas, o desenvolvimento da doença em flores também pode prejudicar a produção de frutos, tendo em vista que a colonização de órgãos florais por *B. cinerea* comumente representa a principal via de infecção para os frutos. Além disso, as flores colonizadas por *B. cinerea* contribuem com inóculo para infecções secundárias de outros tecidos saudáveis (Dinh *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 2007). Diante disso, nota-se que os mecanismos de defesa que atuam em flores têm o importante papel de restringir a dispersão de *B. cinerea* para o restante da planta.

O patógeno *Colletotrichum acutatum* é o agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. A infecção do hospedeiro ocorre a partir das flores, e apesar de *C. acutatum* ser hemibiotrófico, a colonização das pétalas por esse patógeno é totalmente necrotrófica. Nessa interação, tanto as pétalas quanto a superfície dos estigmas podem apresentar lesões necróticas. Entretanto, no estudo de Marques *et al.* (2013), não foram detectados sinais de penetração por *C. acutatum* nas células da epiderme do estigma. A resistência dos estigmas de citros à penetração e colonização por *C. acutatum* foi atribuída à indução da formação de uma camada protetiva lipofílica, rica em compostos fenólicos,

abaixo da área necrótica. O papel do acúmulo de compostos fenólicos em flores na resistência a necrotróficos também foi demonstrado em inflorescências de girassol. No estudo de Prats *et al.* (2003), o genótipo altamente suscetível à *S. sclerotiorum* apresentou necrose severa nos ovários, corolas, brácteas e no receptáculo. Já a variedade resistente à *S. sclerotiorum* apresentou ovários e corolas apenas parcialmente necrosadas e ausência de sintomas nas brácteas e no receptáculo. Essa diferença entre as variedades foi associada com um maior teor fenólico constitutivo e induzido nas inflorescências da variedade resistente.

2.3 Interação entre plantas e *B. cinerea*

Durante muito tempo foi considerado que os necrotróficos são patógenos de interação fisiológica limitada com o seu hospedeiro. No entanto, estudos recentes descrevem uma interação mais aprimorada do que anteriormente previsto para *B. cinerea* e seus hospedeiros (Wang *et al.*, 2013; Wen, 2013; Lai & Mengiste, 2013; van Kan, 2006). El Oirdi *et al.* (2011) demonstraram que *B. cinerea* explora o antagonismo hormonal entre JA e SA para promover doença em tomate. A secreção de um elicitor da via de SA por *B. cinerea* resulta na repressão da via de JA, permitindo assim o seu desenvolvimento em tomate. Além disso, a morte celular do hospedeiro requer uma participação ativa tanto do patógeno quanto da planta, e *B. cinerea* emprega inúmeras estratégias para gerar a morte de células e promover sua colonização no hospedeiro (Frías *et al.*, 2013; van Kan, 2006; Choquer *et al.*, 2007). *B. cinerea* secreta fitotoxinas não específicas, ou seja, capazes de promover a morte de células em um grande número de espécies de plantas. A fitotoxina mais estudada é a toxina botridial, a

qual é produzida durante a infecção e resulta em clorose e no colapso de células, facilitando a penetração e a colonização por *B. cinerea* (van Kan, 2006). Além da produção de fitotoxinas, *B. cinerea* produz espécies reativas de oxigênio durante a penetração da cutícula e durante a formação da lesão primária no hospedeiro. A explosão oxidativa ocorre em inúmeras interações planta-patógeno durante uma reação de hipersensibilidade, um tipo de morte celular programada que confere resistência à patógenos biotróficos (Choquer *et al.*, 2007). No caso de um necrotrófico como *B. cinerea*, a morte de células do hospedeiro beneficia o patógeno e resulta na suscetibilidade da planta. Estudos realizados em fumo e *A. thaliana* sugerem que *B. cinerea* pode inclusive necessitar de uma resposta de hipersensibilidade para alcançar patogenicidade completa (Govrin & Levine, 2002; Dickman *et al.*, 2001). Adicionalmente, Kabbage *et al.* (2013) verificaram que a produção de ácido oxálico pelo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* é responsável pela indução de apoptose nas células de *A. thaliana*, beneficiando a colonização do hospedeiro por esse patógeno.

Outro alvo de ação de *B. cinerea* é o estado de redução e oxidação celular (Pieterse *et al.*, 2012). As glutarredoxinas GRXs e tiorredoxinas (TRXs) modificam o estado redox de várias proteínas, alterando a sua estrutura e atividade. Os hormônios SA e JA afetam o tampão redox glutathiona. SA aumenta a quantidade celular de glutathiona e a razão entre glutathiona reduzida e oxidada. Enquanto que JA diminui a quantidade de glutathiona (Spoel & Loake, 2011). Em *A. thaliana*, o período de tempo específico no qual SA suprime a expressão de genes responsivos a JA coincide com um aumento no nível de glutathiona (Koornneef *et al.* 2008). As glutarredoxinas (GRXs) GRX13 e GRX480 de *A.*

thaliana foram identificadas como alvos potenciais para a virulência de *B. cinerea*. Contudo, os fatores de virulência envolvidos não foram identificados. A interação direta entre GRX13 ativada por *B. cinerea* e o fator de transcrição TGA2, um possível regulador negativo da expressão de genes responsivos à JA, tem sido proposta como responsável pelo aumento da susceptibilidade à *B. cinerea* (la Camera *et al.*, 2011). Diante disso, pode ser sugerido que *B. cinerea* é capaz de modular a atividade de vias hormonais como resultado da sua interferência sobre o estado redox de proteínas do hospedeiro.

2.3.1 Resistência de plantas à *B. cinerea*

A resistência de plantas à *B. cinerea* envolve o reconhecimento de múltiplos PAMPs. A quitina da parede celular de *B. cinerea* e seus oligossacarídeos constituintes ativam diversas respostas de defesa em plantas. A atividade enzimática de poligalacturonase é essencial para a virulência de *B. cinerea*. No entanto, essa enzima também pode ativar respostas de defesa do hospedeiro mediante o seu reconhecimento direto como PAMP (Poinssot *et al.*, 2003). A poligalacturonase pode ainda ser detectada pela planta através dos produtos da degradação de pectina, os oligogalacturonídeos, os quais atuam como DAMP (Ferrari *et al.*, 2007). Proteínas inibidoras de poligalacturonase são induzidas em resposta a infecções por patógenos e se localizam na parede celular de diversas espécies de plantas (De Lorenzo *et al.*, 2001). Ao interagir com a poligalacturonase, as proteínas inibidoras de poligalacturonase podem inibir a atividade da enzima do patógeno, além de favorecer a produção de elicitores no sítio da infecção (Ferrari *et al.*, 2006).

O receptor citoplasmático do tipo quinase BIK1 (BOTRYTIS INDUCED KINASE1), é requerido para a expressão de genes responsivos ao ET e para a resistência basal de *A. thaliana* à *B. cinerea*. A fosforilação de BIK1 é regulada por PAMPs/DAMPs, bem como por ET, e o fator de transcrição responsivo ao ET, EIN3, atua diretamente na regulação de BIK1. Desse modo, BIK1 estabelece uma forte conexão com a sinalização da PTI após a interação de PAMPs/DAMPs com PRRs (Windram *et al.*, 2012; Lai & Mengiste, 2013). BIK1 foi identificado como alvo de fatores de virulência de *Pseudomonas syringae*, o que evidencia sua importância na imunidade de plantas (Zhang *et al.*, 2010). Contudo, não são conhecidos efetores de fungos necrotróficos que atuam sobre BIK1 (Lai & Mengiste, 2013).

A interação entre MAPKs (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES) e fatores de transcrição desencadeia respostas imunes mediante o reconhecimento de *B. cinerea* (Lai & Mengiste, 2013). Birkenbihl *et al.* (2012) demonstraram que o fator de transcrição de *A. thaliana* WRKY33 é essencial para a defesa contra *B. cinerea*. WRKY33, um substrato de MPK3/MPK6, é fosforilado pela ação destas quinases em resposta à *B. cinerea*. Esta fosforilação orienta WRKY33 aos promotores de genes ACS (ACS2 e ACS6) e PAD3, ativando a síntese de ET e de camalexina, respectivamente (G. Li *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2011). As proteínas de ligação ao fator sigma SIB1 e SIB2 reconhecem o domínio C-terminal de WRKY e estimulam a atividade de ligação de WRKY33 ao DNA. Em *A. thaliana*, da mesma forma que WRKY33, tanto SIB1 quanto SIB2 são rapidamente e fortemente induzidos em resposta a infecção por *B. cinerea*. No duplo mutante de *A. thaliana* *sib1 sib2* a resistência à *B. cinerea*

é comprometida, sugerindo que SIB1 e SIB2 atuam como ativadores de WRKY33 na defesa de plantas a necrotróficos (Lai *et al.*, 2011a).

Além dos fatores de transcrição WRKY, os fatores de transcrição ERFs e MYBs também atuam na resistência de plantas à necrotróficos (Lai & Mengiste, 2013). Os ERFs geralmente se ligam ao box GCC nos promotores de genes responsivos à JA/ET, incluindo o gene codificante da defensina *PDF1.2*. Lay e colaboradores (2003) isolaram defensas florais de petúnia (PhD1 e PhD2) e demonstraram, *in vitro*, a ação de inibição destas defensas sobre o crescimento de *B. cinerea* e *Fusarium oxysporum*. Contudo, não foram conduzidos estudos de avaliação do envolvimento destas defensas florais com vias de sinalização hormonais. Diversos ERFs já foram relatados como importantes reguladores positivos das respostas de resistência de plantas ao *B. cinera* (Moffat *et al.*, 2012; Son *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012). O fator de transcrição *MYB BOTRYTIS SUSCEPTIBLE 1* (BOS1) restringe a necrose ocasionada por diversos patógenos por meio de sua interação com *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 INTERACTOR* (BOI), uma ligase RING E3 que atua na ligação entre a ubiquitina e proteínas alvo (Luo *et al.*, 2010; Mengiste *et al.*, 2003). Apesar desses estudos demonstrarem o envolvimento dos referidos fatores de transcrição na resistência de plantas à *B. cinerea*, os reguladores que interagem diretamente com os diversos ERFs e MYBs ainda são desconhecidos (Lai & Mengiste, 2013).

Conforme exposto, de modo geral a ativação de respostas mediadas por JA/ET e a síntese de camalexina tem um importante papel na resistência de plantas à *B. cinerea*. No entanto, alguns trabalhos já relataram a suscetibilidade de plantas à *B. cinerea* mesmo apresentando acúmulo normal de mRNA do gene *PDF1.2*, marcador da via de JA, e de camalexina (Ferrari *et al.*, 2003; Veronese

et al., 2004). Diante disso, pode ser sugerido que outras vias de defesa desconhecidas podem ser igualmente ou ainda mais importantes na resistência à *B. cinerea* (Lai *et al.*, 2011a).

A autofagia (auto alimentação) é um processo catabólico no qual proteínas e organelas celulares danificadas são engolfadas em vesículas de dupla membrana denominadas autofagossomos. Após a indução de autofagia, o autofagossomo transfere o material destinado para a degradação e reciclagem para o vacúolo, onde sofrerá ação de hidrolases (Liu & Bassham, 2012). Lai e colaboradores (2011b) demonstraram que ATG18a, uma proteína crucial para a autofagia em *A. thaliana*, interage com o fator de transcrição WRKY33. No mutante *wrky33*, a indução de *ATG18a* e consequente indução da autofagia em resposta à infecção por *B. cinerea* foram comprometidas, o que resultou em uma marcante suscetibilidade do mutante à *B. cinerea*. Os autores sugeriram que a autofagia tem um importante papel nas vias de sinalização mediadas por JA e WRKY33 em resposta à infecção por patógenos necrotróficos. Wang *et al.* (2013) observaram que plantas intactas, bem como folhas e flores destacadas de petúnia, expressando insensibilidade ao ET (*etr1-1*), apresentaram redução dos sintomas e atraso do progresso da doença causada por *B. cinerea*. Os autores atribuíram a resistência do mutante à *B. cinerea* ao atraso da senescência induzida pelo patógeno. Além disso, em resposta à *B. cinerea*, as plantas mutantes foram capazes de ativar a expressão de *PhERFs* e a consequente expressão de genes de defesa da via do JA de maneira independente de ET. Em flores de petúnia o ET é um regulador chave da autofagia, que ocorre tanto em resposta à polinização quanto na senescência natural das flores (Shibuya *et al.*, 2013). A ativação da via do ET já foi relatada em diversas interações entre

plantas e *B. cinerea* (Cristescu *et al.*, 2002; Broekaert *et al.*, 2006), inclusive em folhas de petúnia desafiadas com o referido patógeno (Wang *et al.*, 2013). Diante disso, pode ser hipotetizado que a contribuição de ET com a suscetibilidade de flores de petúnia à *B. cinerea*, relatada por Wang *et al.* (2013), está condicionada a alguma estratégia de bloqueio da autofagia por *B. cinerea*. Está hipótese pode ser sustentada pelos resultados obtidos por Kabbage e colaboradores (2013). Os autores sugeriram que, através da síntese de ácido oxálico, o necrotrófico *S. sclerotiorum* suprime a autofagia e promove a apoptose de células de *A. thaliana*, resultando na suscetibilidade do hospedeiro. Adicionalmente, *S. sclerotiorum* e *B. cinerea* são patógenos estreitamente relacionados, sendo que *B. cinerea* também é um produtor notório de ácido oxálico (Amselem *et al.*, 2011).

2.4 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

Em plantas, o silenciamento gênico pós-transcricional é um importante e eficiente mecanismo natural de defesa contra a infecção viral (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). Plantas infectadas por vetores virais recombinantes induzem 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 silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) permite o estudo da função de genes por meio da utilização de vetores virais, nos quais é inserido um fragmento gênico de interesse para formar o RNA dupla fita (dsRNA), dando início ao processo de silenciamento (Unver & Budak, 2009). Após a formação do dsRNA, este é clivado em fragmentos de 21 a 26 nucleotídeos pela DICER, uma enzima com domínios de RNase III. Estes fragmentos resultantes, denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs), são incorporados no complexo de

silenciamento induzido por RNA (RISC), que irá degradar o mRNA que possua identidade com a sequência do siRNA (Baulcombe, 2004; Unver & Budak, 2009). Liu e colaboradores (2002) demonstraram um eficiente sistema de VIGS, em *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, utilizando um vetor baseado no *Tobacco Rattle Virus* (TRV). Estes autores estabeleceram o silenciamento do gene endógeno fitoeno desaturase (*PDS*), sendo a inserção do TRV veiculada por *Agrobacterium tumefaciens* em plantas de tomate com três semanas de idade. Além deste trabalho, outros também relataram o sucesso do silenciamento de genes, em solanáceas através da utilização do vetor TRV (Hartl *et al.*, 2008; Brigneti *et al.*, 2004; Jablonska *et al.*, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

No presente trabalho, foram utilizadas quatro cultivares de *P. hybrida*, a saber: Picobella White (milliflora - Van Leeuwen), Picobella Rose (milliflora - Van Leeuwen), Bravo (grandiflora - Syngenta Flowers) e Hurrah (multiflora - Syngenta Flowers). As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 14 h até a fase reprodutiva.

3.2 Isolamento e inoculação com *B. cinerea*

Flores de petúnia apresentando sintomas de mofo cinzento foram utilizadas no procedimento de isolamento monospórico de *B. cinerea*. O isolado foi cultivado por 10 dias em meio ágar batata dextrose (BDA) a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 14 h para induzir a esporulação. Para a confirmação da espécie do isolado foi realizado o sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) e da região gênica polimórfica *NEP2* (Mirzaei *et al.*, 2008). Para tanto, foi procedida a coleta do micélio e dos esporos formados no meio BDA, sendo imediatamente empregados na extração de DNA. Ao material coletado foi adicionado nitrogênio líquido e realizada a trituração dos tecidos. Em seguida, o material triturado foi misturado com 750 μL de tampão CTAB (Tris a 100 mM e pH 8,0; NaCl a 1,4 M; EDTA a 20 mM; CTAB a 2%) e 15 μL de 2-

mercaptoetanol. Essa mistura foi agitada por 2 min em vortex e incubada a 65°C por 30 min. Após esse período, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 min e foram acrescentados 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). A nova mistura foi agitada em vortex por 1 min e centrifugada a 16000 x g durante 10 min a 4 °C. Imediatamente ao término da centrifugação, foram transferidos 500 µL do sobrenadante para um novo microtubo contendo 500 µL de isopropanol e 250 µL de acetato de amônio a 7,5 M. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 16000 x g durante 5 min a 4 °C. Em sequência, o precipitado de DNA obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 16000 x g por 5 min a 4 °C. Após o descarte e total evaporação do etanol 70%, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água ultrapura. A amplificação por PCR das regiões ITS1 e ITS2 foi composta de tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂; 0,20 mM de cada dNTP (Invitrogen); 0,20 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (região ITS1: ITS1 F 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3' e ITS2 R 5' –GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC- 3'; região ITS2: ITS3 F 5' –GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC- 3' e ITS4 R 5' –TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3'); 1 U de Platinum® *Taq* e 1 µL de DNA, sendo o volume final ajustado com água ultrapura para 15 µL. A reação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 50 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 45 s, seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 min. A amplificação por PCR da região *NEP2* foi procedida conforme descrito por (Mirzaei *et al.*, 2008). O tamanho e a concentração dos fragmentos amplificados foram estimados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H₃BO₃; 2 mM de EDTA]. Para a estimativa da concentração foram utilizados 500 ng de λHindIII (Invitrogen) como marcador

de massa molecular, já para a estimativa do tamanho foram utilizados 1 µg do marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen ou Promega). O gel foi deixado em contato com uma solução de tampão TBE 1X adicionada de brometo de etídio (0,5 mg mL⁻¹) por 10 min. Em seguida, o gel foi exposto a luz UV e fotografado através de um sistema de fotodocumentação computadorizado (Loccus Biotecnologia). Todas as demais separações de ácidos nucleicos por eletroforese seguiram esses mesmos procedimentos.

Uma vez confirmada a obtenção dos tamanhos esperados de ITS1, ITS2 e *NEP2*, os produtos de PCR foram purificados com as enzimas *ExoI* e *SAP* e sequenciados. A reação de purificação foi composta por 50 ng de produto de PCR, 3,3 U de *ExoI* e 0,66 U de *SAP* em um volume final de 6 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 30 min e, em seguida, a 80 °C por 15 min. Por fim, em cada produto de purificação, foram adicionados 4,5 pmol de um determinado oligonucleotídeo iniciador (o produto de PCR da região ITS1 foi sequenciado separadamente com ITS1 F e ITS2 R; o produto de PCR da região ITS2 foi sequenciado separadamente com ITS3 F e ITS4 R; o produto de PCR da região *NEP2* foi sequenciado separadamente com NEP+ e NEP-). O sequenciamento foi realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Alvorada, RS) e os dados obtidos foram analisados fazendo uso do software Chromas Lite 2.1.1

As culturas de *B. cinerea* foram renovadas a cada 15 dias, sendo procedida a inoculação de flores destacadas de petúnia em câmara úmida e o re-isolamento monospórico do patógeno. Esporos de *B. cinerea* foram coletados através da adição de água autoclavada e raspagem do isolado em placas de BDA contendo o patógeno cultivado por 10 dias. Em seguida, a solução de esporos foi filtrada com uma dupla camada de lenço Kleenex® a fim de eliminar

as hifas. A concentração de esporos foi estabelecida por meio da utilização de câmara de Neubauer e as soluções foram sempre ajustadas para 10^6 esporos mL^{-1} de água (Dinh *et al.*, 2011). As flores destinadas à inoculação foram sempre marcadas no estágio de botão floral (três dias antes da inoculação), permitindo o controle da idade das flores inoculadas. Um dia após a antese, no estágio de flor totalmente aberta, as flores marcadas foram destacadas e seus pedúnculos foram posicionados dentro de tubos de capacidade de 1,5 mL contendo 1 mL de água destilada autoclavada. Em seguida, essas flores foram inoculadas com uma alíquota de 7 μL da solução de esporos, sendo mantidas em câmara úmida até a avaliação da doença. Na inoculação de botões foram empregados os mesmos procedimentos.

3.3 Avaliação da doença

A avaliação da doença empregou uma medida de biomassa de *B. cinerea* em crescimento ativo nas flores inoculadas. Essa medida consistiu na quantificação do acúmulo de mRNA do gene *ActA* de *B. cinerea* (*BcActin*) (Wang *et al.*, 2013) (procedimento detalhado no item 3.3.2). Para tanto, as flores foram retiradas das câmaras úmidas 24 h ou 48 h após a inoculação (hpi), fotografadas e a pétala inoculada foi imediatamente armazenada em nitrogênio líquido até o momento da extração de RNA.

Uma parcela das flores e botões inoculados com *B. cinerea* foi mantida em câmara úmida até os 10 dias após a inoculação, permitindo a contagem dos esporos formados. Essas flores e botões foram pesados previamente à inoculação com *B. cinerea*. Sendo assim, 10 dias após a inoculação, as flores e botões foram retirados das câmaras úmidas e depositados dentro de placas de

petri, sobre as quais foram adicionados três mL de água para auxiliar na recuperação dos esporos. Essa recuperação foi procedida do mesmo modo descrito no item 3.2 e a quantificação dos esporos foi feita em câmara de Neubauer. Por fim, os valores obtidos de número de esporos por mL de água foram divididos pelos respectivos pesos úmidos das flores ou botões sobre os quais foram formados os esporos. Nesse procedimento foram utilizadas 4 repetições biológicas e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de aproximadamente 100 mg de tecido triturado (pétalas ou folhas) em nitrogênio líquido. Ao tecido triturado foi acrescentado 1 mL de TRI Reagent® (Life Technologies) e a extração foi procedida conforme as instruções do fabricante. A concentração do RNA total foi estimada em gel de agarose a 0,8%, sendo utilizado como marcador 500 ng de λ HindIII (Invitrogen). Em sequência, o RNA extraído foi 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™ (Promega); 2 mM de $MgCl_2$; 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen); 1,3 μ M de oligo(dT) (5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT T - 3'); 6 U de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) e 0,3 μ L de GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), totalizando um volume de 6 μ L que foi submetido às seguintes condições: 5 min a 25 °C, 1 h e 10 min a 42 °C e 15 min a 70 °C.

3.3.2 Quantificação da biomassa de *B. cinerea* por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Os genes analisados nessa etapa foram: *ActA* de *B. cinerea* (*BcActin*) e *Actin* de *P. hybrida* (*PhActin*). As reações de amplificação consistiram de 4 µL de cDNA diluído 40 vezes; tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 1); SYBR® Green (Invitrogen) diluído 10000X; 0,2 µL de ROX (Invitrogen); 0,25 U de Platinum® *Taq* e 3,05 µL de água ultrapura para completar o volume de 10 µL. Todas as reações em tempo real foram executadas em um sistema de detecção de sequência modelo 7300 Applied Biosystems com as seguintes condições: 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 desses ciclos foi realizada a etapa de dissociação que consistiu de 15 s a 95 °C; 1 min a 60 °C; 15 s a 95 °C; 15 s a 60 °C. A especificidade de cada reação de amplificação foi verificada em gel de agarose e também através da curva de dissociação. O limiar de fluorescência foi automaticamente estabelecido e os valores de ciclo limiar (Ct) de cada reação foram calculados pelo programa “7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4” (Applied Biosystem). Os níveis de expressão relativa do gene *BcActin* (gene alvo) em relação ao *PhActin* (gene de referência) foram determinados pela diferença entre seus valores de Ct ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}}$). Por fim, a abundância de transcritos de *BcActin* foi determinada por meio da fórmula: $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Foram utilizadas quatro repetições biológicas e os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4 Análise de expressão de genes de petúnia durante a interação com *B. cinerea* e durante a senescência induzida por polinização

Os genes avaliados nessa etapa tiveram suas expressões estimadas em pétalas de petúnia através da quantificação do acúmulo de mRNA por meio de qRT-PCR. Os genes avaliados foram: *ácido 1-carboxílico-1- aminociclopropano oxidase (PhACO1)*, *ethylene insensitive 3-like 1 (PhEIL1)*, *gene relacionado a autofagia 8 (PhATG8a)*, *defensina floral 1 (PhDEF1)* e *defensina floral 2 (PhDEF2)*. As reações de amplificação seguiram os mesmos procedimentos descritos no item acima (3.3.2) e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão detalhados na Tabela 1. Os níveis de expressão relativa dos genes acima citados (genes alvo) em relação ao *PhActin* de petúnia (gene de referência) foram determinados pela diferença entre seus valores de Ct ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}}$). Adicionalmente, a fim de comparar os níveis de expressão gênica nas flores inoculadas com *B. cinerea* com o calibrador (expressão gênica nas flores inoculadas com água) foi utilizada a seguinte equação: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{flores inoculadas com } B. cinerea} - \Delta Ct_{\text{flores inoculadas com água}}$. Por fim, a abundância de transcritos dos genes candidatos foi determinada por meio da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Foram utilizadas três repetições biológicas e os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As expressões desses mesmos genes também foram avaliadas durante a senescência induzida por polinização. Sendo assim, um dia após a antese, flores de Picobella Rose e de Picobella White foram polinizadas (Picobella Rose foi utilizada como doadora de pólen para Picobella White, sendo que o oposto também ocorreu). Essas flores foram coletadas aos 2, 3 e 4 dias depois da polinização (ddp). As flores controle, utilizadas como calibradores, não foram

polinizadas e tinham a mesma idade que as flores polinizadas, portanto foram coletadas aos 3 dias após a antese (calibrador para 2 ddp), 4 dias após a antese (calibrador para 3 ddp), ou 5 dias após a antese (calibrador para 4 ddp). Foram utilizadas três repetições biológicas e os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

3.5 Microscopia de pétalas de petúnia inoculadas com *B. cinerea*

As pétalas de flores de Picobella Rose e Picobella White desafiadas com *B. cinerea* (48 hpi) foram submetidas à coloração com azul de trypan 0,5% (2,125 g de NaCl; 1,25 g de azul de trypan e 250 mL de água destilada). Em seguida, as amostras foram analisadas em microscópio óptico. Por meio desse procedimento, foi avaliada a germinação dos esporos e o desenvolvimento de hifas de *B. cinerea*.

Para a detecção do acúmulo de compostos fenólicos autofluorescentes as pétalas de flores de Picobella Rose e Picobella White desafiadas com *B. cinerea* foram submetidas aos tratamentos descritos no estudo de Wesp-Guterres *et al.* (2013). Resumidamente, esse protocolo combina a coloração das amostras com azul de trypan 0,05% em lactofenol:etanol (1:2 v:v) com o tratamento com ácido pícrico 2,5% em metil-salicilato. Entretanto, no presente trabalho, foi necessário desenvolver uma adaptação do protocolo descrito por Wesp-Guterres *et al.* (2013), tendo em vista que o protocolo dos referidos autores foi estabelecido para análises histopatológicas em folhas. Para tanto, as pétalas de flores de Picobella Rose e Picobella White inoculadas com água ou inoculadas com *B. cinerea* foram coletadas 12, 24 e 48 hpi por meio da realização de cortes entre as nervuras principais das flores, permitindo a

obtenção de fragmentos de pétalas que continham a área da lesão causada por *B. cinerea* e áreas sem lesão. Após a excisão dos fragmentos de pétalas das flores, os fragmentos obtidos foram depositados sobre lâminas de microscopia com a face adaxial voltada para cima. Essas lâminas foram então depositadas dentro de placas de petri, nas quais foram adicionadas as soluções (sempre de modo a cobrir totalmente as amostras). A primeira solução adicionada sobre as amostras foi a solução clareadora e fixadora [ácido tricloro-acético 0,15 % em etanol:clorofórmio (3:1 v:v)], sendo mantida em contato com as pétalas por 6 h. Em seguida, as lâminas contendo as pétalas foram transferidas para novas placas de petri, sendo adicionado glicerol 50% sobre as amostras. Após 15 min, as lâminas foram novamente transferidas para novas placas de petri nas quais foram submetidas a desidratação por meio da imersão em soluções com uma crescente porcentagem de etanol: etanol 50% por 15 min; etanol 70% por 15 min; etanol 80% por 15 min; etanol 90% por 15 min; etanol 100% por 15 min. A cada troca de solução de etanol, a solução contendo a menor porcentagem de etanol era removida das placas de petri com auxílio de pipeta pasteur. Imediatamente após a etapa de desidratação, uma solução de ácido pícrico 2,5% em metil-salicilato foi adicionada sobre as amostras. As amostras foram incubadas com ácido pícrico por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de ácido pícrico foi removido por meio de lavagens com metil-salicilato. Após o tratamento com a solução de ácido pícrico as pétalas adquiriram uma consistência mais rígida, sendo possível transferi-las para uma nova lâmina de microscopia. Por fim, uma gota de metil-salicilato foi depositada sobre os fragmentos das pétalas antes de ser posicionada a lamínula. Todas as amostras submetidas ao tratamento com ácido pícrico foram analisadas por meio de

microscopia de epifluorescência (Olympus BX 41 – luz azul epifluorescente, filtro de excitação U-MWB2: 460-490 nm e filtro de barreira BA520: 500 nm).

3.6 Silenciamento dos genes *PhCHSj*, *PhPDS*, *PhDEF1* e *PhDEF2*

A otimização do método de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) em flores de petúnia foi realizada através da clonagem do gene *chalcona sintase j* (*PhCHSj*) no vetor de silenciamento baseado no *tobacco rattle virus* (TRV) (Valentine *et al.*, 2004). Já a otimização do método VIGS em folhas de petúnia foi feita através da clonagem do gene *fitoeno desaturase* (*PhPDS*) no vetor baseado no TRV. Após a otimização do método VIGS, os mesmos procedimentos empregados no silenciamento dos genes *PhCHSj* e *PhPDS* foram utilizados para o silenciamento dos demais genes.

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR e nas clonagens no vetor TRV

	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
BcActin*	TGCTTTGAGACCTTCAACGC	GGTGCAATGATCTTGACCTTC
PhActin**	AGCCAACAGAGAGAAGATGACCCA	ACACCATCACCAGAGTCCAACACA
PhACO1*	ATGGAGAACTTCCCAATTATCAGC	TCCATGCACTTCTTGTAAATGAC
PhEIL1*	GCCTTTTCCATCTCCACTTACTATTG	TGGATATCAAGCCCCAAATTA
PhATG8a**	TGGCAGACAGCTGACTTTTC	TTTTAAACAACCATTTGAAGAGAGA
TRV-PhDEF1	TGGTAACTCCATCTGTTTCTTCGCAGT	ATGAATTCTGCCTCAAGCAAAGCTTCAG
TRV-PhDEF2	TGGTAAACATAAAGGCCCATGTGTA	ATGAATTCGCCATAGTCTTTACCTCGTTAGCC
TRV-PhPDS	TGGTAAACGGCACTCAACTTTATAAAC	ATGAATTCCTCAGTTTTCTGTCAAACC
TRV-PhCHSj	TGGTAACTGGAGGCATTCCAACCATTG	ATGAATTCCATTCAAGACCTTCACCAGTG
extPhCHSj		TTAGCCCAGGCCCAA ATC CAA
extPhPDS	ACTCCCATGCCACGACCAGA	AGTTGGGCGCGGAGAAGCAC
extPhDEF1		CTACACCATCATATCTGCCTCAAGC
extPhDEF2	TGCTCTTGCTGCCTATGAGGCG	

* Sequências retiradas do estudo de Wang *et al.* (2013).

** Sequência retirada do estudo de Shibuya *et al.* (2013).

3.6.1 Clonagem dos genes *PhCHSj*, *PhPDS*, *PhDEF1* e *PhDEF2* no pGEM-T

Para a obtenção das sequências codificantes dos genes mencionados foi realizada a extração de RNA total de flores e folhas de petúnia, seguida do tratamento com DNase e síntese de cDNA, conforme detalhado no item 3.3.1. Em sequência, o cDNA foi utilizado como molde para a amplificação dos genes de interesse por PCR, na qual foram empregados oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *HpaI*, no iniciador direto (F), e *EcoRI*, no iniciador reverso (R), permitindo a posterior inserção direcional dos genes no vetor de silenciamento. O cDNA sintetizado a partir do RNA de pétalas foi utilizado para a clonagem dos genes *PhCHSj*, *PhDEF1* e *PhDEF2*. Enquanto que o cDNA sintetizado a partir do RNA de folhas foi utilizado para a clonagem do gene *PhPDS*. A PCR foi composta de tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 1); 1 U de Platinum® *Taq* (Invitrogen) e 1 µL de cDNA, sendo o volume final ajustado com água ultrapura para 20 µL. A reação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a 55 °C por 45 s, extensão a 72 °C por 1 min, seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 min. O tamanho do fragmento amplificado foi estimado em gel de agarose a 2%. Uma vez confirmados os tamanhos previstos pela análise das sequências *in silico*, os fragmentos gênicos foram inseridos no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) conforme indicação do fabricante.

O produto de ligação entre os insertos e o vetor pGEM-T foi inserido 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 antes da eletroporação, a qual foi realizada em cubetas de 0,1 cm (BIO RAD). O pulso aplicado foi de 1,8 kV e imediatamente foi acrescentado 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido. As células foram, então, transferidas para tubos de vidro e incubadas por 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 225 rpm. Após esse período, uma alíquota de 100 μL da cultura foi plaqueada em meio LB sólido acrescido de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IPTG, 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de X-Gal, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tetraciclina. As bactérias foram mantidas em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 12 h.

Após o cultivo das células transformadas, parte de cada colônia branca (recombinante) foi utilizada na PCR para a identificação das colônias. Nessa reação, foi utilizado tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl_2 ; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5 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 feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min; 40 ciclos constituídos de desnaturação a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, pareamento a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 45 s, extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min; extensão final a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, permitindo a identificação das colônias pGEM-*PhCHSj*, pGEM-*PhPDS*, pGEM-*PhDEF1* e pGEM-*PhDEF2*.

3.6.2 Extração de plasmídeos recombinantes

As colônias de *E. coli*, identificadas por PCR como portadoras dos plasmídeos pGEM-*PhCHSj*, pGEM-*PhPDS*, pGEM-*PhDEF1* e pGEM-*PhDEF2*, foram utilizadas para a extração de seus plasmídeos recombinantes. Essas colônias foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido contendo tetraciclina ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ampicilina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após a manutenção da cultura por 16 h a 37°C sob agitação (220 rpm), as células foram recuperadas por centrifugação a $4000 \times g$ por 5 min, sendo o precipitado ressuspenso em 200 μL de uma solução contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNase; 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0) e 10 mM de EDTA 10 mM. Sobre essa mistura foram acrescentados e homogeneizados 200 μL de NaOH a 200 mM e SDS a 1%, promovendo a lise celular. Em seguida, foram adicionados 200 μL de uma solução contendo acetato de potássio a 3 M (pH 5,5) e após uma nova homogeneização o material foi centrifugado a $16000 \times g$ por 10 min a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado igual volume (aproximadamente 500 μL) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). Após a agitação da mistura, foi realizada uma centrifugação a $16000 \times g$ por 2 min a 4°C . Para a precipitação do DNA plasmidial, a fase aquosa foi mais uma vez transferida para um novo tubo onde foi acrescentado igual volume de isopropanol (aproximadamente 400 μL) e 10% de acetato de sódio a 3 M (pH 5,2). Essa nova mistura foi mantida durante 2 h a -20°C . Subsequentemente, foi feita uma centrifugação a $16000 \times g$ durante 15 min a 4°C . O precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a $16000 \times g$ por 5 min a 4°C e ressuspenso em 50 μL de água ultrapura. A concentração dos plasmídeos foi estimada em gel de agarose a 0,8%, sendo utilizado como marcador 500 ng de $\lambda\text{HindIII}$ (Invitrogen).

3.6.3 Sub-clonagem dos genes *PhCHSj*, *PhPDS*, *PhDEF1* e *PhDEF2* no vetor de silenciamento

O vetor viral TRV foi cedido gentilmente por Jane Shaw e Christophe Lacomme do Instituto de Pesquisa Agrícola da Escócia, Dundee, UK. Esse vetor é dividido em pTRV1 e pTRV2b-*Green Fluorescent Protein* (pTRV2b-*GFP*). O primeiro plasmídeo contém 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 (Valentine *et al.*, 2004; Martín-Hernández & Baulcombe, 2008). Esse plasmídeo não é manipulado, sendo apenas inserido e multiplicado em bactérias. O pTRV2b-*GFP* codifica a proteína responsável pela produção do capsídeo (CP) e a proteína 2b associada ao movimento na raiz, além de conter o sítio múltiplo de clonagem, no qual está inserido o gene codificante de GFP. O sítio múltiplo de clonagem possui os sítios de restrição das enzimas *HpaI* e *EcoRI*. Esses sítios estão presentes também nos insertos *PhCHSj*, *PhPDS*, *PhDEF1* e *PhDEF2*. A sequência que codifica GFP se localiza entre os sítios das enzimas citadas e, portanto, é substituída pelo inserto de interesse após as etapas de digestão e ligação, as quais estão descritas abaixo.

Para a realização da sub-clonagem dos insertos no vetor de silenciamento, os plasmídeos pGEM-*PhCHSj*, pGEM-*PhPDS*, pGEM-*PhDEF1* e pGEM-*PhDEF2* e pTRV2b-*GFP* foram digeridos com as enzimas *HpaI* e *EcoRI*. A reação de digestão para cada plasmídeo consistiu de 550 ng de DNA plasmidial, tampão da *EcoRI* 1X, 10 U de *EcoRI*, 5 U de *HpaI* e água ultrapura para completar o volume final de 50 µL. As reações foram incubadas a 37 °C por 2 h. Imediatamente após o período de incubação, as reações passaram por uma

re-extração para inativar a atividade das enzimas. O volume dos produtos das digestões foi ajustado para 500 μ L, ao qual foi acrescentado igual volume de fenol. Após a homogeneização da mistura foi realizada uma centrifugação a 16000 x g por 2 min a temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi acrescentado 1/2 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). A nova mistura foi homogeneizada e centrifugada a 16000 x g por 2 min a temperatura ambiente. Novamente a fase aquosa foi 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 favoreceu a recuperação de moléculas grandes, ou seja, do vetor pTRV2b e não de *GFP*. Já o método de precipitação realizado para o produto de digestão do pGEM-*PhCHSj*, pGEM-*PhPDS*, pGEM-*PhDEF1* e pGEM-*PhDEF2* visou otimizar a recuperação de fragmentos pequenos, ou seja, dos insertos. Dessa forma, o primeiro método, de precipitação 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 ressuscitado em 25 μ L de água ultrapura. O outro método de precipitação, que visou a recuperação de fragmentos pequenos, consistiu na adição de 2 volumes de etanol absoluto sobre a fase aquosa, homogeneização e incubação a -80 °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 ressuspendido 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. Para as reações de ligação foi utilizado tampão para ligações rápidas 1X (Promega); 100 ng de vetor pTRV2b (12300 pb); 7 ng de inserto *PhCHSj* (266 pb) ou 10 ng de inserto *PhPDS* (424 pb) ou 7,5 ng de inserto *PhDEF1* (304 pb) ou 4,2 ng de inserto *PhDEF2* (167 pb); 3 U de T4 DNA ligase (Promega); água ultrapura para completar o volume final de 20 µL. Essa 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 3.6.1. Uma alíquota de 100 µL da cultura de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido acrescido de 15 µg mL⁻¹ de tetraciclina e 100 µg mL⁻¹ 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 pTRV2b-*PhCHSj*, pTRV2b-*PhPDS*, pTRV2b-*PhDEF1* e pTRV2b-*PhDEF2*. A PCR dessas colônias foi composta de tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (TRV F 5'-GAG CAT AAT TAT ACT GAT TT-3' e TRV R 5'-CGA GAA TGT CAA TCT CGT AGG-3'); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume de 20 µL. As reações foram submetidas às seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3

min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 45 s, pareamento a 45 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min; extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%. As colônias que apresentaram tamanho de banda correspondente aos insertos ligados no vetor pTRV2b foram empregadas nas etapas que compõem a extração de plasmídeo e sequenciamento (com exceção dos plasmídeos pTRV2b-*PhPDS* e pTRV2b-*PhCHSj*, os quais não foram destinados ao sequenciamento). Aos plasmídeos destinados ao sequenciamento (100 ng) foram adicionados 4,5 pmol do oligonucleotídeo iniciador TRV F. O sequenciamento foi novamente realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Alvorada, RS) e dados obtidos foram analisados fazendo uso do software Chromas Lite 2.1.1

3.6.4 Infiltração com *Agrobacterium tumefaciens* contendo os vetores virais

Uma vez confirmada a obtenção dos plasmídeos pTRV2b-*PhCHSj*, pTRV2b-*PhPDS*, pTRV2b-*PhDEF1* e pTRV2b-*PhDEF2*, esses foram inseridos em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*, sendo o mesmo realizado para os vetores pTRV1 e pTRV2b-*GFP*. As células de *A. tumefaciens* GV3101 utilizadas nessa etapa foram gentilmente fornecidas por José Antônio Peters do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Sendo assim, 2 µL de cada plasmídeo foram, separadamente, misturados à 20 µL de células eletrocompetentes e deixados em gelo por 1 min. Em seguida, 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 cuidadosamente 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 esse período, uma alíquota de 200 µL de cada cultura de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido acrescido de 100 µg mL⁻¹ de rifampicina e 100 µg 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 da transformação com pTRV2b-*GFP*, bem como as obtidas da transformação com pTRV2b-*PhCHSj*, pTRV2b-*PhPDS*, pTRV2b-*PhDEF1* ou pTRV2b-*PhDEF2* foram submetidas à mesma PCR de colônia detalhada no item 3.6.3, tornando possível a confirmação da presença dos respectivos plasmídeos.

O procedimento de agroinfiltração foi adaptado a partir da metodologia descrita por Liu *et al.* (2002), sendo realizada em plantas de petúnia um mês após a semeadura para o silenciamento do gene *PhPDS*, aos dois ou três meses após a semeadura para o silenciamento de *PhCHSj* e aos três meses após a semeadura para o silenciamento de *PhDEF1* e *PhDEF2*. Para tanto, as seis diferentes colônias de *A. thumefaciens*, transformadas com pTRV1, pTRV2b-*GFP*, pTRV2b-*PhCHSj*, pTRV2b-*PhPDS*, pTRV2b-*PhDEF1* ou pTRV2b-*PhDEF2*, foram separadamente transferidas para 3 mL de LB líquido contendo 100 µg mL⁻¹ de rifampicina e 100 µg mL⁻¹ de canamicina. Após o cultivo das colônias a 28 °C por 16 h sob rotação de 190 rpm, 400 µL de cada cultura bacteriana foram transferidos para 20 mL de LB líquido contendo a mesma concentração dos antibióticos, 10 mM de MES e 20 µM de Acetoseringona. As culturas foram novamente submetidas às condições recém mencionadas por 18 h. Em seguida, as quatro diferentes culturas bacterianas foram lidas em espectrofotômetro (O.D._{600nm}), transferidas para tubos de 50 mL e centrifugadas por 10 min a 4000 x g. Após a precipitação das células, as mesmas foram

ressuspendidas em uma solução de infiltração composta de 10 mM de MgCl₂; 10 mM de MES e 200 µM de Acetoseríngona, sendo a O.D._{600nm} das culturas ajustada para 2,0. As células ressuspendidas foram mantidas na solução de infiltração por 3 h a temperatura ambiente. Antes da infiltração, foi realizada a mistura na proporção 1:1 (v/v) das culturas pTRV1 e pTRV2b-*GFP* (inóculo controle), e também das culturas pTRV1 e pTRV2b-*PhCHSj* (inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj*), pTRV1 e pTRV2b-*PhPDS* (inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhPDS*), pTRV1 e pTRV2b-*PhDEF1* (inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1*) e pTRV1 e pTRV2b-*PhDEF2* (inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2*). A agroinfiltração foi efetuada com seringa de 1 mL nas folhas mais velhas de cada planta de petúnia. O silenciamento do gene *PhPDS* foi procedido em todas as cultivares citadas no item 3.1, o silenciamento do gene *PhCHSj* foi procedido nas cultivares Bravo e Hurrah. Por fim, o silenciamento do gene *PhDEF1* foi procedido na cultivar Picobella White e do gene *PhDEF2* na cultivar Picobella Rose.

3.6.5 Confirmação do silenciamento por qRT-PCR

A confirmação do silenciamento dos genes *PhCHSj* e *PhPDS* foi feita através da visualização de flores com setores sem pigmento e de folhas com fotobranqueamento, respectivamente. O inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj* foi empregado em todos os demais experimentos de silenciamento para o controle das condições de cada novo experimento, os quais foram sempre realizados em câmara de crescimento a 23 ± 2 °C e fotoperíodo de 14 h. Aos 19 dias após a agroinfiltração (dpa), o acúmulo de mRNA de *PhCHSj* foi quantificado nas flores e o acúmulo de mRNA de *PhPDS* foi quantificado nas folhas jovens por meio de qRT-PCR. Os valores obtidos foram comparados entre as plantas que

receberam o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-*GFP*) e as plantas que receberam os inóculos de silenciamento (pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj* ou pTRV1+pTRV2b-*PDS*). Essa análise adotou os mesmos procedimentos descritos no item 3.4. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Tabela 1) foram TRV-*PhCHSj* F e extTRV-*PhCHSj* R para confirmação do silenciamento de *PhCHSj* e extTRV-*PhPDS* F e extTRV-*PhPDS* R para confirmação do silenciamento de *PhPDS*. O calibrador consistiu na média de cinco plantas que receberam o inóculo controle. Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

3.6.6 Avaliação da doença nas plantas contendo as defensinas florais silenciadas

Aos 36 dpa, as plantas de petúnia que foram agroinfiltradas com inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-*GFP*) ou com os inóculos de silenciamento (pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1* ou pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2*) tiveram seus botões florais marcados e as flores foram inoculadas com *B. cinerea* um dia após a antese. Para tanto, as flores marcadas foram destacadas e seus pedúnculos foram posicionados dentro de tubos de capacidade de 1,5 mL contendo 1 mL de água destilada autoclavada. Em seguida, a porção central de cada pétala dessas flores foi inoculada com uma alíquota de 7 μ L da solução de esporos de *B. cinerea* ($1,0 \cdot 10^6$ esporos mL^{-1}). As flores foram mantidas em câmara úmida até a avaliação da doença (24 hpi). Uma pétala de cada flor inoculada com *B. cinerea* foi coletada e armazenada em nitrogênio líquido até o momento da extração de RNA. Uma vez obtido o cDNA dessas pétalas, foi procedida, por qRT-PCR, a quantificação do nível de silenciamento de *PhDEF1* e *PhDEF2* nas flores das

plantas que receberam o inóculo de silenciamento (pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1* ou pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2*). Para tanto foram adotados os mesmos procedimentos descritos no item 3.6.5. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Tabela 1) foram TRV-*PhDEF1* F e ext*PhDEF1* R para confirmação do silenciamento de *PhDEF1* e ext*PhDEF2* F e TRV-*PhDEF2* R para confirmação do silenciamento de *PhDEF2*. O calibrador consistiu na média de flores de três plantas de cada cultivar que receberam o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-*GFP*). Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As pétalas coletadas (24 hpi) também foram submetidas a quantificação, por qRT-PCR, da biomassa de *B. cinerea* em crescimento ativo nas flores inoculadas. Esse procedimento foi desenvolvido conforme descrito no item 3.3.2. Para Picobella Rose e Picobella White as medidas de *BcActin* consistiram na média de três flores de plantas que receberam o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-*GFP*) (flores de plantas diferentes). Para as flores de plantas de Picobella Rose que receberam o inóculo de silenciamento (pTRV1+pTRV2b-*DEF2*) a medida de *BcActin* consistiu na média de duas flores (flores de plantas diferentes). Para as flores de plantas de Picobella White que receberam o inóculo de silenciamento (pTRV1+pTRV2b-*DEF1*) a medida de *BcActin* consistiu na média de três flores (flores de plantas diferentes).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de *B. cinerea* de flores de petúnia

A partir de flores de petúnia com sintomas de mofo cinzento foi obtido um isolado monospórico (Figura 1A-D), o qual foi empregado no sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA e da região NEP do DNA. Por meio de características morfológicas e através de comparações dos resultados do sequenciamento com o banco de dados do NCBI, foi possível confirmar a espécie do isolado como *B. cinerea* (Apêndice 1).

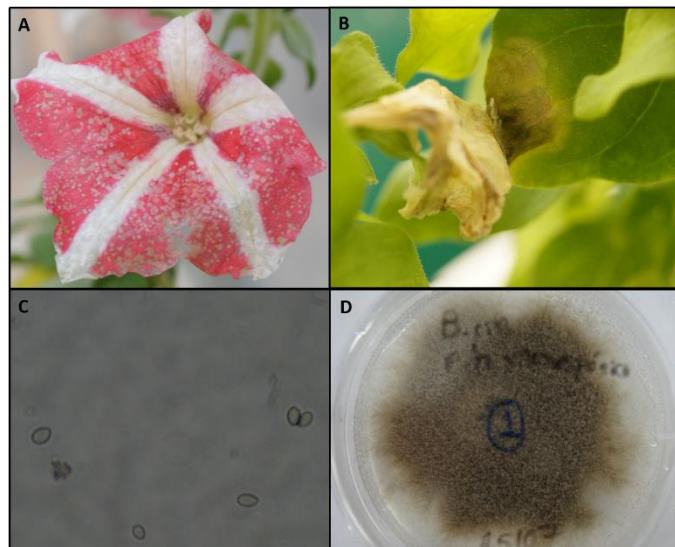


FIGURA 1. Obtenção do isolado de *B. cinerea* a partir de flores de petúnia com sintomas de mofo cinzento. A – Flor de petúnia com lesões iniciais causadas por *B. cinerea*. B – Flor de petúnia atuando como fonte de inóculo para a infecção de folhas. C – Conídios de *B. cinerea* visualizados em microscópio óptico com aumento de 400 X. D –

Isolado de *B. cinerea* em meio BDA após 10 dias de cultivo a 23 °C \pm 2 °C com fotoperíodo de 14 h.

4.2 Comparação entre cultivares de petúnia quanto a resistência à *B. cinerea*

Nessa etapa, foi procedido o desafio de flores de petúnia de diferentes cultivares com *B. cinerea*. Para tanto, flores destacadas foram inoculadas com uma solução de esporos do isolado obtido na etapa anterior. Desse modo, foi possível verificar que, em flores de Picobella Rose, a colonização por *B. cinerea* ocorreu de maneira mais rápida em comparação com as flores de Picobella White. Na Figura 2, é possível observar que essa diferença entre as duas cultivares se manteve em todos os tempos de coleta após a inoculação (12, 24 e 48 hpi). A análise de qRT-PCR de *BcActin* forneceu uma medida de crescimento ativo de *B. cinerea* nas flores inoculadas, possibilitando a quantificação das diferenças observadas na Figura 2. Através dessa análise, foi verificado que a medida de biomassa de *B. cinerea* diferiu significativamente entre Picobella Rose e Picobella White em 24 e 48 hpi. Essa quantidade foi cerca de 8 vezes maior em Picobella Rose em comparação com Picobella White em 24 hpi e cerca de 11 vezes maior em Picobella Rose em comparação com Picobella White em 48 hpi. Além disso, Picobella White não apresentou diferença significativa na medida de biomassa de *B. cinerea* entre 24 e 48 hpi, enquanto que, em Picobella Rose, essa medida foi cerca de 7 vezes maior em 48 hpi em relação ao tempo de 24 hpi. Outra constatação importante consiste no fato de que, em 48 hpi, Picobella White apresentou uma quantidade de biomassa de *B. cinerea* estatisticamente igual ao que se verificou em Picobella Rose em 24 hpi. Em conjunto, as comparações demonstraram que, em Picobella White, ocorre uma maior restrição da colonização por *B. cinerea*.



FIGURA 2. Desafio de flores das cultivares Picobella Rose e Picobella White com esporos de *B. cinerea* (1×10^6 esporos mL^{-1} de água). As fotos foram feitas em 12, 24 e 48 hpi. A – Picobella Rose inoculada com 7 μL da solução de esporos. B – Picobella White inoculada com 7 μL da solução de esporos.

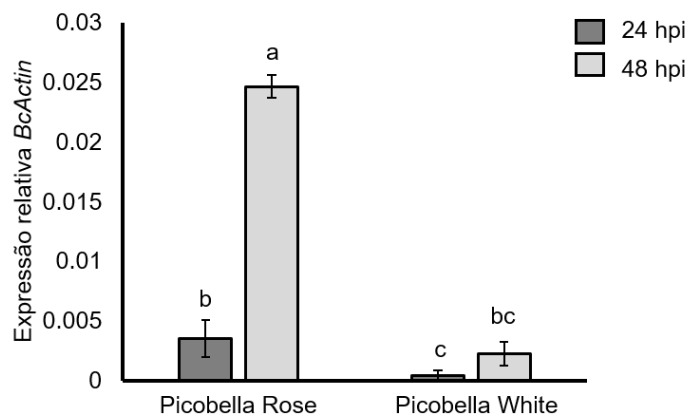


FIGURA 3. Quantificação do acúmulo de mRNA de *BcActin* por qRT-PCR nas flores de petúnia inoculadas com *B. cinerea* (24 e 48 hpi). Os valores representam as médias da expressão relativa de *BcActin* normalizado pelo gene de referência *PhActin* ($2^{-\Delta Ct}$) nas flores das cultivares Picobella Rose e Picobella White. Nessa análise foram utilizadas quatro repetições biológicas. As médias que receberam a mesma letra não diferiram pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O estudo de Krahl & Randle (1999) também demonstrou diferenças nos níveis de resistência à *B. cinerea* entre cultivares de petúnia. No referido estudo, além de cultivares, foram utilizadas linhagens endogâmicas de *P. hybrida*, um acesso de *Petunia axillaris*, espécie proposta como um dos parentais de *P. hybrida*, e dois acessos de *Petunia integrifolia*. Dentre os genótipos avaliados, a cultivar “Pink Sensation Improved”, a qual consiste em uma cultivar antiga que não é mais comercializada, foi sugerida como uma possível fonte de resistência para o melhoramento de *P. hybrida*. Contudo, a avaliação da doença foi conduzida somente em folhas (não destacadas), não quais foi realizado um ferimento previamente à inoculação com solução de esporos de *B. cinerea*. Na solanácea *Nicotiana tabacum* (tabaco), a resistência à *B. cinerea* também se mostrou dependente de cultivar. Do mesmo modo que no estudo acima citado, a avaliação da doença foi realizada em folhas, sendo quantificado o tamanho da lesão como estimativa do crescimento de *B. cinerea*. Dentre as três cultivares

de tabaco avaliadas, a cultivar Petit Havana apresentou tamanho de lesão cerca de 2,5 vezes menor que as demais cultivares suscetíveis. A resistência de Petit Havana foi relacionada com o acúmulo da fitoalexina escopoletina e de proteínas PR em resposta a infecção por *B. cinerea*. Entretanto, essa resistência só foi verificada quando as folhas destacadas foram inoculadas com solução de esporos, uma vez que o micélio de *B. cinerea* pareceu ser capaz de metabolizar escopoletina (El Oirdi *et al.*, 2010). Em outra solanácea, o tomate, os testes de patogenicidade e avaliação da doença causada por *B. cinerea* também foram realizados em folhas (El Oirdi *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2014; Asselbergh *et al.*, 2007). Sendo assim, a deficiência de estudos que avaliam a doença em flores, bem como as diferenças verificadas entre flores de Picobella Rose e Picobella White motivaram a utilização dessas cultivares como modelos para o estudo da interação entre petúnia e *B. cinerea* nas etapas subsequentes.

No intuito de verificar se o menor nível de colonização por *B. cinerea* em Picobella White resulta na formação de um menor número esporos, uma parcela das flores de Picobella Rose e Picobella White desafiadas com *B. cinerea*, bem como botões dessas cultivares desafiados com o referido patógeno, foram mantidas nas câmaras úmidas até os 10 dias após a inoculação. Os resultados da quantificação do número de esporos estão representados na Figura 4, sendo verificada a formação de um número cerca de 1,4 vezes maior de esporos em flores de Picobella Rose em comparação com Picobella White e um número cerca de 4 vezes maior em botões de Picobella Rose em comparação com Picobella White. Esses resultados sugerem que a resistência verificada em flores de Picobella White pode contribuir com a redução da formação de inóculo para infecções secundárias de outros tecidos saudáveis. Outra comparação que pode

ser feita é entre as flores e botões inoculados com *B. cinerea*. Em Picobella Rose, foi verificado um número de esporos cerca de 3 vezes maior em flores em relação aos botões e, em Picobella White, o número de esporos foi cerca de 8 vezes maior em flores em relação aos botões.

Em citros, botões menores que 8 mm são considerados resistentes à infecção pelo fungo *C. acutatum*, o qual coloniza as pétalas de modo necrotrófico, apesar de se tratar de um patógeno hemibiotrófico (Marques *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2014). O estudo de Marques *et al.* (2014) verificou que botões de citros menores que 8 mm possuem um arranjo mais compacto de papilas em suas pétalas quando comparados com botões maiores e com flores após a antese. As papilas são células da epiderme de pétalas que apresentam um formato cônico, conferindo um aspecto aveludado a esse tecido. Os autores do referido estudo consideraram que o arranjo mais compacto das papilas nos botões menores que 8 mm pode atuar como uma barreira à infecção por *C. acutatum*. Portanto, é possível que botões maiores que 8 mm e flores após a antese ofereçam menor resistência a essa infecção devido ao arranjo mais frouxo das papilas. Diante disso, é provável que uma diferença constitutiva estrutural atue em Picobella Rose e em Picobella White de modo a promover a formação de um menor número de esporos de *B. cinerea* em botões em relação às flores dessas cultivares. Entretanto, a diferença observada entre botões de Picobella Rose e botões de Picobella White sugere que outras diferenças além de estruturais atuem em botões durante a interação entre petúnia e *B. cinerea*. Apesar disso, a maior relevância de flores no ciclo da doença de *B. cinerea* motivou investigações mais profundas a respeito dos mecanismos de defesa de

flores após a antese, não sendo, portanto, incluídas avaliações em botões nas etapas seguintes.

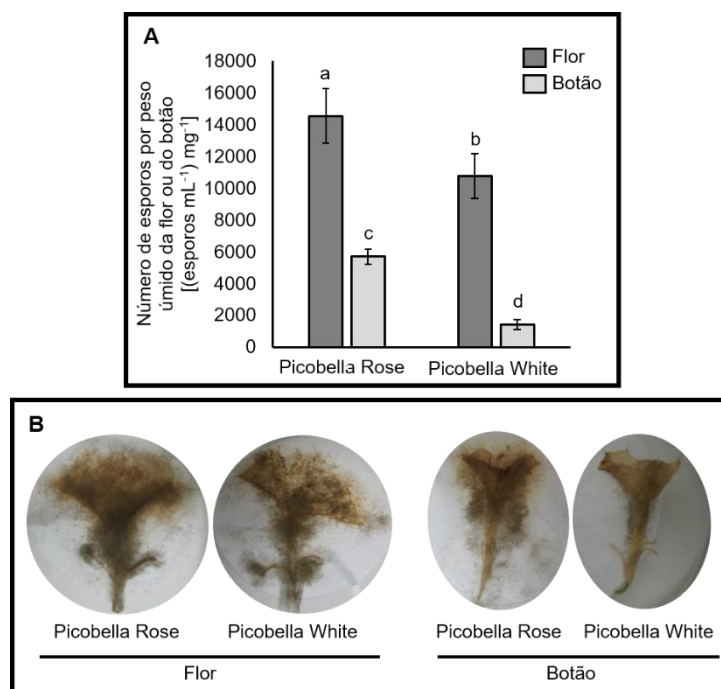


FIGURA 4. Quantificação dos esporos formados em flores e botões inoculados com *B. cinerea*. A – Número de esporos de *B. cinerea* por mL de água (utilizada para recuperar os esporos) por mg de peso úmido da flor ou do botão inoculado (peso antes da inoculação). Os esporos foram recuperados das câmaras úmidas aos 10 dias após a inoculação. Os valores são médias de 4 repetições biológicas. As letras diferentes indicam que as médias diferiram pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). B – Foto dos esporos de *B. cinerea* formados sobre as flores e botões de Picobella Rose e Picobella White aos 10 dpi.

Diante dos resultados obtidos, pode ser sugerido que flores de Picobella White ativam respostas de defesa capazes de conter a proliferação de *B. cinerea*. Essas respostas de defesa estariam ausentes ou seriam ativadas com menor eficiência em flores de Picobella Rose, tendo em vista que essas flores apresentaram maior nível de colonização pelo patógeno. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade de que as diferenças verificadas entre as flores das cultivares Picobella Rose e Picobella White resulte de características e mecanismos constitutivos que podem diferir entre essas cultivares. Por essa

razão, todas as análises realizadas nas etapas subsequentes incluíram comparações dentro de cada cultivar, sendo realizadas comparações entre as flores inoculadas com *B. cinerea* e as flores inoculadas com água, permitindo identificar se a característica avaliada é constitutiva ou induzida por *B. cinerea*. Sendo assim, a fim de investigar as respostas de defesa que atuam em flores de Picobella White e que podem não ocorrer ou ocorrer com menor eficiência em flores de Picobella Rose, as flores dessas duas cultivares foram empregadas na análise de expressão de genes candidatos potencialmente envolvidos na resistência de plantas a necrotróficos ou que atuem como potenciais alvos de manipulação por *B. cinerea* (4.3). Adicionalmente, com esse mesmo objetivo, as flores das duas cultivares também foram submetidas a análises histopatológicas por meio de microscopia óptica e microscopia óptica de epifluorescência (4.4).

4.3 Perfil de expressão de genes candidatos durante a interação entre petúnia e *B. cinerea* e durante a senescência induzida por polinização

Na presente etapa foi procedida a análise de expressão dos genes *PhACO1*, *PhEIL1*, *PhATG8a*, *PhDEF1* e *PhDEF2*. Esses genes ou seus homólogos em outras espécies já foram relatados na literatura como genes potencialmente envolvidos na resistência de plantas a necrotróficos (Wang *et al.*, 2013; Windram *et al.*, 2012; Lay *et al.*, 2003; Kabbage *et al.*, 2013). Os genes *PhACO1*, *PhEIL1* e *PhATG8a* já foram estudados em petúnia. O primeiro gene codifica uma enzima responsável pela síntese de ET (Wang *et al.*, 2013), o segundo é um fator de transcrição que atua na via de sinalização mediada por ET (Shibuya *et al.*, 2004) e *PhATG8a* é o gene que apresenta maior nível de

expressão durante o processo de autofagia que ocorre nas pétalas de petúnia em resposta a polinização ou durante a senescência natural, sendo que a expressão desse gene é induzida por ET (Shibuya *et al.*, 2013). Os genes que codificam as defensinas florais de petúnia (*PhDEF1* e *PhDEF2*) não foram estudados em petúnia, porém, *in vitro*, os produtos desses genes apresentaram ação antimicrobiana sobre *B. cinerea* e *Fusarium oxysporum* (Lay *et al.*, 2003). Em face do exposto, esses genes tiveram suas expressões avaliadas em pétalas durante a interação entre petúnia e *B. cinerea*, possibilitando a seleção de genes que foram posteriormente empregados na etapa de caracterização funcional (4.5.1). Essa seleção dos genes foi baseada em duas comparações. A primeira comparação dos níveis de expressão foi realizada entre flores inoculadas com *B. cinerea* e flores inoculadas com água, permitindo a identificação de genes responsivos a infecção por *B. cinerea*, ou seja, genes que apresentaram expressão diferencial entre as duas condições. No intuito de selecionar genes que possivelmente atuem nas respostas de defesa à *B. cinerea* em flores de Picobella White, a segunda comparação dos níveis de expressão foi realizada entre Picobella Rose e Picobella White inoculadas (48 hpi), permitindo a identificação de genes que apresentaram expressão diferencial entre as duas cultivares.

Diversos estudos demonstraram que, durante a interação com *B. cinerea*, a morte de células do hospedeiro requer uma participação ativa tanto do patógeno quanto da planta. Sendo assim, *B. cinerea* emprega inúmeras estratégias para desencadear a morte de células do hospedeiro, da qual esse patógeno obtém benefício para colonizar tecidos e órgãos das plantas (Frías *et al.*, 2013; van Kan, 2006; Choquer *et al.*, 2007). Diante disso, foi procedida uma

análise de expressão dos mesmos genes anteriormente citados nas flores de Picobella Rose e Picobella White polinizadas (não destacadas), tendo em vista que a polinização acelera a senescência e a abscisão da corola. Contudo, essa senescência induzida por polinização ocorre através da autofagia (Shibuya *et al.*, 2013), a qual também é descrita como um mecanismo de resistência de plantas a necrotróficos (Lai *et al.*, 2011b; Lenz *et al.*, 2011). Desse modo, a análise de expressão dos referidos genes nas pétalas de flores polinizadas teve como objetivo a identificação de marcas que pudessem diferenciar a senescência induzida por polinização da senescência induzida por *B. cinerea*, ambas resultando na abscisão precoce da corola. A identificação dessas marcas poderia auxiliar na elucidação de estratégias de patogênese de *B. cinerea* durante a interação com petúnia.

Previamente a análise de expressão, os fragmentos de cDNA de todos os genes, amplificados por qRT-PCR, foram separados em gel de agarose para controle da especificidade da reação (Figura 5). Todas as reações foram específicas e os fragmentos amplificados apresentaram os tamanhos esperados através da análise *in silico*.

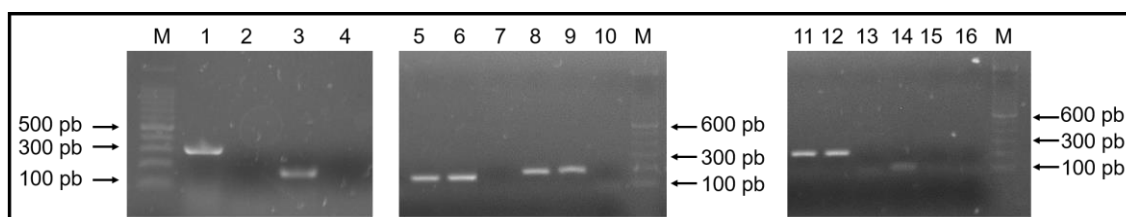


FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos amplificados por qRT-PCR a partir do cDNA de pétalas de petúnia. 1-2: *PhDEF1*; 3-4: *PhDEF2*; 5-7: *PhActin*; 8-10: *PhATG8a*; 11-13: *PhACO1*; 14-16: *PhEIL1*. As colunas que não apresentaram banda são referentes aos controles negativos. M – Marcador de massa molecular 100 pb.

Nas duas cultivares de petúnia, em 48 hpi, foi verificado um aumento das expressões dos genes *PhEIL1* e *PhATG8a* nas flores inoculadas com *B. cinerea* em comparação com as flores inoculadas com água (Figura 6). Os níveis de expressão desses dois genes foi estatisticamente igual entre as cultivares. Shibuya *et al.* (2004) demonstraram que *PhEIL1* tem um importante papel na transdução da sinalização mediada por ET. Outros três genes *PhEIL* foram identificados em petúnia, porém apenas *PhEIL1* apresentou aumento de expressão em resposta ao ET. Em geral, as plantas produzem níveis mais elevados de ET quando desafiadas por necrotróficos, incluindo *B. cinerea* (Broekaert *et al.*, 2006; Tsuchisaka *et al.*, 2009). Por essa razão, o aumento da expressão de *PhEIL1* em flores de petúnia inoculadas com *B. cinerea* era esperado. Contudo, também era esperado um aumento da expressão do gene *PhACO1*, tendo em vista que seu produto atua na síntese de ET (Wang *et al.*, 2013). Conforme verificado na análise de expressão das flores de petúnia polinizadas (Figura 7A), o pico de expressão de *PhACO1* pode ocorrer um dia (Picobella Rose) ou dois dias (Picobella White) antes da formação do pico máximo de expressão de *PhEIL1*, podendo justificar a ausência de variação da expressão de *PhACO1* em 48 hpi (Figura 6). Sendo assim, apesar de não ter sido verificado aumento de expressão de *PhACO1*, o maior nível de expressão de *PhEIL1* e *PhATG8a* nas flores inoculadas com *B. cinerea* em comparação com as flores inoculadas com água atuam como indícios da ativação da via do ET nas flores de petúnia desafiadas com *B. cinerea*. A ativação da via do ET também já foi demonstrada em folhas de petúnia (Wang *et al.*, 2013) e em outros hospedeiros (Cristescu *et al.*, 2002; Broekaert *et al.*, 2006) durante a interação com *B. cinerea*. Entretanto, essa análise de expressão não permite esclarecer

se a via do ET é induzida como uma resposta de defesa ou devido às possíveis modulações das vias hormonais exercidas por *B. cinerea* para promover doença. Nas flores de Picobella Rose inoculadas com *B. cinerea*, os genes *PhDEF1* e *PhDEF2* também apresentaram aumento de expressão em comparação com as flores inoculadas com água. Enquanto que nas flores de Picobella White inoculadas com *B. cinerea*, foi verificada uma redução da expressão de *PhDEF1* e um aumento de expressão de *PhDEF2* em comparação com as flores inoculadas com água. Apesar de as duas cultivares terem apresentado aumento de expressão de *PhDEF2*, nas flores de Picobella Rose esse aumento foi cerca de duas vezes maior em comparação com o aumento verificado nas flores de Picobella White (Figura 6).

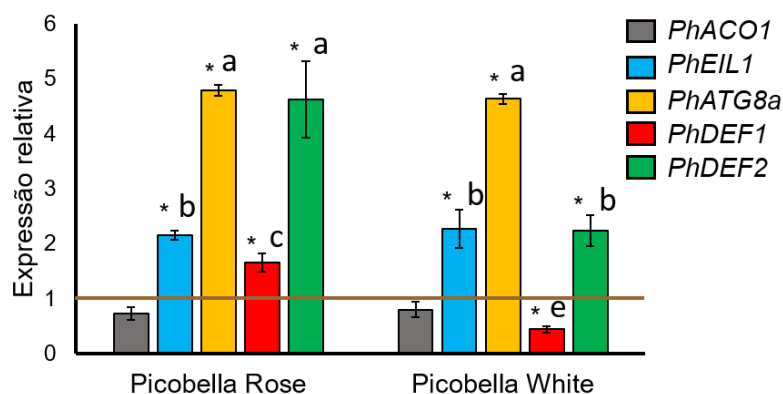


FIGURA 6. Expressão relativa dos genes *PhACO1*, *PhEIL1*, *PhATG8a*, *PhDEF1* e *PhDEF2* em pétalas de flores das cultivares Picobella White e Picobella Rose desafiadas com *B. cinerea* (48 hpi). Todos os valores de Cts foram normalizados pelos Cts do gene de referência *PhActin* (ΔC_t). Os valores de expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui nas flores inoculadas com *B. cinerea* em comparação com o calibrador (flor de cada cultivar inoculada com água) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), cujo valor de expressão relativa foi calibrado para 1,0 (traço marrom). Os valores são médias de três repetições biológicas. * Médias que diferiram significativamente do calibrador. As médias que diferiram significativamente do calibrador foram comparadas entre as cultivares. Essas médias receberam a mesma letra quando não diferiram pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Conforme mostrado na Figura 7B, as flores polinizadas de Picobella Rose apresentaram murcha da corola, um sinal característico da senescência, aos 4 dias depois da polinização (ddp). Dentre as flores polinizadas de Picobella White, algumas apresentaram murcha da corola aos 3 ddp enquanto outras aos 4 ddp (Figura 7C). Sendo assim, as flores polinizadas de Picobella White que apresentaram murcha da corola aos 3 ddp não foram submetidas a análise de expressão. Nas flores não polinizadas das duas cultivares, os primeiros sinais de senescência foram verificados aos nove dias depois da antese. No estudo de Shibuya *et al.* (2013), flores polinizadas da cultivar Mitchell Diploid apresentaram murcha da corola aos 2 ddp, sendo verificado um pico de síntese de ET, bem como um pico de expressão de *PhATG8a* nas pétalas dessas flores. Adicionalmente, os autores verificaram uma rápida redução no teor de ET aos 3 ddp e uma progressiva redução do nível de expressão de *PhATG8a* até os 4 ddp. Nas flores polinizadas de Picobella Rose e Picobella White, o pico de expressão de *PhATG8a* foi verificado aos 4 ddp, sendo acompanhado de um pico de expressão de *PhEIL1* (Figura 7A). Conforme já mencionado na presente etapa, o pico de expressão de *PhACO1* antecedeu em um dia (Picobella Rose) ou dois dias (Picobella White) o pico máximo de expressão de *PhEIL1* e de *PhATG8a*. Logo, nesse intervalo de tempo é possível que ET seja acumulado em um nível suficiente para induzir fortemente a expressão dos genes responsivos a esse hormônio. Em resumo, os genes *PhEIL1* e *PhATG8a* podem ser utilizados como genes marcadores do acúmulo de ET em flores de petúnia, o qual é verificado na senescência induzida por polinização e parece ocorrer na senescência induzida por *B. cinerea*. Na Figura 7A, também é possível verificar que a polinização induziu alterações de expressão dos genes responsivos ao ET

de maneira mais rápida e intensa nas flores de Picobella White em comparação com as flores de Picobella Rose, principalmente com relação ao gene *PhATG8a*. Entretanto, essa diferença entre cultivares não foi observada na senescência induzida por *B. cinerea*, tendo em vista que os níveis de expressão de *PhEIL1* e *PhATG8a* foram estatisticamente iguais entre Picobella Rose e Picobella White (Figura 6). De acordo com o que a literatura descreve para interações entre plantas e *B. cinerea* (El Oirdi *et al.*, 2011), bem como entre plantas e *S. sclerotiorum* (Kabbage *et al.*, 2013), um necrotrófico estreitamente relacionado com *B. cinerea* (Amselem *et al.*, 2011), pode ser hipotetizado que, essa diferença observada entre a senescência induzida por polinização e a senescência induzida por *B. cinerea* resulte de modulações exercidas pelo patógeno sobre a via da autofagia. Por essa razão, em resposta à infecção por *B. cinerea* as flores de Picobella White podem não induzir a expressão de *PhATG8a* com a mesma eficiência que é verificada em resposta a polinização. Contudo, apesar dessa possível modulação representar uma estratégia de patogênese em potencial, não justifica as diferenças observadas entre flores de Picobella Rose e Picobella White quanto a resistência à *B. cinerea*, uma vez que Picobella White foi a cultivar que apresentou o menor nível de colonização pelo patógeno. Por fim, a análise de expressão das defensinas florais indicou uma outra diferença entre a senescência induzida por polinização e a senescência induzida por *B. cinerea* nas flores das duas cultivares. Nas flores polinizadas de Picobella Rose, aos 2 e 3 ddp, foi verificado um aumento significativo das expressões de *PhDEF1* e *PhDEF2* em comparação com as flores não polinizadas. Contudo, aos 4 ddp, o único tempo de coleta no qual os aumentos de *PhEIL1* e *PhATG8a* foram significativos, os níveis de expressão de *PhDEF1* e *PhDEF2* não apresentaram

aumento, se igualando aos níveis de expressão verificados em flores não polinizadas (Figura 7A). Já nas flores de Picobella Rose inoculadas com *B. cinerea*, os aumentos significativos dos níveis de expressão de *PhEIL1* e *PhATG8a* foram acompanhados por aumentos significativos de *PhDEF1* e *PhDEF2* (Figura 6). Nas flores polinizadas de Picobella White, em nenhum momento *PhDEF1* e *PhDEF2* apresentaram aumentos significativos dos níveis de expressão, sendo que os picos máximos de expressão de *PEIL1* e *PhATG8a* foram acompanhados por reduções significativas nos níveis de expressão dos genes codificantes das defensinas (Figura 7A). Já nas flores de Picobella White inoculadas com *B. cinerea*, foi verificado um aumento do nível de expressão de *PhDEF2* em comparação com as flores inoculadas com água. Diferentemente de *PhDEF2*, porém de modo semelhante ao que foi verificado na senescência induzida por polinização, o nível de expressão de *PhDEF1* reduziu nas flores de Picobella White inoculadas com *B. cinerea* em comparação com as flores inoculadas com água (Figura 6).

Em resumo, as expressões dos genes *PhDEF1* e *PhDEF2* representaram as principais diferenças verificadas entre as flores de Picobella Rose e flores de Picobella White inoculadas com *B. cinerea*. Além disso, nas duas cultivares de petúnia, as expressões desses mesmos genes também representaram as principais diferenças observadas entre a senescência induzida por *B. cinerea* e a senescência induzida por polinização. Sendo assim, os genes codificantes das duas defensinas florais foram empregados nas etapas que compõem o silenciamento gênico induzido por vírus, permitindo a caracterização funcional desses genes em flores durante a interação entre petúnia e *B. cinerea*.

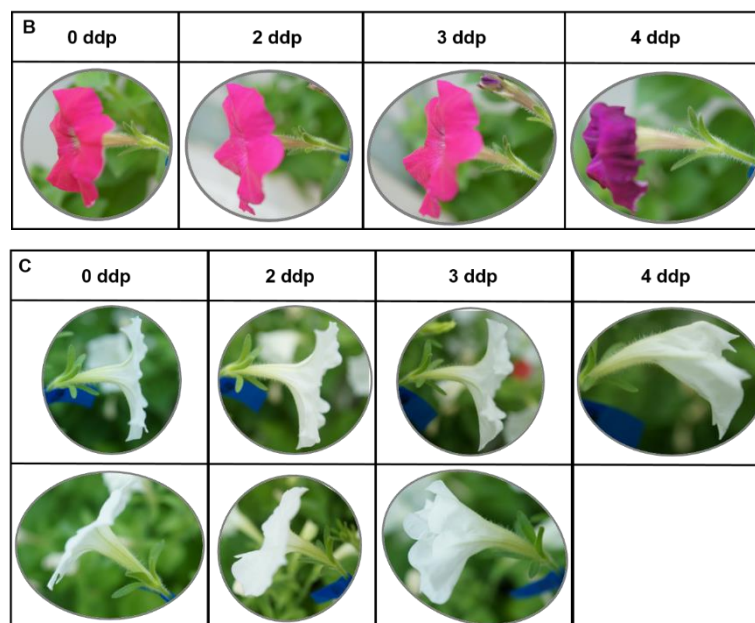
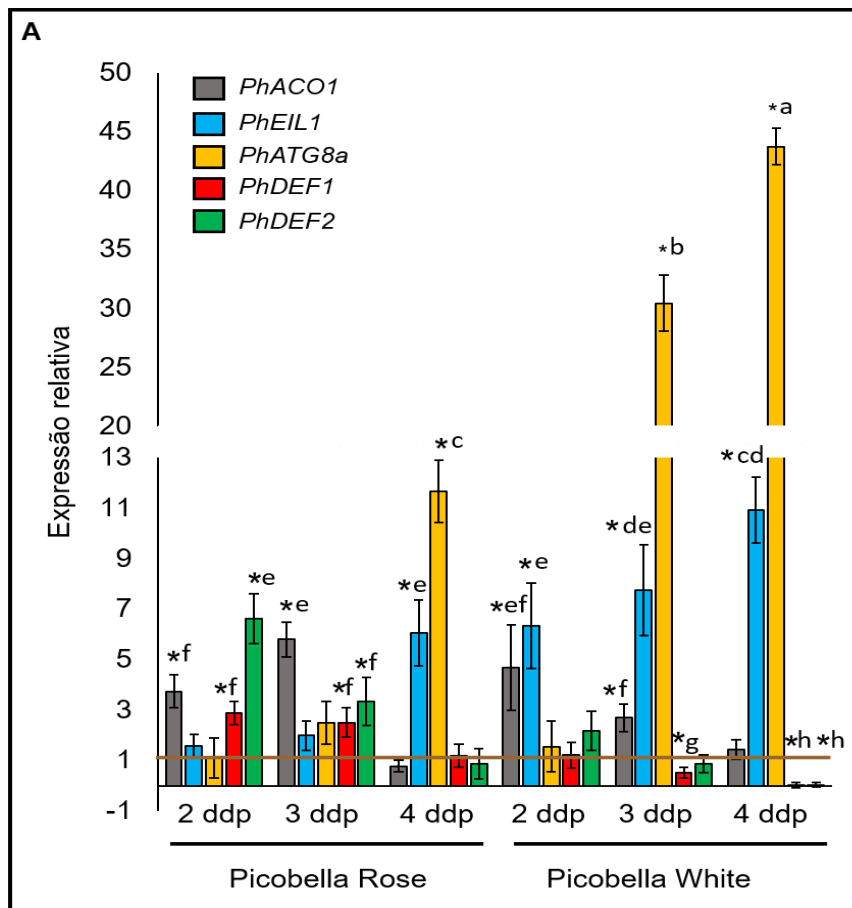


FIGURA 7. Avaliação da expressão gênica em pétalas de flores de Picobella Rose e Picobella White polinizadas. A - Expressão relativa dos genes *PhACO1*, *PhEIL1*, *PhATG8a*, *PhDEF1* e *PhDEF2* em flores coletadas aos 2, 3 e 4 dias depois da polinização (ddp). Todos os valores de Cts foram normalizados pelos Cts do gene de referência *PhActin* (ΔCt). Os valores de expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui nas flores polinizadas em comparação com o calibrador (flor de cada cultivar não

polinizada e com a mesma idade da flor polinizada) ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), cujo valor de expressão relativa foi calibrado para 1,0 (traço marrom). Os valores são médias de três repetições biológicas. * Médias que diferiram significativamente do calibrador pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As médias que diferiram significativamente do calibrador foram comparadas entre os tempos e entre cultivares. Essas médias receberam a mesma letra quando não diferiram pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). B – Evolução do fenótipo de senescência induzido por polinização em flores de Picobella Rose. C – Evolução do fenótipo de senescência induzido por polinização em flores de Picobella White. Nessa cultivar foi observado que algumas flores polinizadas apresentaram sinais claros de senescência aos 4 ddp (linha superior) e algumas flores aos 3 ddp (linha inferior).

4.4 Visualização de respostas de defesa em pétalas durante a interação entre petúnia e *B. cinerea*

No intuito de investigar as respostas de defesa que podem atuar em flores de Picobella White e que podem não ocorrer ou ocorrer com menor eficiência em flores de Picobella Rose, as pétalas de flores das duas cultivares foram submetidas a análises histopatológicas por meio de microscopia óptica e microscopia óptica de epifluorescência.

A síntese de compostos inibidores da germinação de esporos, como exemplo a escopoletina de tabaco (El Oirdi *et al.*, 2010), bem como modificações de parede celular são descritas na literatura como importantes mecanismos de resistência à *B. cinerea* (Curves *et al.*, 2010; Asselbergh *et al.*, 2007; Lloyd *et al.*, 2011). Por essa razão, a primeira análise de microscopia realizada com as pétalas de petúnia desafiadas com *B. cinerea* teve como objetivo a avaliação da germinação dos esporos e do desenvolvimento de hifas de *B. cinerea* em 48 hpi (Figura 8). A escolha do tempo 48 hpi para essa primeira análise foi baseada nos resultados obtidos no estudo de Dinh *et al.* (2011), no qual foi verificada uma crescente porcentagem de germinação de esporos de *B. cinerea* até 36 hpi em pétalas de *Chamelaucium* spp.. Portanto, o tempo 48 hpi foi selecionado dentre

os demais tempos de coleta utilizados no presente trabalho (12 e 24 hpi). Posteriormente, a fim de investigar possíveis modificações de parede celular em pétalas de petúnia desafiadas com *B. cinerea*, foi procedida a análise de microscopia de epifluorescência (Figuras 9-10), a qual será melhor descrita mais adiante.

A primeira análise de microscopia pareceu demonstrar que, em Picobella Rose, a maioria dos esporos observados haviam germinado, sendo verificadas hifas bem desenvolvidas (Figura 8A). Em Picobella White, o tubo germinativo não foi detectado em muitos esporos e as amostras avaliadas apresentavam um desenvolvimento de hifas reduzido em comparação com as amostras provenientes de Picobella Rose (Figura 8B).

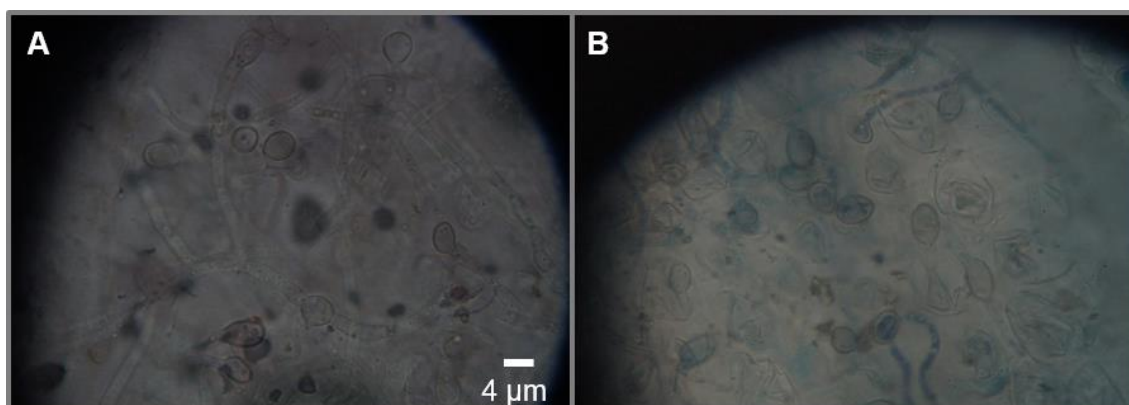


FIGURA 8. Microscopia óptica de pétalas de Picobella Rose (A) e Picobella White (B) inoculadas com 7 μL de uma solução de esporos de *B. cinerea* ($1 \cdot 10^6$ esporos mL^{-1} de água). As pétalas foram coletadas em 48 hpi e submetidas ao procedimento de coloração com azul de trypan. Todas as fotos foram feitas a partir de amostras analisadas com aumento 1000 vezes.

A análise seguinte de microscopia incluiu todos os tempos de coleta após a inoculação, uma vez que método adotado é estabelecido para a detecção, em folhas, tanto de estruturas de fungos fitopatogênicos quanto de compostos fenólicos nas células do hospedeiro (Wesp-Guterres *et al.*, 2013). Compostos

fenólicos, como exemplo a fitoalexina fenólica escopoletina (H. Sun *et al.*, 2014), são acumulados nos tecidos de plantas em resposta à infecção por diversos fungos (El Oirdi *et al.*, 2010; Cho & Lee, 2015; Hückelhoven, 2007; Oliver *et al.*, 2009). O papel dos compostos fenólicos na resistência pode ser devido a sua ação antifúngica, bem como devido ao seu envolvimento no fortalecimento da parede celular, tornando as células menos vulneráveis à ação de enzimas degradadoras de parede celular (Léon & Montesano, 2013; Underwood, 2012). Sob radiação UV, compostos fenólicos presentes em células de folhas emitem fluorescência na faixa de luz azul (450-500 nm) e na faixa de luz verde (500-530 nm) (Talamond *et al.*, 2015). O ácido pícrico tem a função de salientar a autofluorescência emitida por regiões celulares que apresentam depósitos de papilas e acúmulo de compostos fenólicos. Desse modo, o tratamento de tecidos com ácido pícrico e a subsequente avaliação em microscopia de epifluorescência otimizam a detecção de modificações celulares que são descritas em inúmeras interações entre plantas e patógenos (Wesp-Guterres *et al.*, 2013; Bender *et al.*, 2000). Torna-se importante esclarecer que, nesse caso, o termo papila se refere ao reforço de parede celular, sendo composta, em geral, por calose, compostos fenólicos, polissacarídeos e proteínas antimicrobianas (Léon & Montesano, 2013; Underwood, 2012). Sendo assim, a fim de investigar se Picobella Rose e Picobella White apresentam diferenças quanto às modificações recém descritas, suas pétalas desafiadas com *B. cinerea* foram empregadas no procedimento de detecção de regiões celulares autofluorescentes. Contudo, por meio desse método, não foi possível dar andamento às avaliações iniciadas na primeira análise de microscopia (Figura 8). O procedimento de coloração de estruturas do fungo com azul de trypan, em

conjunto com tratamento com ácido pícrico, deteriorou as pétalas de petúnia. Portanto, não foi possível quantificar as diferenças observadas entre Picobella Rose e Picobella White quanto ao número de eventos de germinação de esporos de *B. cinerea*. A única avaliação gerada por meio desse método está representada na Figura 10G, sendo possível verificar, na mesma região, hifas de *B. cinerea* e modificações da parede de células da pétala de Picobella White em 48 hpi. Por essa razão, as demais imagens apresentadas correspondem às pétalas submetidas a uma adaptação do protocolo, no qual a etapa de coloração com azul de trypan foi eliminada. Apesar disso, o referido protocolo adaptado de Wesp-Guterres *et al.* (2013) possibilitou a detecção de regiões celulares autofluorescentes e, conseqüentemente, de importantes diferenças entre Picobella Rose e Picobella White. Na Figura 9, nota-se que apenas em 48 hpi foi possível detectar uma fraca fluorescência na parede de células da epiderme adaxial da pétala de Picobella Rose (9D). Enquanto que, em pétalas de Picobella White, a partir de 12 hpi já foi possível detectar autofluorescência na parede de células da epiderme adaxial (10B). Em 24 hpi (10C e E) e em 48 hpi (10D e F), a autofluorescência se tornou mais intensa e foi detectada nas paredes de um número maior de células em comparação com 12 hpi. Nas pétalas não inoculadas com *B. cinerea* não foi possível detectar autofluorescência (Figuras 9A e 10A). Além disso, as paredes celulares autofluorescentes foram detectadas apenas na área da lesão causada por *B. cinerea*, não sendo detectada autofluorescência fora da área da lesão. Na Figura 10F, a seta indica a ausência de autofluorescência em um espaço intercelular na pétala de Picobella White em 48 hpi. Sendo assim, os resultados indicam que o acúmulo de

compostos fenólicos é restrito à parede celular e, possivelmente, representa uma resposta de defesa de petúnia à *B. cinerea*.

O mutante de tomate *sitiens*, o qual é deficiente na produção de ácido abscísico, é considerado resistente à *B. cinerea*. Em folhas de *sitiens*, compostos fenólicos autofluorescentes atuam na fortificação da parede celular da epiderme, limitando a colonização por *B. cinerea* (Seifi *et al.*, 2013; Asselbergh *et al.*, 2007). Em folhas de *A. thaliana*, modificações de parede celular da epiderme envolvendo o acúmulo de compostos fenólicos autofluorescentes também foram relacionadas com a resistência à *B. cinerea* (Lloyd *et al.*, 2011). Diante do exposto, é possível que a epiderme de pétalas de petúnia apresente uma resposta de defesa semelhante ao que se verifica na epiderme de folhas de tomate e de *A. thaliana* em interação com *B. cinerea*. Os resultados obtidos por meio da microscopia de epifluorescência parecem indicar um mecanismo de resistência que justifique o menor nível de colonização das pétalas de Picobella White por *B. cinerea*, tendo em vista a detecção mais intensa e precoce de autofluorescência na parede celular da epiderme de pétalas de Picobella White em comparação com Picobella Rose.

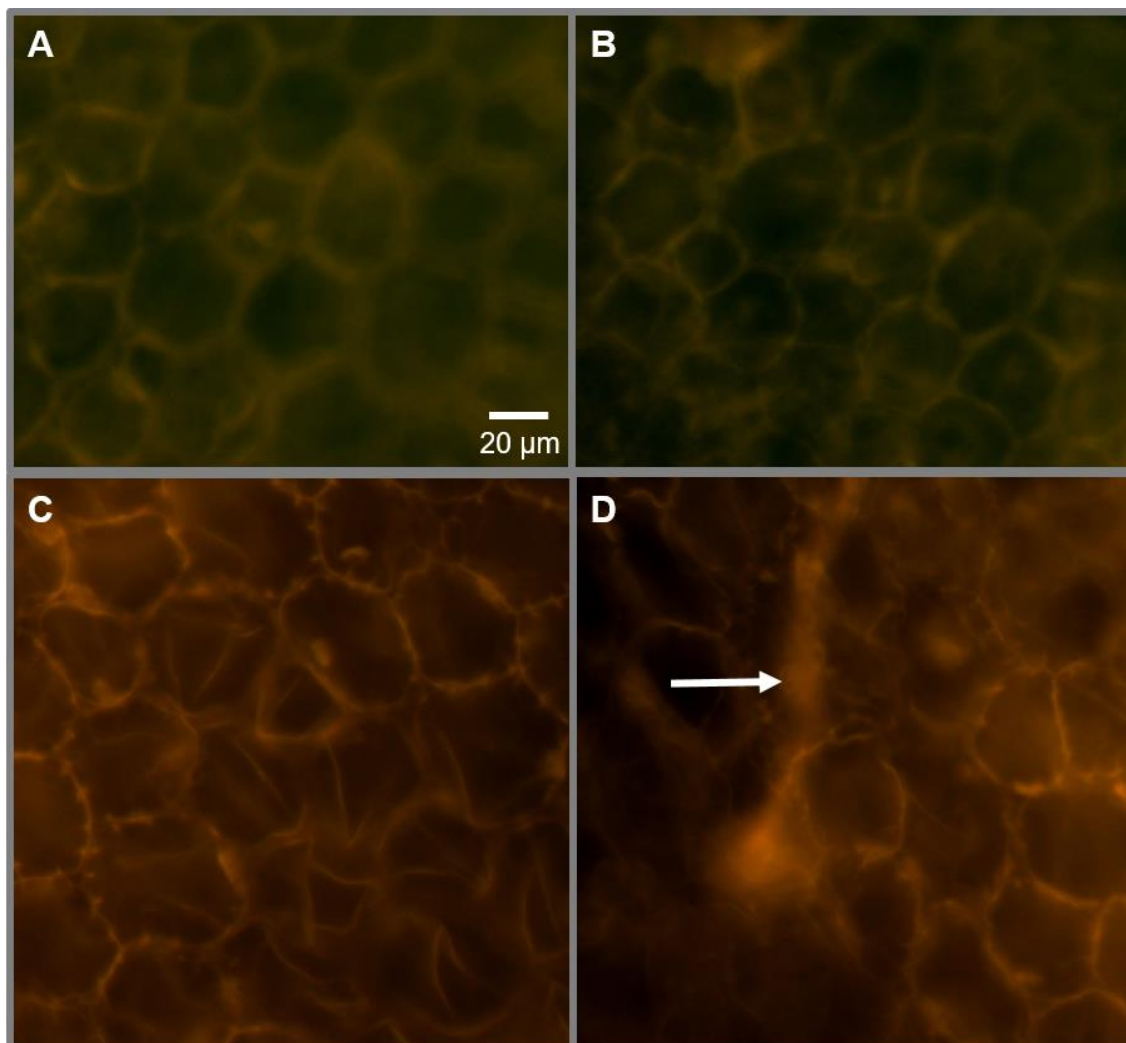


FIGURA 9. Microscopia óptica de epifluorescência da epiderme adaxial de pétalas de Picobella Rose tratadas com ácido pícrico após a inoculação com *B. cinerea*. A – Pétala não inoculada. B – Área com lesão de *B. cinerea*, pétala coletada em 12 hpi. C – Área com lesão de *B. cinerea*, pétala coletada em 24 hpi. D – Área com lesão de *B. cinerea*, pétala coletada em 48 hpi. A seta indica a presença de uma hifa de *B. cinerea*. As diferenças de coloração observadas entre as imagens, provavelmente, se devem à evolução da lesão causada por *B. cinerea*, conferindo um tom amarronzado às regiões apresentadas em C e D. Todas as fotos foram feitas a partir de amostras analisadas com aumento 400 vezes.

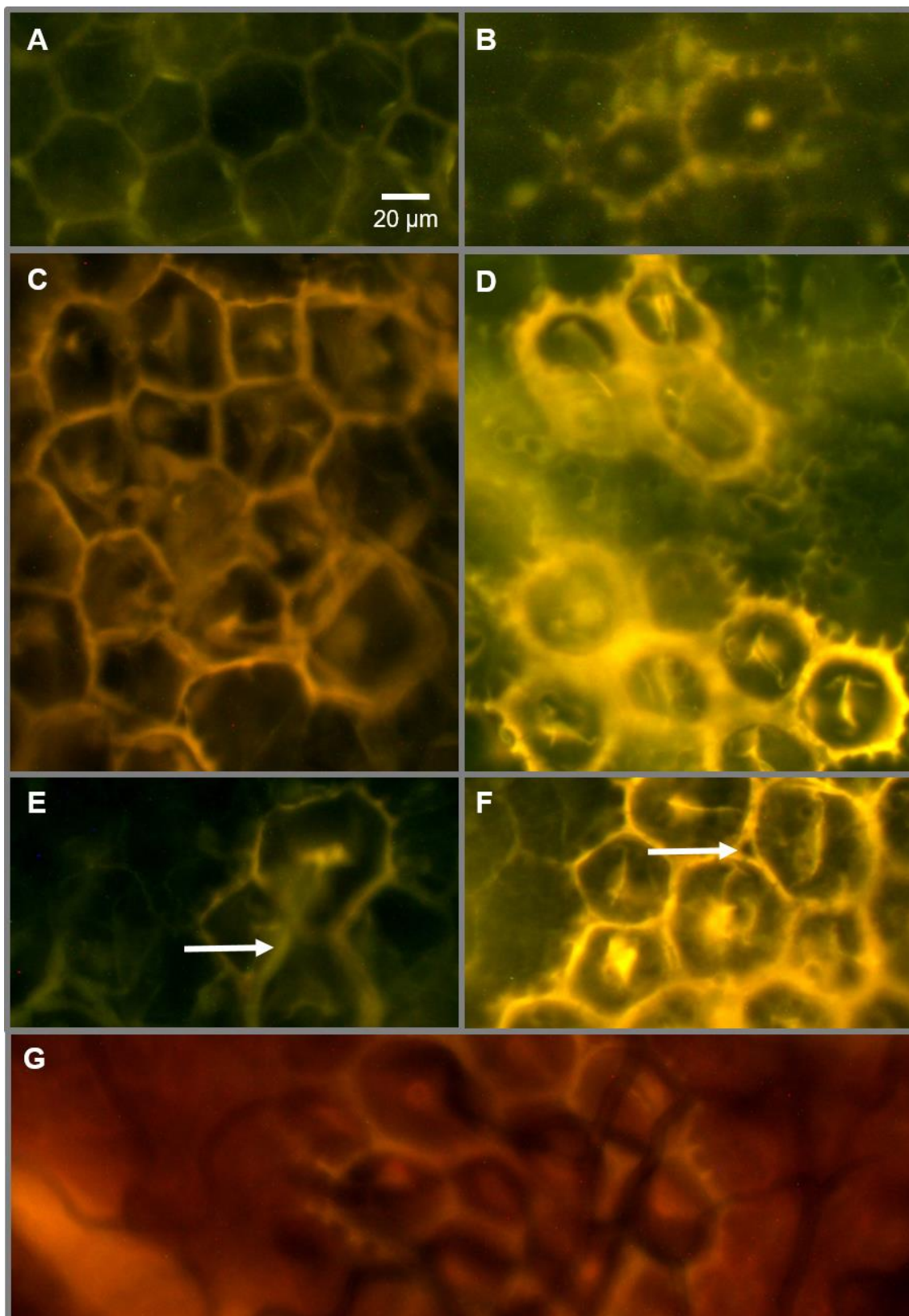


FIGURA 10. Microscopia óptica de epifluorescência da epiderme adaxial de pétalas de Picobella White tratadas com ácido pícrico após a inoculação com *B. cinerea*. A – Pétala não inoculada. B – Detecção de autofluorescência em área com lesão de *B. cinerea*, pétala coletada em 12 hpi. C – Detecção de autofluorescência em área com lesão de *B. cinerea*, pétala coletada em 24 hpi. D –

Detecção de autofluorescência em área com lesão de *B. cinerea*, pétala coletada em 48 hpi. E – A seta indica a presença de hifa de *B. cinerea* em área com lesão, pétala coletada em 24 hpi. F – A seta indica um espaço intercelular, onde não se verifica autofluorescência, pétala coletada em 48 hpi. G – Detecção de autofluorescência em área com lesão de *B. cinerea*, pétala coletada em 48 hpi. Essa pétala foi tratada com ácido pícrico e azul de trypan dissolvido em lactofenol:etanol. Todas as fotos foram feitas a partir de amostras analisadas com aumento 400 vezes.

O estabelecimento de ligações entre a parede celular e compostos fenólicos da via dos fenilpropanoides foi observado em diversas plantas em resposta a patógenos (Dixon *et al.*, 2002; Hüchelhoven, 2007; McLusky *et al.*, 1999; Muroi *et al.*, 2009). Os flavonoides, são exemplos de fenilpropanoides que já foram descritos em associações com a parede celular (Treutter, 2006; Petrucca *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 1996; Clarke & Robinson, 2008; Markham *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2012). Os flavonóis e as antocianinas são compostos fenólicos que pertencem ao grupo dos flavonoides. As antocianinas são responsáveis pela pigmentação de flores de petúnia e se localizam principalmente nos vacúolos de células da epiderme de pétalas (Lysenko & Varduny, 2013). No estudo de Luo *et al.* (2016), foi verificado que a via de síntese de antocianinas e a via de síntese de flavonóis competem pelo mesmo substrato em flores de petúnia e em flores de outras espécies. Essa competição é o que determina a formação de flores vermelhas ou de flores brancas. Os substratos dihidrokaempferol e dihidroquercetina podem sofrer ação da flavonol sintase (FLS) para formar flavonóis ou podem ser catalisados pela dihidroflavonol-4-reductase (DFR) para formar antocianinas. Os autores do referido estudo verificaram que pétalas brancas de petúnia, as quais possuem um teor de antocianinas praticamente indetectável, apresentaram um nível de expressão de

PhFLS cerca de 20 vezes maior em comparação com pétalas vermelhas. Além disso, o nível de expressão de *PhFDR* foi extremamente baixo nas pétalas brancas, sendo cerca de 3 vezes menor em comparação com pétalas vermelhas. Adicionalmente, a superexpressão de *PhFLS* em tabaco reprimiu a expressão do gene endógeno *NtFDR*. Como era esperado, a superexpressão de *PhFDR* em tabaco reprimiu a expressão de *NtFLS*. Desse modo, foi possível demonstrar o antagonismo mútuo entre os genes *FLS* e *FDR*. Diante das constatações feitas por Luo *et al.* (2016), as quais demonstraram a competição entre *PhFLS* e *PhFDR* pelo mesmo substrato fenólico, bem como a repressão da expressão de *PhFLS* em pétalas produtoras de antocianinas, pode ser estabelecida a hipótese a seguir. Em interação com *B. cinerea*, Picobella White pode ser capaz de direcionar o acúmulo de flavonoides na parede celular das pétalas de maneira mais rápida e intensa em comparação com Picobella Rose, cujas pétalas são produtoras de antocianinas. Entretanto, a confirmação dessa hipótese requer a identificação dos compostos fenólicos acumulados em Picobella White, tendo em vista que, além dos flavonoides, outros grupos de fenilpropanoides podem ser responsáveis pela autofluorescência verificada em Picobella White. Em células da epiderme do bulbo de cebola, por exemplo, foi verificado o acúmulo de fenilpropanoides do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, os quais são sintetizados por um ramo diferente do ramo dos flavonoides. Em resposta a infecção por *Botrytis allii*, amidas derivadas de ácido hidroxicinâmico foram detectadas na parede celular da epiderme de cebola por meio da emissão de autofluorescência (McLusky *et al.*, 1999). Adicionalmente, acredita-se que a principal função de fitoalexinas do grupo das amidas derivadas de ácido hidroxicinâmico consista no reforço de parede celulares, prevenindo a invasão dos tecidos do hospedeiro por

patógenos (Guillet & de Luca, 2005). Sendo assim, estudos adicionais e específicos da via dos fenilpropanoides serão necessários para determinar a contribuição de determinados compostos fenólicos na limitação da proliferação de *B. cinerea* em pétalas de Picobella White. Evidências genéticas do papel dos fenilpropanoides de parede celular na defesa de plantas a patógenos são raras, possivelmente devido a redundância das enzimas envolvidas. Por essa razão, a criação de drenos metabólicos de compostos fenólicos pode auxiliar no entendimento do papel dos fenilpropanoides nas interações entre plantas e patógenos (Hückelhoven, 2007). Logo, flores de Picobella Rose e Picobella White podem representar modelos para esses estudos da via dos fenilpropanoides, tendo em vista que a síntese de antocianinas pode atuar como um dreno de compostos fenólicos.

4.5 Silenciamento dos genes *PhCHSj*, *PhPDS*, *PhDEF1* e *PhDEF2*

O silenciamento gênico induzido pelo vetor baseado no TRV foi uma estratégia otimizada no presente trabalho. Genes que conferem fenótipos de fácil detecção quando silenciados foram os primeiros a serem empregados nessas metodologias, permitindo avaliar a eficiência dos procedimentos adotados para caracterizar a função de genes de petúnia. Tanto o gene *PhCHSj* quanto o gene *PhPDS* foram utilizados para o estabelecimento das etapas e condições experimentais necessárias para o desenvolvimento do método VIGS em petúnia. *PhCHSj* atua na via de síntese de antocianinas e *PhPDS* atua na via de síntese de carotenoides e, portanto, conferem um fenótipo facilmente distinguível às plantas silenciadas. O silenciamento do gene *PhCHSj* pode ser detectado através da visualização de setores sem pigmento nas flores. Enquanto que o

silenciamento do gene *PhPDS* pode ser verificado devido ao fotobranqueamento nas folhas. As clonagens de porções gênicas a partir do cDNA de petúnia resultaram na obtenção de insertos de 266 pb para *PhCHSj*, 424 pb para *PhPDS*, 304 pb para *PhDEF1* e 167 pb para *PhDEF2*. Esses fragmentos foram, separadamente, inseridos no vetor viral pTRV2b, originando as construções de silenciamento TRV2b-*PhCHSj*, pTRV2b-*PhPDS*, TRV2b-*PhDEF1* e TRV2b-*PhDEF2* (Figura 11).

A agroinfiltração, procedida nas folhas de petúnia, resultou no fotobranqueamento nas plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhPDS* e na formação de flores com setores sem pigmento nas plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj*. Aos 19 dias após a agroinfiltração (dpa), foi verificada a formação da primeira flor com sintomas do silenciamento (Figura 12A). Já os primeiros sintomas de fotobranqueamento foram verificados entre 10 e 14 dpa, permanecendo até a fase reprodutiva. Em todos os experimentos desenvolvidos nesse trabalho, todas as plantas agroinfiltradas com os inóculos pTRV1+pTRV2b-*PhPDS* ou pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj* apresentaram o fenótipo correspondente. Esses resultados conferem ao método uma eficiência de 100%.

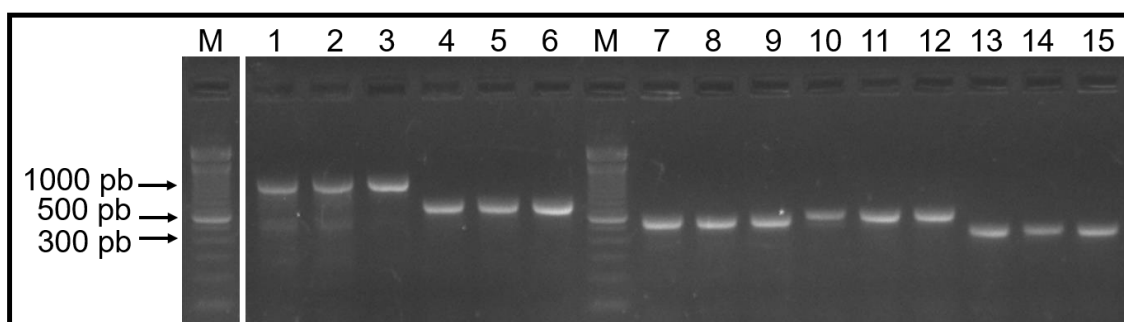


FIGURA 11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR das colônias de *A. tumefaciens* transformadas com os plasmídeos TRV2b-*GFP* (1-3), TRV2b-*PhPDS* (4-6), TRV2b-*PhCHSj* (7-9), TRV2b-*PhDEF1* (10-12) e TRV2b-*PhDEF2* (13-15). A PCR foi realizada com os

oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R, resultando na verificação de 254 pb adicionais ao tamanho do inserto. M – Marcador de massa molecular 100 pb.



FIGURA 12. Fenótipos de silenciamento aos 19 dpa. A - Comparação entre a flor de uma planta agroinfiltrada com o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj* (setores sem pigmento) e a flor de uma planta agroinfiltrada com o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-*GFP*). B - Comparação entre plantas de petúnia agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhPDS* (fotobranqueamento) e plantas agroinfiltradas com o inóculo controle.

Aos 19 dpa, as folhas jovens das plantas agroinfiltradas com o inóculo controle ou com o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhPDS* (apresentando fotobranqueamento) (Figura 12B), foram coletadas para a quantificação do acúmulo de mRNA do gene *PhPDS*. Do mesmo modo, as flores apresentando sintomas de silenciamento do gene *PhCHSj* e as flores das plantas agroinfiltradas com o inóculo controle também foram coletadas para a quantificação do acúmulo de mRNA desse gene. Essas quantificações de transcritos dos genes alvo do silenciamento, realizadas por qRT-PCR,

permitiram quantificar o nível de silenciamento obtido. Sendo assim, pelo menos um dos oligonucleotídeos iniciadores de cada par foi desenhado para hibridizar externamente à sequência clonada no vetor TRV2b, impedindo a quantificação de transcritos virais e a consequente subestimativa do nível de silenciamento. Nas flores de plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj*, o acúmulo de mRNA do *PhCHSj* foi reduzido em mais de 50% em comparação com as flores de plantas controle não silenciadas (Figura 13A). Nas plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhPDS*, o acúmulo de mRNA do *PhPDS* foi reduzido em mais de 80% em comparação com as plantas controle não silenciadas (Figura 13B). O nível de redução do acúmulo de mRNA de um gene alvo do VIGS tende a ser variável entre as plantas silenciadas (Bhattarai *et al.*, 2007). Adicionalmente, nota-se que o fenótipo de silenciamento também é variável entre as flores ou folhas de uma mesma planta silenciada. Por essa razão, as quantificações desses acúmulos foram sempre feitas a partir de uma única flor ou folha de plantas individualizadas.

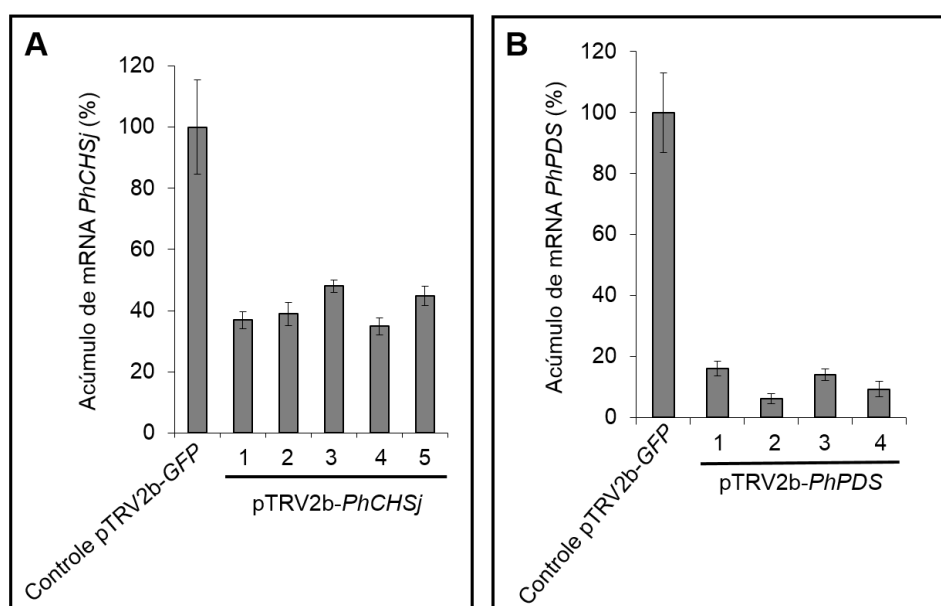


FIGURA 13. Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA dos genes *PhCHSj* e *PhPDS* aos 19 dpa. A – Os valores de 1-5

correspondem às flores de plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj*. B – Os valores de 1-4 correspondem às plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhPDS*. Esses valores representam a redução do acúmulo de mRNA de *PhCHSj*, em A, e *PhPDS*, em B, em relação ao acúmulo verificado nas plantas que receberam o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-*GFP*) (calibrador). Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. Para os calibradores estão representados a média e o desvio padrão de cinco repetições biológicas. Para as plantas de 1-5 (A) e de 1-4 (B) estão representadas as quantificações em plantas individualizadas e o desvio padrão de três repetições técnicas. As plantas de 1-5 (A) e de 1-4 (B) diferiram de seus respectivos calibradores pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Aos 30 dpa, os sintomas de silenciamento nas flores das plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj* se intensificaram, permanecendo apenas pequenos setores com pigmento em algumas flores das cultivares Bravo e Hurrah (Figura 14A-B). Até o presente, os resultados apresentados nos experimentos de silenciamento do gene *PhCHSj* correspondem às plantas agroinfiltradas aos três meses após a semeadura, quando já se encontravam no estágio de floração. No entanto, os sintomas de silenciamento do gene *PhCHSj* também foram avaliados em plantas agroinfiltradas aos dois meses após a semeadura (Figura 14C). Na Figura 14, é possível verificar que foram alcançados maiores níveis de silenciamento nas flores de plantas agroinfiltradas aos três meses após a semeadura. Essa eficiente indução do silenciamento em flores de plantas agroinfiltradas somente no estágio de floração minimiza as interferências dessa manipulação gênica em outros processos da planta, tendo em vista que o silenciamento não é induzido ao longo de todo o seu desenvolvimento.

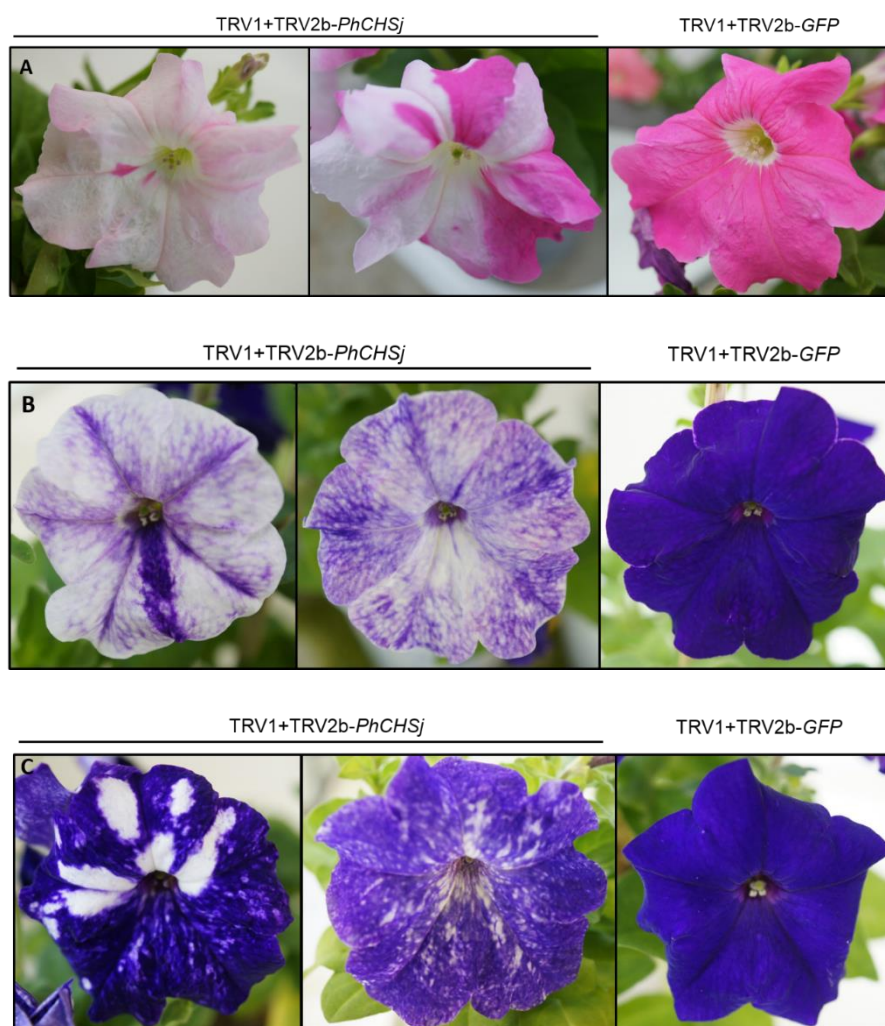


FIGURA 14. Fenótipos de silenciamento do gene *PhCHSj* aos 30 dpa. A – Comparação dos níveis de silenciamento entre flores da cultivar Bravo, cujas folhas foram agroinfiltradas aos três meses após a semeadura com o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj* ou com o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-*GFP*). B – Comparação dos níveis de silenciamento entre flores da cultivar Hurrah, cujas folhas foram agroinfiltradas aos três meses após a semeadura com o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj* ou com o inóculo controle. C – Comparação dos níveis de silenciamento entre flores da cultivar Hurrah, cujas folhas foram agroinfiltradas aos dois meses após a semeadura com o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhCHSj* ou com o inóculo controle.

4.5.1 Caracterização funcional das defensinas florais de petúnia (*PhDEF1* e *PhDEF2*)

Em conjunto, os resultados obtidos na etapa anterior permitiram estabelecer condições ótimas para os experimentos de silenciamento dos genes

que codificam as defensinas florais (*PhDEF1* e *PhDEF2*). Essas condições incluem a agroinfiltração aos três meses após a semeadura, bem como o desafio das flores com *B. cinerea* a partir dos 30 dpa, quando os níveis de silenciamento em flores já são bastante elevados. Sendo assim, as plantas agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1*, pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2* ou pTRV1+pTRV2b-*GFP* tiveram suas flores inoculadas com *B. cinerea* aos 39 dpa. As flores foram inoculadas com solução de esporos em vários pontos da corola, uma vez que o nível de silenciamento pode variar entre diferentes regiões de uma mesma flor. Na Figura 15A-B, nota-se que tanto em Picobella Rose (empregada no silenciamento de *PhDEF2*) quanto em Picobella White (empregada no silenciamento de *PhDEF1*) as flores silenciadas apresentaram lesões bastante restritas em comparação com as flores não silenciadas. Diante desses resultados, as flores apresentadas na Figura 15 foram submetidas a quantificação de acúmulo de mRNA de *PhDEF1* ou *PhDEF2* por qRT-PCR (Figura 15C). Nas flores de plantas de Picobella Rose que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2*, foi verificada uma redução mínima de cerca de 85% no acúmulo de mRNA de *PhDEF2*. Nas flores de plantas de Picobella White que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1*, foi verificada uma redução mínima de cerca de 92% no acúmulo de mRNA de *PhDEF1*.

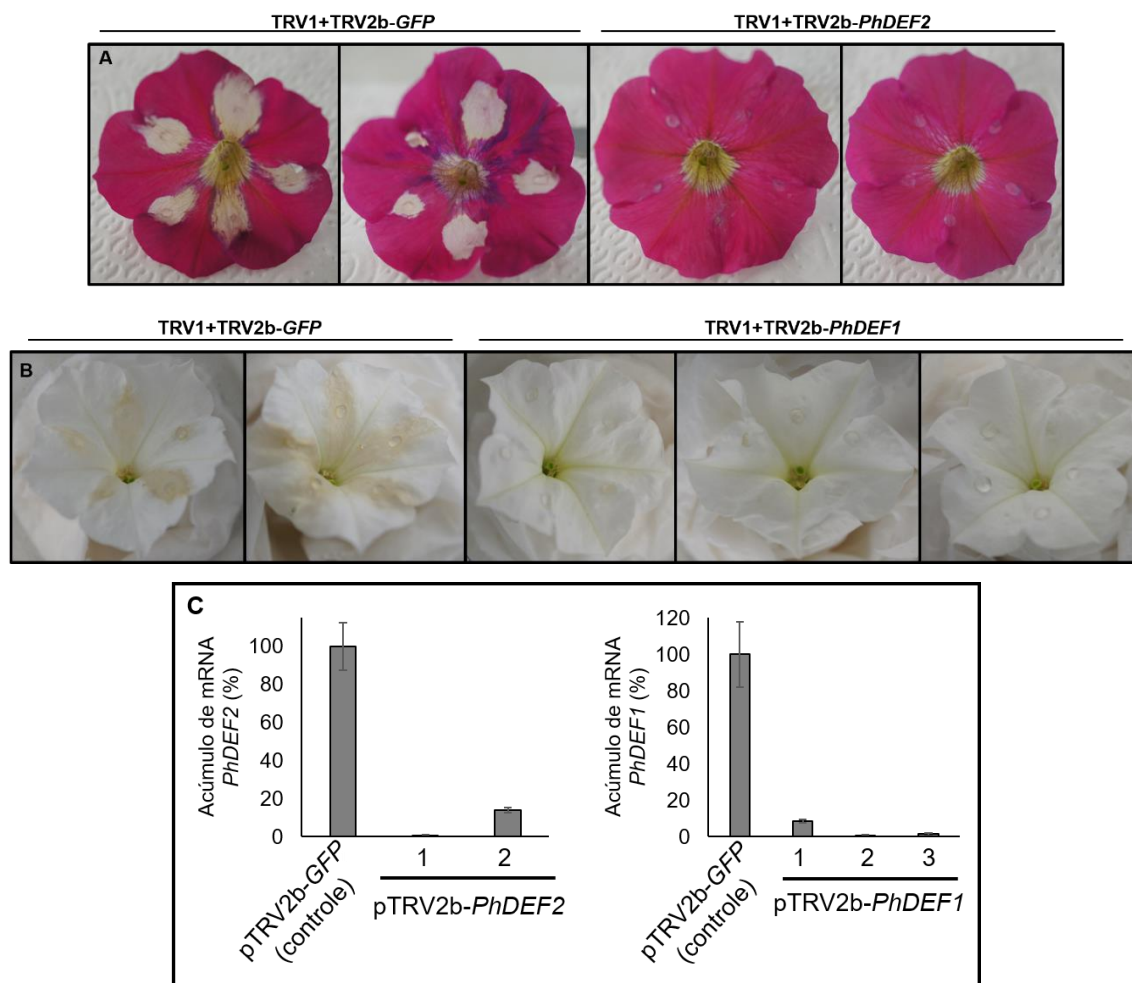


FIGURA 15. Inoculação de *B. cinerea* em flores destacadas de plantas agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1*, pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2* (inóculos de silenciamento) ou pTRV1+pTRV2b-*GFP* (inóculo controle). As plantas foram agroinfiltradas aos três meses após a sementeira, sendo as flores desafiadas com *B. cinerea* aos 39 dpa. A – Comparação das lesões causadas por *B. cinerea* entre flores silenciadas e não silenciadas da cultivar Picobella Rose em 24 hpi. B – Comparação das lesões causadas por *B. cinerea* entre flores silenciadas e não silenciadas da cultivar Picobella White em 24 hpi. C – Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA do gene *PhDEF2* em flores de Picobella Rose e do gene *PhDEF1* em flores de Picobella White. No gráfico da esquerda, os valores de 1-2 correspondem às flores das plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2*. No gráfico da direita, os valores de 1-3 correspondem às flores das plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1*. Esses valores representam a redução no acúmulo de mRNA de *PhDEF2* ou *PhDEF1* em relação ao acúmulo verificado nas flores de plantas que receberam o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-*GFP*) (calibrador). Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. Para os calibradores estão representados a média e o desvio padrão de três repetições biológicas. Para as demais plantas estão

representadas as quantificações em plantas individualizadas e o desvio padrão de três repetições técnicas. Todas as plantas que receberam o inóculo de silenciamento diferiram de seus respectivos calibradores pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Após a confirmação do silenciamento dos genes codificantes das defensinas, foi procedida a análise de estimativa do crescimento ativo de *B. cinerea* em todas as flores. Para tanto, uma pétala de cada flor foi coletada e empregada na quantificação de *BcActin* por meio de qRT-PCR (Figura 16). Desse modo, em Picobella Rose, foi verificada uma redução de cerca de 35 vezes da quantidade de biomassa de *B. cinerea* nas flores silenciadas (flores de plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2*) em comparação com as flores não silenciadas (flores de plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*GFP*). Em Picobella White, foi verificada uma redução de cerca de 31 vezes da quantidade de biomassa de *B. cinerea* nas flores silenciadas (flores de plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1*) em comparação com as flores não silenciadas (flores de plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*GFP*).

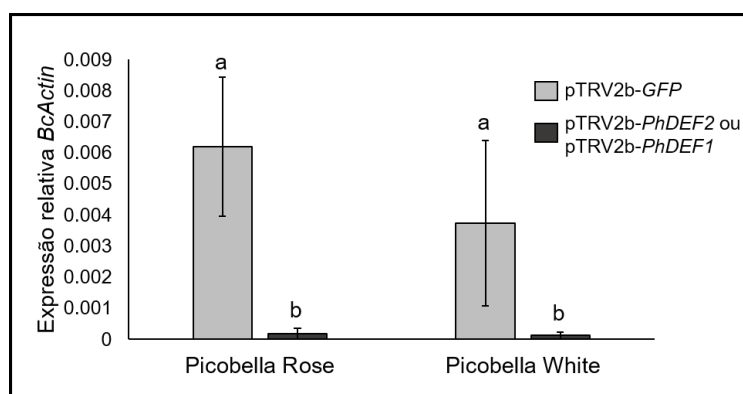


FIGURA 16. Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA de *BcActin* nas flores não silenciadas de Picobella Rose e Picobella White (pTRV1+pTRV2b-*GFP*), nas flores silenciadas de Picobella Rose (pTRV1+pTRV2b-*PhDEF2*) e nas flores silenciadas de Picobella

White (pTRV1+pTRV2b-*PhDEF1*) inoculadas com *B. cinerea* (24 hpi). Os valores representam as médias da expressão relativa de *BcActin* normalizado pelo gene de referência *PhActin* ($2^{-\Delta Ct}$) nas flores de petúnia. Para as flores não silenciadas de Picobella Rose estão representados a média e o desvio padrão de três repetições biológicas e para as flores silenciadas duas repetições biológicas. Para as flores não silenciadas ou silenciadas de Picobella White estão representados a média e o desvio padrão de três repetições biológicas.

Por meio de comparações entre as Figuras 2 e 15 e também entre os gráficos das Figuras 3 e 16, nota-se que as flores de plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*GFP* apresentaram maior nível de colonização por *B. cinerea* em comparação com as flores das plantas que não foram infiltradas com vetores virais. A ativação da via do SA já foi verificada em inúmeras interações entre plantas e vírus, sendo considerada uma importante resposta de defesa das plantas a esses patógenos (Fu & Dong, 2013). Entretanto, quando a via do SA é ativada previamente a ativação da via JA/ET, o SA tem efeito antagônico sobre a via do JA, a qual atua na defesa de plantas a necrotróficos, incluindo *B. cinerea* (Pieterse *et al.*, 2012; Tsuda *et al.*, 2009). Além disso, Conti *et al.* (2012) verificaram que plantas transgênicas de tabaco expressando simultaneamente a proteína do capsídeo e a proteína do movimento de *Tobacco mosaic virus* (TMV) apresentaram um elevado teor de SA, uma drástica redução de JA e uma maior suscetibilidade ao necrotrófico *S. sclerotiorum* em comparação com as plantas não transgênicas. Adicionalmente, El Oirdi *et al.* (2011) demonstraram que *B. cinerea* pode explorar o antagonismo hormonal entre SA e JA como estratégia de patogênese. Diante do exposto, é provável que as plantas não infiltradas com vetores virais ativem a via do JA com maior eficiência do que as plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*GFP*, tornando as flores dessas últimas plantas mais suscetíveis à *B. cinerea*. Essa maior suscetibilidade das flores foi

verificada principalmente na cultivar Picobella White, tendo em vista que a medida de biomassa de *B. cinerea* foi cerca de 7 vezes maior nas flores das plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*GFP* em comparação com as flores das plantas não infiltradas com vetores virais (24 hpi). As flores das plantas de Picobella Rose que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-*GFP* também apresentaram maior suscetibilidade à *B. cinerea*, porém a medida de biomassa de *B. cinerea* foi somente cerca de 2 vezes maior nessas flores em comparação com as flores das plantas não infiltradas com vetores virais (24 hpi). Logo, parece que a repressão da via JA, que possivelmente resulta da infiltração das plantas com vetores virais, afeta as respostas de defesa de Picobella White em um maior nível do que afeta as respostas de defesa de Picobella Rose.

Análises *in vitro* demonstraram que PhDEF1 e PhDEF2 inibem o crescimento de *B. cinerea* e, de maneira ainda mais eficaz, inibem o crescimento de *F. oxysporum* (Lay *et al.*, 2003). A ação antimicrobiana de defensinas de plantas contra uma ampla gama de patógenos pode envolver a desestabilização de membranas e a inibição de proteínas dos patógenos. Apesar das defensinas comumente possuírem funções bem caracterizadas *in vitro*, a sua interação com alvos do patógeno e com componentes celulares das plantas é pouco conhecida. As defensinas de petúnia possuem um domínio pró-peptídeo C-terminal (domínio CTPP), o qual tem a função de endereçar as defensinas para o vacúolo e, simultaneamente, impedir os efeitos tóxicos das defensinas no citoplasma durante esse endereçamento. Uma vez no vacúolo, o domínio CTPP é clivado por proteases vacuolares específicas, dando origem às formas ativas das defensinas. Em plantas de banana, a superexpressão de *PhDEF1* ou *PhDEF2* sem o domínio CTPP revelou o efeito letal dessas defensinas modificadas, as

quais se acumularam no citoplasma. Os brotos de banana transformados que foram recuperados apresentaram desenvolvimento bastante reduzido e não foram capazes de produzir sistema radicular. Esses resultados demonstraram que, além da ação antimicrobiana e do efeito fitotóxico, as defensinas também parecem atuar como moléculas sinalizadoras (Ghag *et al.*, 2013). Outro exemplo de defensina que parece atuar como um sinalizador de processos celulares é uma quitinase da solanácea *Capsicum annuum* (pimentão). Essa quitinase pertence a classe IV (CaChitIV) e, diferentemente das quitinases da classe I, é secretada para o apoplasto. A defensina CaChitIV parece atuar como um sinalizador da morte celular mediante a interação com o receptor CaPIK1 (*receptor-like cytoplasmic protein kinase*). Essa interação demonstrou ter um importante papel na resistência de pimentão à bactéria biotrófica *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* avirulenta, bem como na defesa a uma linhagem virulenta dessa bactéria. Portanto, é provável que CaChitIV atue como um regulador positivo tanto da resposta de hipersensibilidade quanto da defesa basal, ambas mediadas por CaPIK1 (Kim *et al.*, 2015). Sendo assim, o exemplo dessa quitinase torna evidente que a função de molécula sinalizadora de algumas defensinas pode ter maior importância do que a ação direta das defensinas como compostos antimicrobianos, tendo em vista que a ação direta enzimática de CaChitIV não teria qualquer efeito contra bactérias, as quais não possuem quitina na composição da parede celular. Assim como CaChitIV, porém diferentemente de PhDEF1 e PhDEF2, a maioria das defensinas são endereçadas para o espaço extracelular, atuando sobre as estruturas dos patógenos que se desenvolvem intercelularmente nos tecidos das plantas (Stotz *et al.*, 2009). Enquanto que as defensinas acumuladas nos vacúolos só serão

expostas aos patógenos mediante a ruptura do tonoplasto, sendo que essa ruptura é verificada em células lesionadas por patógenos (Laluk & Mengiste, 2010; van Loon *et al.*, 2006). Em face do exposto, é provável que as defensinas vacuolares de petúnia sejam liberadas como uma consequência da colonização intracelular. Uma vez liberadas do vacúolo, essas defensinas poderão exercer a ação antimicrobiana e/ou atuar como moléculas sinalizadoras.

O fungo *B. cinerea* coloniza os tecidos das plantas via intercelular (início da infecção) e intracelular (Asselbergh *et al.*, 2007; Caires *et al.*, 2014), sendo capaz de penetrar tecidos intactos devido a síntese de diversas enzimas que atuam na degradação da parede celular e na lise celular (Amselem *et al.*, 2011; van Kan, 2006; Choquer *et al.*, 2007; B. Li *et al.*, 2012). Diante do exposto, é provável que nas células danificadas por *B. cinerea* ocorra a liberação das defensinas do interior do vacúolo para o citoplasma, podendo também serem liberadas para o meio extracelular mediante o colapso dessas células. Apesar da ação antimicrobiana que essas defensinas possam exercer sobre *B. cinerea* durante a interação com petúnia, é possível que o efeito fitotóxico de PhDEF1 e PhDEF2 beneficie a colonização dos tecidos por esse patógeno necrotrófico. Por essa razão, as flores de petúnia contendo *PhDEF1* ou *PhDEF2* silenciado apresentariam menor nível de colonização por *B. cinerea* em comparação com as flores expressando as duas defensinas. Entretanto, o estudo de Ghag *et al.* (2012) demonstrou que plantas de banana transformadas com uma construção de superexpressão de *PhDEF1* ou com uma construção de superexpressão de *PhDEF2* apresentaram maior nível de resistência ao necrotrófico *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) em comparação com as plantas não transformadas. Uma possível explicação para esses resultados contrastantes

reside nas diferenças entre as estratégias de patogênese de *B. cinerea* e *Foc*. Fungos que colonizam o xilema das plantas, como *Foc*, invadem o hospedeiro a partir das raízes e apresentam crescimento predominantemente intercelular. Esses patógenos se nutrem principalmente do conteúdo do xilema, uma vez que possuem um eficiente sistema de aquisição dos escassos nutrientes disponíveis nesse meio. Contudo, esses patógenos também podem induzir a liberação de nutrientes por células do hospedeiro e produzir enzimas degradadoras de parede celular, podendo colonizar o interior de algumas células próximas aos vasos do xilema, como as células do parênquima (Yadeta & Thomma, 2013). As plantas de banana transgênicas desenvolvidas por Ghag *et al.* (2012), as quais apresentaram elevados níveis de expressão de *PhDEF1* ou *PhDEF2*, foram desafiadas com *Foc* da raça 1 (*Foc1*). Outra raça mais virulenta, a raça 4, é capaz de infectar quase todas as variedades de banana, diferentemente da raça 1 que é restrita a um determinado grupo de variedades (Y. Sun *et al.*, 2014). Por meio de uma análise de genoma e transcriptoma, Guo *et al.* (2014) verificaram que, durante a interação com o hospedeiro, um número maior de genes de virulência é regulado positivamente na raça 4 em comparação com a raça 1. Logo, pode ser especulado que *Foc1* cause danos celulares ao seu hospedeiro em uma magnitude muito inferior ao que se verifica em flores de petúnia desafiadas com *B. cinerea*. Desse modo, nas plantas transgênicas de banana, é provável que *PhDEF1* ou *PhDEF2* sejam liberadas do interior dos vacúolos apenas nas poucas células danificadas por *Foc1*, fazendo com que a ação antimicrobiana dessas defensinas supere o benefício que esse necrotrófico poderia obter por meio da ação fitotóxica das mesmas. Por outro lado, em flores de petúnia desafiadas com *B. cinerea*, onde o patógeno se nutre,

predominantemente, a partir de células degradadas e lisadas, é provável que a liberação das defensinas vacuolares ocorra em maior nível em comparação com a outra interação recém mencionada. Outra evidência que deve ser considerada ao comparar os resultados obtidos na presente etapa com os resultados obtidos na interação banana-Foc1 é o maior potencial de ação das defensinas de petúnia sobre *F. oxysporum* em comparação com *B. cinerea*. Lay *et al.* (2003) demonstraram que, na concentração de 10 µg ml⁻¹, PhDEF1 inibiu em 70% o crescimento de *B. cinerea*, já o crescimento de *F. oxysporum* foi completamente inibido. Nessa mesma concentração, PhDEF2 inibiu em 41% o crescimento de *B. cinerea* e em 86% o crescimento de *F. oxysporum*. Além disso, é possível que a síntese simultânea de PhDEF1 e PhDEF2 apresente maior potencial fitotóxico em comparação com a síntese de apenas uma das defensinas. Consequentemente, as pétalas contendo o gene *PhDEF1* ou *PhDEF2* silenciado apresentam menor nível de colonização por *B. cinerea*. As plantas transgênicas de banana foram obtidas para a superexpressão isolada de *PhDEF1* ou *PhDEF2*, enquanto que as flores de petúnia expressam simultaneamente as duas defensinas. Sendo assim, é possível que ao silenciar uma das defensinas em petúnia, seja obtida uma condição que se compare ao que foi verificado na interação entre as plantas transgênicas de banana e *F. oxysporum*, onde o potencial fitotóxico de PhDEF1 ou PhDEF2 não foi suficiente para beneficiar o patógeno.

No item 4.3, foi verificado que, nas flores de Picobella Rose inoculadas com *B. cinerea*, o nível de expressão de *PhDEF1* aumentou em comparação com as flores inoculadas com água, porém a expressão desse mesmo gene reduziu em flores de Picobella White inoculadas com *B. cinerea* em comparação

com as flores inoculadas com água. Além disso, foi verificado que os níveis de expressão de *PhDEF2* são induzidos tanto nas flores de Picobella Rose quanto nas flores de Picobella White inoculadas com *B. cinerea* em comparação com as flores inoculadas com água, porém nas flores de Picobella Rose esse aumento foi duas vezes maior do que em flores de Picobella White. Logo, diante dessa análise de expressão e dos resultados obtidos no silenciamento, é possível que as diferenças observadas entre Picobella Rose e Picobella White quanto ao nível de colonização de suas pétalas por *B. cinerea*, se devam, pelo menos em parte, ao menor nível de expressão de *PhDEF1* e *PhDEF2* nas pétalas de Picobella White.

Em face dos resultados obtidos no presente trabalho e conforme sugerido por Ghag *et al.* (2013), *PhDEF1* e *PhDEF2* parecem atuar como moléculas sinalizadoras de processos celulares. Em flores de petúnia desafiadas com *B. cinerea*, é possível que essas defensinas estejam envolvidas na morte de células das pétalas devido à ação fitotóxica das mesmas quando situadas fora do vacúolo ou devido a ativação de cascatas de sinalização, porém ainda desconhecidas. Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode ser sugerido que *B. cinerea* induz a expressão dos genes codificantes das defensinas florais como uma estratégia de patogênese. Contudo, conforme vem sendo sugerido ao longo da presente discussão, a liberação de *PhDEF1* e *PhDEF2* do interior dos vacúolos pode sinalizar a invasão das pétalas por patógenos. Tripathi & Tuteja (2007) propuseram que sinais de morte celular em flores, os quais podem ser gerados por estímulos externos e internos, atuam como desencadeadores e aceleradores da senescência. Sendo assim, a morte de células das pétalas de petúnia, que parece ocorrer tanto devido à colonização

por *B. cinerea* quanto devido a liberação das defensinas vacuolares, pode resultar na senescência e abscisão precoce da corola. A principal função da corola em angiospermas consiste na atração de polinizadores (Bai *et al.*, 210). Sendo assim, apesar de as corolas senescentes serem ainda mais suscetíveis à *B. cinerea* (O'Neill *et al.*, 2000), a abscisão dessas corolas pode reduzir as chances de fecundação de flores infectadas, uma vez que essas flores perderiam o principal atrativo para polinizadores. Por essa razão, na natureza, o acúmulo das duas defensinas vacuolares pode ter a função de evitar que flores infectadas por patógenos atuem como receptoras ou doadoras de pólen. Entretanto, esse possível mecanismo de defesa não seria de interesse para o mercado de flores, no qual a abscisão da corola impacta negativamente a qualidade do produto (Bai *et al.*, 2010). Diante disso, futuras investigações a respeito da interação dessas defensinas com componentes celulares de petúnia podem elucidar o papel dessas proteínas nos processos celulares, contribuindo com estratégias para a obtenção de genótipos resistentes que sejam de interesse para o mercado de flores.

5 CONCLUSÕES

Picobella White pode atuar como fonte de resistência para a obtenção de cultivares resistentes à *B. cinerea*.

Os genes *PhDEF1* e *PhDEF2* podem servir como marcadores da senescência induzida por *B. cinerea* em flores.

A metodologia de VIGS empregada no presente trabalho permite o estudo dos efeitos do silenciamento nas flores com pouca interferência ao longo do desenvolvimento da planta, uma vez que o silenciamento é induzido somente no estágio de floração.

A expressão simultânea de *PhDEF1* e *PhDEF2* em células danificadas por *B. cinerea* contribui com a senescência e abscisão precoce da corola, beneficiando a colonização desse tecido pelo patógeno.

O acúmulo de compostos fenólicos autofluorescentes na parede de células da epiderme de pétalas representa um possível mecanismo de resistência de petúnia à *B. cinerea*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMSELEM, J. *et al.* Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e1002230, 2011.

AN, F. *et al.* Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 7, p. 2384–2401, 2010.

ASSELBERGH, B. *et al.* Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, n. 4, p. 1863–1877, 2007.

BAI, S. *et al.* Proteomic analysis of pollination-induced corolla senescence in petunia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 1089–1109, 2010.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 356–363, 2004.

BENDER, C. M. *et al.* Histopathology of leaf rust infection and development in wheat genotypes containing Lr12 and Lr13. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 2, p. 65–76, 2000.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. Constitutive expression of *Ethylene-Response-Factor1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 23–32, 2002.

BHATTARAI, K. K. *et al.* The MI-1-mediated pest resistance requires *Hsp90* and *Sgt1*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, n. 1, p. 312–323, 2007.

BIRKENBIHL, R. P.; DIEZEL, C.; SOMSSICH, I. E. *Arabidopsis WRKY33* is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 159, n. 1, p. 266–285, 2012.

BOLLER, T.; HE, S. Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern

recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, Washington, v. 324, n. 5928, p. 742–744, 2009.

BRIGNETI, G. *et al.* Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. **Plant Journal**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 264–272, 2004.

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

CAIRES, N. P.; RODRIGUES, F. A.; FURTADO, G. Q. Infection process of *Botrytis cinerea* on eucalypt leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 163, n. 7-8, p. 604–611, 2014.

CANTU, D. *et al.* Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, n. 12, p. 1396–1403, 2009.

CHISHOLM, S. T. *et al.* Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 4, p. 803–814, 2006.

CHO, M.; LEE, S. Phenolic phytoalexins in rice: biological functions and biosynthesis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 12, p. 29120–29133, 2015.

CHOQUER, M. *et al.* *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 277, n. 1, p. 1–10, 2007.

CHU, E. H. *et al.* Effect of gamma irradiation and its convergent treatment for control of postharvest *Botrytis cinerea* of cut roses. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 115, p. 22–29, 2015.

CLARKE, L. J.; ROBINSON, S. A. Cell wall-bound ultraviolet-screening compounds explain the high ultraviolet tolerance of the Antarctic moss, *Ceratodon purpureus*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 179, n. 3, p. 776–783, 2008.

CONTI, G. *et al.* Transgenic expression of *tobacco mosaic virus* capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 25, n. 10, p. 1370–1384, 2012.

CRISTESCU, S. M. *et al.* Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5342–5350, 2002.

CURVERS, K. *et al.* Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 154, n. 2, p. 847–860, 2010.

DAI, G. H. *et al.* Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n. 5, p. 285–306, 1996.

DARRAS, A. I. *et al.* Postharvest infection of *Freesia hybrida* flowers by *Botrytis cinerea*. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 55, 2006.

DE LEÓN, I. P.; MONTESANO, M. Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 2, p. 3178–3200, 2013.

DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, n. 39, p. 313–335, 2001.

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.

DERKSEN, H.; RAMPITSCH, C.; DAAYF, F. Signaling cross-talk in plant disease resistance. **Plant Science**, Limerick, v. 207, p. 79–87, 2013.

DICKMAN, M. B. *et al.* Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. **Proceedings of National Academic of Science of USA**, Washington, v. 98, n. 12, p. 6957–6962, 2001.

DINH, S. Q. *et al.* Histology of waxflower (*Chamelaucium* spp.) flower infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Pathology**, London, v. 60, n. 2, p. 278–287, 2011.

DIXON, R. A. *et al.* The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 371–390, 2002.

DURNER, E. **Principles of Horticultural Physiology**. Wallingford: CABI, 2013. p. 291–293.

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 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.

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**, Lancaster, v. 144, n. 1, p. 367–79, 2007.

FERRARI, S. *et al.* Antisense expression of the *Arabidopsis thaliana* *AtPGIP1* gene reduces polygalacturonase-inhibiting protein accumulation and enhances susceptibility to *Botrytis cinerea*. **Mol Plant Microbe Interact**, St. Paul, v. 19, n. 8, p. 931–936, 2006.

FERRARI, S. *et al.* *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. **Plant Journal**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 193–205, 2003.

FRÍAS, M.; BRITO, N.; GONZÁLEZ, C. The *Botrytis cinerea* cerato-Platanin *BcSpl1* is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 191–196, 2013.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 839–863, 2013.

GFELLER, A. *et al.* Jasmonate biochemical pathway. **Science Signaling**, Washington, v. 3, n. 109, p. 1-6, 2010.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Expression of C-terminal prodomain truncated petunia floral defensins inhibit the growth of transgenic banana plants. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 7, n. 1, p. 505–510, 2013.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of fusarium wilt resistance in transgenic banana plants. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, e39557, 2012.

GIMENEZ-IBANEZ, S.; SOLANO, R. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 72, p. 1-11, 2013.

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.

GU, Y. *et al.* Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 4, p. 817–831, 2002.

GUILLET, G.; DE LUCA, V. Wound-inducible biosynthesis of phytoalexin hydroxycinnamic acid amides of tyramine in tryptophan and tyrosine decarboxylase transgenic tobacco lines. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 2, p. 692–699, 2005.

GUO, L. *et al.* Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen

Fusarium oxysporum f. sp. *ubense* causing banana vascular wilt disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e95543, 2014.

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: Springer, 2007. p. 9–27.

HUANG, P.; CATINOT, J.; ZIMMERLI, L. Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 5, p. 1231-1241, 2015.

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

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 Physiol.**, Rockville, v. 143, n. 2, p. 1044–1054, 2007.

JONES, A. M. P. *et al.* Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis increases cell wall digestibility, protoplast isolation, and facilitates sustained cell division in American elm (*Ulmus americana*). **BMC Plant Biology**, London, v. 12, p. 75, 2012.

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

KABBAGE, M.; WILLIAMS, B.; DICKMAN, M. B. Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e1003287, 2013.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 17, n. 1, p. 22–31, 2012.

KIM, D. S.; KIM, N. H.; HWANG, B. K. The *Capsicum annuum* class IV chitinase ChitIV interacts with receptor-like cytoplasmic protein kinase PIK1 to accelerate PIK1-triggered cell death and defence responses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 7, p. 1987–1999, 2015.

KOORNNEEF, A. *et al.* Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 3, p. 1358–1368, 2008.

KRAHL, K. H.; RANDLE, W. M. Resistance of petunia phenotypes to *Botrytis cinerea*. **HortScience**, Alexandria, v. 34, n. 4, p. 690–692, 1999.

LA CAMERA, S. *et al.* The glutaredoxin *ATGRXS13* is required to facilitate *Botrytis cinerea* infection of *Arabidopsis thaliana* plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 68, n. 3, p. 507–519, 2011.

LAI, Z. *et al.* *Arabidopsis* sigma factor binding proteins are activators of the *WRKY33* transcription factor in plant defense. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 10, p. 3824–3841, 2011a.

LAI, Z.; WANG, F.; *et al.* A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. **The Plant Journal**, Oxford, v. 66, n. 6, p. 953–68, 2011b.

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**, Rockville, v. 8, p. e0136, 2010.

LAY, F.; BRUGLIERA, F.; ANDERSON, M. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 1283–1293, 2003.

LENZ, H. D. *et al.* Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. **The Plant Journal**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 818–830, 2011.

LI, B. *et al.* Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, n. 8, p. 4249–60, 2012.

LI, G. *et al.* Dual-level regulation of ACC synthase activity by *MPK3/MPK6* cascade and its downstream *WRKY* transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e1002767, 2012.

LIU, Y.; BASSHAM, D. C. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 215–237, 2012.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S. P. Virus-induced gene silencing in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 777–786, 2002.

LIU, Z. *et al.* *SnTox3* acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the *Snn3* gene. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. e1000581, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. **Methods**,

Duluth, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LLOYD, A. J. *et al.* Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 67, n. 5, p. 852–868, 2011.

LORENZO, O. *et al.* JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 16, n. 7, p. 1938–1950, 2004.

LORENZO, O. *et al.* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 1, p. 165–178, 2003.

LUO, H. *et al.* The *Arabidopsis Botrytis Susceptible1* Interactor defines a subclass of RING E3 ligases that regulate pathogen and stress responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 154, n. 4, p. 1766–1782, 2010.

LUO, P. *et al.* Disequilibrium of flavonol synthase and dihydroflavonol-4-reductase expression associated tightly to white vs. red cflower formation in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. January, p. 1–12, 2016.

LYSENKO, V.; VARDUNY, T. Anthocyanin-dependent anoxygenic photosynthesis in coloured flower petals? **Scientific Reports**, London, v. 3, n. 3373, p. 1-8, 2013.

MAO, G. *et al.* Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 4, p. 1639–1653, 2011.

MARKHAM, K. R. *et al.* Cell wall sited flavonoids in lisianthus flower petals. **Phytochemistry**, London, v. 54, n. 7, p. 681–687, 2000.

MARQUES, J. P. R. *et al.* Histopathology of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* in citrus flowers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 4, p. 783–790, 2013.

MARQUES, J. P. R. *et al.* Structural and biochemical characteristics of citrus flowers associated with defence against a fungal pathogen. **AoB PLANTS**, v. 7, n. plu090, p. 1-10, 2014.

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.

MCLUSKY, S. R. *et al.* Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and

suppression of flavonoid biosynthesis. **Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 523–534, 1999.

MENGISTE, T. Plant immunity to necrotrophs. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 267–294, 2012.

MENGISTE, T. *et al.* The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 11, p. 2551–2565, 2003.

MIRZAEI, S. *et al.* Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 1, p. 21–28, 2008.

MOFFAT, C. S. *et al.* ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. 1–11, 2012.

MUROI, A. *et al.* Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 3, p. 517–527, 2009.

OLIVER, J. P. *et al.* *Pythium* infection activates conserved plant defense responses in mosses. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 3, p. 569–579, 2009.

O'NEILL, T. M.; BENNISON, J. A.; SCRACE, J. M. Pests and diseases of protected ornamental. In: ALFORD, D. **Pest and disease management handbook**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2000. p. 374–428.

PETRUSSA, E. *et al.* Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 7, p. 14950–14973, 2013.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 489–521, 2012.

PIETERSE, C. M. J. Prime time for transgenerational defense. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 2, p. 545–545, 2012.

POINSSOT, B. *et al.* The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, n. 6, p. 553–564, 2003.

PRATS, E. *et al.* Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Euphytica**, Wageningen, v. 132, n. 3, p. 321–329, 2003.

RODRÍGUEZ-NEGRETE, E. A.; CARRILLO-TRIPP, J.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. RNA silencing against geminivirus: complementary action

of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 3, p. 1332–1340, 2009.

SEIFI, H. S. *et al.* Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-deficient *sitiens* mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. **New Phytologist**, Oxford, v. 199, n. 2, p. 490–504, 2013.

SHARON, A. *et al.* Phytohormones in *Botrytis*-plant interactions. In: ELAD, Y. *et al.* (Ed.). **Botrytis: biology, pathology and control**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 163-179

SHIBUYA, K. *et al.* The central role of PhEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 2, p. 2900–2912, 2004.

SHIBUYA, K.; NIKI, T.; ICHIMURA, K. Pollination induces autophagy in petunia petals via ethylene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 1111–1120, 2013.

SMITH, J. E. *et al.* Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* involves widespread transcriptional reprogramming. **BMC Genomics**, London, v. 15, n. 334, p. 1-18, 2014.

SON, G. H. *et al.* Ethylene-responsive element-binding factor 5, *ERF5*, is involved in chitin-induced innate immunity response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 25, n. 1, p. 48–60, 2012.

SPOEL, S. H.; DONG, X. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 3, n. 6, p. 348–351, 2008.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 12, n. 2, p. 89–100, 2012.

SPOEL, S. H.; LOAKE, G. J. Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, n. 4, p. 358–364, 2011.

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

STAPLES, R. C.; MAYER, A. M. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 134, n. 1, p. 1–7, 1995.

STOTZ, H. U. *et al.* Effector-triggered defence against apoplastic fungal

- pathogens. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 19, n. 8, p. 491–500, 2014.
- STOTZ, H. U.; THOMSON, J.; WANG, Y. Plant defensins. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 11, p. 1010–1012, 2009.
- SUN, H. *et al.* Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 15, p. 4305–4315, 2014.
- SUN, Y. *et al.* Proteomics of *Fusarium oxysporum* race 1 and race 4 reveals enzymes involved in carbohydrate metabolism and ion transport that might play important roles in banana *Fusarium* wilt. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. 1–20, 2014.
- TALAMOND, P.; VERDEIL, J.; CONÉJÉRO, G. Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 5024–5037, 2015.
- TAN, K. *et al.* Quantitative variation in effector activity of *ToxA* isoforms from *Stagonospora nodorum* and *Pyrenophora tritici-repentis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 25, n. 4, p. 515–522, 2012.
- THOMMA, B. P. H. J.; NÜRNBERGER, T.; JOOSTEN, M. H. A. J. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 1, p. 4–15, 2011.
- TÖFOLI, J. G. *et al.* *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, São Paulo, v. 73, p. 11–20, 2011.
- TOMAS, A.; WEARING, A.; JOYCE, D. *Botrytis cinerea*: a causal agent of premature flower drop in packaged Geraldton waxflower. **Australasian Plant Pathology**, v. 24, n. 1, p. 26–28, 1995.
- TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 147–157, 2006.
- TRIPATHI, S. K.; TUTEJA, N. Integrated signaling in flower senescence: an overview. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 2, n. 6, p. 437–445, 2007.
- TSUCHISAKA, A. *et al.* A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, Baltimore, v. 183, n. 3, p. 979–1003, 2009.
- TSUDA, K. *et al.* Network properties of robust immunity in plants. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. e1000772, 2009.
- TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, n. 4, p. 459–465, 2010.

UNDERWOOD, W. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 3, n. 85, p. 1-6, 2012.

UNVER, T.; BUDAK, H. Virus-induced gene silencing, A post transcriptional gene silencing method. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2009, p. 1-8, 2009.

VALENTINE, T. *et al.* Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 4, p. 3999–4009, 2004.

VAN KAN, J. A. L. Infection strategies of *Botrytis cinerea*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 669, p. 77–90, 2005.

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.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 135–162, 2006.

VERONESE, P. *et al.* The BOS loci of *Arabidopsis* are required for resistance to *Botrytis cinerea* infection. **Plant Journal**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 558–574, 2004.

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

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.

WANG, X. *et al.* The role of effectors and host immunity in plant–necrotrophic fungal interactions. **Virulence**, Philadelphia, v. 5, n. 7, p. 722–732, 2014.

WEN, L. Cell death in plant immune response to necrotrophs. **Journal of Plant Biochemistry & Physiology**, v. 1, n. 1, p. 1–3, 2013.

WESP-GUTERRES, C. *et al.* Histopathology of durable adult plant resistance to leaf rust in the Brazilian wheat variety Toropi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 181–196, 2013.

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

WINDRAM, O. *et al.* *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 9, p. 3530–3557, 2012.

YADETA, K. A.; J. THOMMA, B. P. H. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 97, p. 1-12, 2013.

ZHANG, J. *et al.* Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 7, n. 4, p. 290–301, 2010.

ZHAO, Y. *et al.* *Arabidopsis* *RAP2.2* plays an important role in plant resistance to *Botrytis cinerea* and ethylene responses. **New Phytologist**, Oxford, v. 195, n. 2, p. 450–460, 2012.

ZHU, Z. *et al.* Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 30, p. 12539–12544, 2011.

ZIPFEL, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 20, n. 1, p. 10–16, 2008.

7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Comparações (*blastn*) entre sequências do banco de dados do NCBI e os resultados do sequenciamento das regiões ITS1 (A) e ITS2 (B) do rDNA e da região *NEP2* (C) do DNA do isolado obtido a partir de flores de petúnia com sintomas de mofo cinzento. Essas comparações entre sequências de DNA confirmaram a espécie do isolado como *B. cinerea*.

A – ITS1

Botrytis cinerea strain ATCC 90480
18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: gb|KP780449.1| Length: 520 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
322 bits(174)	1e-84	174/174(100%)	0/174(0%)	Plus/Plus
Query 1	TAGACCTCCCACCCTTGTGATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCCT	60		
Sbjct 52	TAGACCTCCCACCCTTGTGATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCCT	111		
Query 61	GTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTTATTAAATGTCGCTGAGTACTATATAAT	120		
Sbjct 112	GTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTTATTAAATGTCGCTGAGTACTATATAAT	171		
Query 121	AGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG	174		
Sbjct 172	AGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG	225		

B – ITS2

Botryotinia fuckeliana 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: gb|KP256186.1| Length: 511 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
527 bits(285)	4e-146	285/285(100%)	0/285(0%)	Plus/Plus
Query 3	ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCAT	62		
Sbjct 227	ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCGGGGGGCAT	286		
Query 63	GCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAA	122		
Sbjct 287	GCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAA	346		
Query 123	TGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCGCTGGGTCTTGAACGTAGTAATATCTCTCGT	182		
Sbjct 347	TGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCGCTGGGTCTTGAACGTAGTAATATCTCTCGT	406		
Query 183	TACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCA	242		
Sbjct 407	TACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATCA	466		
Query 243	GGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	287		
Sbjct 467	GGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	511		

C – NEP2

Botrytis cinerea strain JZB350027
necrosis- and ethylene-inducing protein 2 precursor
(nep2) gene, partial cds
Sequence ID: [gb|KT070555.1](#) | Length: 816 Number of
Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1258 bits(681)	0.0	681/681(100%)	0/681(0%)	Plus/Minus
Query 1	CAGCACCGAAATCGGTGTTCTCAAGAGCAGTTTGAGCAGCAGTTGGTAAAGACTCCCAAG	60		
Sbjct 786	CAGCACCGAAATCGGTGTTCTCAAGAGCAGTTTGAGCAGCAGTTGGTAAAGACTCCCAAG	727		
Query 61	CAATCATAGGTTGTTTTCCACCAACAGTACTAGTAAGACCCATTGAGTGATCGACGGGCC	120		
Sbjct 726	CAATCATAGGTTGTTTTCCACCAACAGTACTAGTAAGACCCATTGAGTGATCGACGGGCC	667		
Query 121	AGATACTTTCGTAAGAGGGCTGGTACCAGAAAGGGAATAGCCATCCGTGGAAAC	180		
Sbjct 666	AGATACTTTCGTAAGAGGGCTGGTACCAGAAAGGGAATAGCCATCCGTGGAAAC	607		
Query 181	AATCCAGCCTCCGTGGCGGAAGGACAAACGGCTAAGATGTTGTCGGCAGTTGTGGCGG	240		
Sbjct 606	AATCCAGCCTCCGTGGCGGAAGGACAAACGGCTAAGATGTTGTCGGCAGTTGTGGCGG	547		
Query 241	TGGCGCTGGAGAGCCAGACAATTACACCTTCCCAATCGTGACGGTGACCAATACCGGTTG	300		
Sbjct 546	TGGCGCTGGAGAGCCAGACAATTACACCTTCCCAATCGTGACGGTGACCAATACCGGTTG	487		
Query 301	AGGGCTCGTCTTTGGCATGTACCTAAGATTTTGTAGGTTGGATCTATAAGGAGAAAGTT	360		
Sbjct 486	AGGGCTCGTCTTTGGCATGTACCTAAGATTTTGTAGGTTGGATCTATAAGGAGAAAGTT	427		
Query 361	TAGAGAGAAGTACCAGGAGTACATGATGGCGTAGTTTGTCCGCTTTGTCCTCTCGAA	420		
Sbjct 426	TAGAGAGAAGTACCAGGAGTACATGATGGCGTAGTTTGTCCGCTTTGTCCTCTCGAA	367		
Query 421	CATATACTTGACCGGTACTGCTGCTGCAACCACCATTTGCTACTGCCAGTTGGTGACAAAC	480		
Sbjct 366	CATATACTTGACCGGTACTGCTGCTGCAACCACCATTTGCTACTGCCAGTTGGTGACAAAC	307		
Query 481	CACCACTAAAATATGTTAGAGACTCAATAGCAATCGTGTGGAAAGAGAAAGATATAAGGAC	540		
Sbjct 306	CACCACTAAAATATGTTAGAGACTCAATAGCAATCGTGTGGAAAGAGAAAGATATAAGGAC	247		
Query 541	ATACCCTGTGTTACCCGATGCATCGACGGCAGGGAATGGTACGCATCCATTTACGACTTT	600		
Sbjct 246	ATACCCTGTGTTACCCGATGCATCGACGGCAGGGAATGGTACGCATCCATTTACGACTTT	187		
Query 601	AAGGAATGGTTTATATGCCTCATAAACTGTTCTACGGTCCCACTGGGAACAGTTTTCGGC	660		
Sbjct 186	AAGGAATGGTTTATATGCCTCATAAACTGTTCTACGGTCCCACTGGGAACAGTTTTCGGC	127		
Query 661	AAATCTACAACGGCATCGGA	681		
Sbjct 126	AAATCTACAACGGCATCGGA	106		

APÊNDICE 2. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor pTRV2b-*PhDEF1* com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em destaque está a sequência de nucleotídeos do *PhDEF1* e as regiões grifadas em cinza indicam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI*.

TGACCTACTGGTTACTGTATCACTTACCCGAG**GTTAACTCCATCTGTTTCTTCGCAG**
TTGCTATACTAGCATTGATGTTCTTTGCTGCCTATGACGCAGAAGCGGCAACTTG
CAAGGCTGAATGCCAACATGGGATTCCGTCCGTATCAATAAAAAACCATGTGT
AGCGTGTGCAAAAAGGCAAAGTTCTCTGATGGGCACTGCAGCAAAATACTCAG
AAGATGCCTGTGCACTAAGGAGTGTGTATTCGAAAAAACTGAGGCAACTCAAAC
AGAACTTTCACTAAGGATGTAACACTTTGGCTGAAGCTTTGCTTGGGCAGAA
TTCTCTAGAAGGCCTCCATGGGGATCCGGTACCGAGCTCACGC

APÊNDICE 3. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor pTRV2b-*PhDEF2* com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R. Em destaque está a sequência de nucleotídeos do *PhDEF2* e as regiões grifadas em cinza indicam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI*.

TGACCTACTGGTTACTGTATCACTTACCCGAG**GTTAACATAAAGGCCCATGTGTAA**
AATGTTGCAAAGCACAAACCAGAAAAATTCACCGACGGGCACTGCAGTAAAATA
CTCCGAAGATGCCTATGCACTAAGCCGTGTGCAACTGAAGAGGCAACTGCAACT
TTGGCTAACGAGGTAAAGACTATGGCGAATTCTCTAGAAGGCCTCCATGGGGAT
CCGGTACCGAGCTCACGC