Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Papel do ácido abscísico na modulação da defesa em tomateiro ‘Micro-Tom’
contra patógenos de estilos de vida contrastantes por meio da regulação
transcricional e pós-transcricional

Jamille Santos da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Jamille Santos da Silva
Engenheira Agrônoma

Papel do ácido abscísico na modulação da defesa em tomateiro 'Micro-Tom' contra patógenos de estilos de vida contrastantes por meio da regulação transcricional e pós-transcricional

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Jamille Santos da

Papel do ácido abscísico na modulação da defesa em tomateiro 'Micro-Tom' contra patógenos de estilos de vida contrastantes por meio da regulação transcricional e pós-transcricional / Jamille Santos da Silva. - - Piracicaba, 2018.

154 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fungos 2. Necrotrófico 3. Biotrófico 4. Hormônios I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico às pessoas mais importantes da minha vida, aos meus pais Lucineide e Jasiel, ao meu irmão Raphael e ao meu namorado Victor

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ter me dado forças nos momentos mais difíceis desta etapa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Figueira pela oportunidade em desenvolver meu trabalho junto a sua equipe, pela pronta disponibilidade sempre que precisei e pelos ensinamentos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)-processo 2015/00060-9 e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsas e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro.

Ao meu namorado, Victor Vitorello que esteve sempre presente, me ajudando e me dando forças nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres pela disponibilização do material vegetal, das conversas e da idéia da tese.

Aos meus familiares, em especial meus pais: Lucineide e Jasiel e ao meu irmão Raphael pelo amor, carinho e apoio.

Ao Dr. Ricardo Gioria da Sakata Seed Sudamerica e a equipe da Tomates Mallmann, em especial à Bibiana, que me forneceram os patógenos.

À Prof^a. Dra. Lilian Amorim e sua técnica Silvia do departamento de Fitopatologia da ESALQ, que disponibilizaram as câmaras de crescimento para a realização dos experimentos

À Prof^a. Dra. Adriana Paes Leme do CNPEM, ao Prof. Dr. Luciano Freschi do Instituto de Biociências e ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela parceria.

Ao Prof. Piotr Mieczkowski e ao Dr. Paulo José Pereira Lima Teixeira da *University of North Carolina*, pela parceria e ajuda.

Ao Dr. Vinicius Abreu, ao Prof. Dr. Gabriel e ao Me. Fernando Henrique Correr, pela ajuda nas análises de bioinformática.

Às minhas amigas Juliana Leles Costa e Danielle Camargo Scotton, que me ajudaram sempre que precisei, pelas boas conversas e pela amizade.

Aos amigos de laboratório, Juliana Deganello, Layanne, Luis Henrique, André Luis, Melissa, Daniele Paschoal, Eder, Lucas, Fernando, Daniella Bardella, Rodolfo, Albânia, Bruna, Aline, Mariele, Eduardo Bressan, Guilherme, Thaísa, Luciana, Alessandra e Leticia pelos momentos compartilhados.

Aos técnicos de laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA: Felipe Buck, Wlamir Godoy, Rachel Orsi, Paulo Cassieri e Inês Possignolo por toda ajuda.

Às amigas Zirlane e Bruna, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos de trabalho do IFC, em especial Antonio Mendes, Denise Fernandes, Giselle Camargo e Paula Hamerski e a minha supervisora Neiva Hoeppers pela ajuda e amizade.

Aos colegas de pós-graduação, pelos momentos compartilhados.

À todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

“Eu sei o preço do sucesso: dedicação, trabalho duro, e uma incessante devoção às coisas que você quer ver acontecer.”

Frank Lloyd Wright

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. <i>Estilos de vida de fungos fitopatogênicos: Sclerotinia sclerotiorum e Oidium neolycopersici como modelos de patógenos de estilo de vida contrastantes em tomateiro</i>	13
2.2. <i>O sistema imune vegetal: modelos de defesa diferenciados para patógenos de estilos de vida contrastantes.....</i>	15
2.3. <i>Participação dos hormônios vegetais clássicos de defesa primária e suas interações com o ácido abscísico na resistência a patógenos de estilos de vida contrastantes</i>	20
2.4. <i>Sinalização molecular e estratégias de defesa de plantas contra patógenos</i>	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
3. A EXPLOÇÃO OXIDATIVA EM TOMATEIRO CONTRA PATÓGENOS DE ESTILOS DE VIDA CONTRASTANTES É REGULADA PARCIALMENTE PELA VIA DE BIOSÍNTESE DO ABA.....	53
RESUMO	53
ABSTRACT	53
3.1. INTRODUÇÃO.....	54
3.2. RESULTADOS.....	56
<i>O mutante sitiens com reduzidos níveis de ABA responde diferencialmente a patógenos de estilos de vida contrastantes.....</i>	56
<i>A resposta diferencial a patógenos de estilos de vida contrastantes é parcialmente dependente do nível de ABA.....</i>	62
<i>A interação com ambos os patógenos induzem a um acúmulo de ABA em 'MT', resultante da repressão da degradação</i>	65
<i>A via da biossíntese de ABA é regulada durante a interação com ambos os patógenos em 'MT' e sitiens, resultando em um provável acúmulo de intermediários no mutante sitiens</i>	68
<i>A interação com ambos os patógenos desencadeia explosão oxidativa somente no mutante sitiens, induzindo morte celular em plantas inoculadas com O. neolycopersici.</i>	70
<i>O funcionamento adequado da via de biossíntese de ABA permite a remoção de EROs por meio do ascorbato em 'MT', enquanto a resistência a S. sclerotiorum e O. neolycopersici parece ser mediada pelo aumento do conteúdo de GSH;</i>	72
3.3. DISCUSSÃO.....	77
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	80
<i>Produção de inóculo dos fungos S. sclerotiorum e O. neolycopersici.....</i>	80
<i>Experimentos de patogenicidade de S. sclerotiorum e O. neolycopersici</i>	81
<i>Quantificação de ABA.....</i>	82
<i>Ensaio histoquímico de GUS, Trypan Blue e DAB</i>	83
<i>Expressão diferencial de genes por RT-qPCR e RNA-Seq.....</i>	83
<i>Preparo de bibliotecas e sequenciamento do RNA</i>	84
<i>Análise das sequências do RNA-Seq de 'MT' e do mutante sitiens inoculados com S. sclerotiorum e O. neolycopersici</i>	85
<i>Conteúdos de H₂O₂, ascorbato e glutathione</i>	86
REFERÊNCIAS.....	87
MATERIAL SUPLEMENTAR	93
4. ANÁLISE TRANSCRICIONAL E PROTEÔMICA REVELA UM NOVO PAPEL DO ÁCIDO ABCÍSCICO NA DEFESA CONTRA PATÓGENOS DE ESTILO DE VIDA CONTRASTANTES	96
RESUMO	96
ABSTRACT	96
4.1. INTRODUÇÃO	97
4.2. RESULTADOS	99
<i>Análise da quantidade, qualidade e mapeamento de reads derivadas de análise de RNA-seq no genoma do tomateiro.....</i>	99

<i>Análise comparativa do transcriptoma de folhas não inoculadas do mutante sitiens em comparação com o 'MT'</i>	101
<i>Análise da expressão diferencial de genes do transcriptoma de folhas de 'MT' e sitiens inoculadas com S. sclerotiorum em comparação com o 'MT' não inoculado</i>	106
<i>Análise da expressão diferencial de genes comparativa do transcriptoma de folhas de 'MT' e de sitiens inoculadas com O. neolycopersici em comparação com o 'MT' não inoculado</i>	116
<i>Proteômica de folhas de 'MT' e sitiens inoculadas com S. sclerotiorum e O. neolycopersici</i>	121
4.3. DISCUSSÃO	127
4.4. MATERIAL E MÉTODOS	130
<i>Material vegetal</i>	130
<i>Preparo de bibliotecas e sequenciamento do RNA</i>	131
<i>Análise das sequências do RNA-Seq de 'MT' e do mutante sitiens inoculados com S. sclerotiorum e O. neolycopersici</i>	131
<i>Análise do perfil de protéico de 'MT' e do mutante sitiens inoculados com S. sclerotiorum e O. neolycopersici</i>	132
REFERÊNCIAS	135
MATERIAL SUPLEMENTAR	143
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	153

RESUMO

PAPEL DO ÁCIDO ABCÍSCICO NA MODULAÇÃO DA DEFESA EM TOMATEIRO 'MICRO-TOM' CONTRA PATÓGENOS DE ESTILOS DE VIDA CONTRASTANTES POR MEIO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E PÓS-TRANSCRICIONAL

Os patógenos de plantas são frequentemente classificados em biotróficos, necrotróficos ou hemibiotróficos de acordo com seu mecanismo de infecção e estilo de vida e, consequentemente, respostas distintas do hospedeiro são ativadas. As respostas da planta a patógenos são reconhecidamente reguladas por hormônios vegetais. Classicamente, considera-se que a sinalização por ácido salicílico (SA) é requerida para resistência a patógenos biotróficos, enquanto que a combinação de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) são requeridos para a resistência a necrotróficos. Com o objetivo de identificar mutantes e/ou transgênicos hormonais que apresentassem resposta diferencial contrastante à infecção pelos patógenos necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* e biotrófico *Oidium neolycopersici* foi realizado um experimento com nove mutantes e transgênicos hormonais de tomateiro juntamente com o controle 'MT'. Nesse *screening* foi concluído que o mutante *sitiens*, com reduzidos níveis de ácido abscísico (ABA), responde diferencialmente, apresentando maior suscetibilidade ao necrotrófico do que 'MT' e resistência parcial ao fungo biotrófico. Evidências adicionais da participação do ABA nessas interações foram encontradas por meio da detecção no aumento no conteúdo de ABA em folhas de plantas inoculadas com ambos os patógenos, pelo aumento da expressão de GUS no transgênico *RD29B::GUS*, cujo promotor é responsivo ao ABA, e pela modulação da resistência com a aplicação exógena de 100 μ M de ABA ou 2 μ M de fluridone em 'MT', em *sitiens* e no mutante *sp12*, com elevados níveis de ABA. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel da via biossintética de ABA na modulação do ciclo ascorbato-glutationa de antioxição e remoção de H_2O_2 , e do papel do ABA na alteração do perfil transcricional e proteico em folhas de tomateiro em resposta a infecção por *S. sclerotiorum* ou *O. neolycopersici*. *sitiens* apresenta elevados níveis de H_2O_2 no apoplasto, que parece resultar em morte celular programada (PCD). A presença dessa mutação interrompe a via de biossíntese do ABA, com provável acúmulo de intermediários, ocorrendo o consumo do ascorbato pela enzima violaxantina de-epoxidase (VDE) no cloroplasto. Com isso, esse ascorbato não é transportado para o apoplasto para a remoção de H_2O_2 , o que auxilia no acúmulo de H_2O_2 e a consequente indução de PCD. A análise da expressão gênica diferencial por RNA-seq permitiu observar o enriquecimento de termos associados a grupos de genes induzidos relacionados a mecanismos de autofagia em 'MT' inoculado com *S. sclerotiorum*. A autofagia é um tipo distinto de PCD e pode ser vista como uma estratégia de sobrevivência para evitar a extensiva morte celular, resultando no aumento da resistência a patógenos necrotróficos, como observado em 'MT'. A análise proteômica permitiu verificar em 'MT' uma maior abundância relativa de proteínas relacionadas a patogênese quando inoculadas com *S. sclerotiorum*. As proteínas encontradas em maior abundância relativa estão relacionadas a vias de sinalização do JA e ET, degradação da parede celular de fungos e de metabólitos secundários, conferindo uma maior resistência ao 'MT'. Na interação com *O. neolycopersici*, foi verificada uma maior indução dos genes de resistência em *sitiens* e não foi detectado o enriquecimento de termos ligados a grupos de genes de autofagia em 'MT'. Por outro lado, a análise de proteínas revelou a participação de uma endoquitinase em *sitiens* com papel presumível na resistência parcial a este patógeno biotrófico. Em conclusão, a via de biossíntese de ABA pode modificar a capacidade de remoção de H_2O_2 e ABA pode induzir a formas distintas de morte celular e regular a expressão de genes de resistência.

Palavras-chaves: Fungos; Necrotófico; Biotrófico; Hormônios

ABSTRACT

THE ROLE OF ABSCISIC ACID IN MODULATING DEFENSE IN 'MICRO-TOM' TOMATO AGAINST PATHOGENS OF CONTRASTING LIFESTYLE THROUGH TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION

Plant pathogens are often classified as biotrophic, necrotrophic or hemibiotrophic according to their mechanism of infection and lifestyle and, consequently, distinct host responses are activated in each case. Plant responses to pathogens are known to be regulated by plant hormones. Classically, salicylic acid (SA) signaling is required for resistance to biotrophic pathogens, whereas the combination of jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) are required for necrotrophic resistance. In order to identify mutant and/or hormonal transgenic plants that showed differential response to infection by the necrotrophic pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and biotrophic *Oidium neolycopersici*, an experiment was carried out with nine mutants and hormonal transgenic tomato plants together with the 'MT' control. In this screen, the *sitiens* mutant, with reduced levels of abscisic acid (ABA), presented greater susceptibility to the necrotrophic fungus and partial resistance to the biotrophic fungus in comparison to 'MT'. Further evidence of the participation of ABA in these interactions was given by the fact that ABA contents increased in leaves of plants inoculated with both pathogens, GUS expression increased in the transgenic *RD29B :: GUS* whose promoter is responsive to ABA, and resistance was modulated by the exogenous application of 100 μ M ABA or 2 μ M fluridone in 'MT', *sitiens* and the *sp12* mutant (high levels of ABA). The objective of this work was to investigate the role of the ABA biosynthetic pathway in the modulation of the ascorbate-glutathione cycle of antioxidation and H_2O_2 removal, and the role of ABA in altering the transcriptional and protein profile in tomato leaves in response to infection by *S. sclerotiorum* or *O. neolycopersici*. *Sitiens* presents high levels of H_2O_2 in the apoplast, which appears to result in programmed cell death (PCD). The presence of this mutation interrupts the ABA biosynthesis pathway, with a probable accumulation of intermediates, with the use of ascorbate by the enzyme violaxanthin de-epoxidase (VDE) in the chloroplast. Thus, this ascorbate is not transported to the apoplast to remove H_2O_2 , promoting the accumulation of H_2O_2 and the consequent induction of PCD. In 'MT' inoculated with *S. sclerotiorum*, the analysis of differential gene expression by RNA-seq revealed the enrichment of terms associated with groups of induced genes related to mechanisms of autophagy. Autophagy is a distinct type of PCD and is a survival strategy to prevent extensive cell death, resulting in increased resistance to necrotrophic pathogens, as observed in 'MT'. Proteomic analysis showed that 'MT' presented a greater relative abundance of proteins related to pathogenesis when inoculated with *S. sclerotiorum*. These proteins are related to JA and ET signaling pathways, secondary metabolites and cell wall degradation of fungi, conferring greater resistance to 'MT'. In the interaction with *O. neolycopersici*, increased induction of resistance genes was observed in *sitiens* and no enrichment of terms linked to groups of autophagy genes in 'MT' was detected. On the other hand, protein analysis revealed the participation of an endochitinase in *sitiens* with a presumed role in the partial resistance to this biotrophic pathogen. In conclusion, the ABA biosynthetic pathway can modify the H_2O_2 removal capacity and ABA can induce distinct forms of cell death and regulate the expression of resistance genes.

Keywords: Fungi; Necrotrophic; Biotrophic; Hormones

1. INTRODUÇÃO

Patógenos de plantas podem ser classificados em biotróficos, necrotróficos ou hemibiotróficos de acordo com seu mecanismo de infecção e estilos de vida. Os biotróficos se alimentam de tecidos vivos, enquanto os necrotróficos se alimentam de células mortas. Já os hemibiotróficos apresentam uma fase inicial biotrófica e uma fase posterior necrotrófica.

É bem conhecido que os hormônios vegetais desempenham um papel importante em interações planta-patógeno. Geralmente, a sinalização por ácido salicílico (SA) induz defesas contra patógenos biotróficos, enquanto o ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) induzem contra necrotróficos. Entretanto, a defesa de plantas contra patógenos não é somente regulada pelos hormônios clássicos, mas também por outros hormônios, que foram descobertos originalmente por seus efeitos no crescimento ou desenvolvimento, ou mais associados a resposta contra estresses abióticos. Assim, todas as classes hormonais parecem contribuir para respostas de estresse bióticos. Essas contribuições podem ser diretas ou indiretas quando há um *crosstalk* entre as vias de sinalização hormonal, assim como é bem documentado o antagonismo entre SA e JA/ET.

Uma das funções das espécies reativas de oxigênio (EROs) é relacionada a sua atuação como mensageiros secundários nas respostas de hormônios vegetais. Esses hormônios, por sua vez, podem influenciar na indução de EROs e de antioxidantes, assim influenciando a resistência ou suscetibilidade de plantas a patógenos. Em condições fisiológicas de homeostase, EROs são eliminados por diferentes componentes da defesa antioxidante. No entanto, se o equilíbrio entre a produção e a remoção de EROs for alterado, os níveis intracelulares de EROs podem aumentar, induzindo morte celular programada (PCD). Portanto, a necrose tecidual causada por espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a infecção pelo patógeno pode aumentar a suscetibilidade do hospedeiro à patógenos necrotróficos ou levar a resistência à patógenos biotróficos. Consequentemente, a elevação da capacidade antioxidante em plantas aumenta sua tolerância ao desenvolvimento de necroses causadas por patógenos necrotróficos.

Os compostos antioxidantes não enzimáticos ascorbato e glutatona são encontrados em altas concentrações em cloroplastos e outros compartimentos celulares. Por sua vez, o ascorbato é encontrado em altas concentrações no apoplasto, enquanto que a glutatona não. Assim, o ascorbato está diretamente ligado a remoção de EROs no apoplasto, enquanto que a glutatona está envolvida na alteração do estado redox do citosol da célula, regulando a monomerização de um importante componente da via de sinalização do ácido salicílico, NPR1. Ao mesmo tempo, o

ciclo ascorbato-glutationa interage no cloroplasto com a via das xantofilas e de biossíntese de ABA, através da enzima violaxantina de-epoxidase (VDE).

Porém, não somente a morte celular programada é importante na interação planta-patógeno, mas também a maneira pela qual ocorre a morte celular é crucial. Assim, a autofagia, que consiste no sequestro de proteínas e organelas danificadas dentro de autofagossomos para degradação e reciclagem que ocorre no processo de senescência e na resposta imune, parece ser utilizada como uma estratégia de sobrevivência para evitar a extensa e rápida morte celular. Ao induzir a autofagia, a célula tenta sequestrar sinais que induzem a morte celular. Um possível papel da autofagia é remover a indução de EROs que podem se difundir através do apoplasto e espaço extracelular e de outros sinais que levam a PCD rápida.

Assim, a hipótese deste trabalho é que o ABA atua de maneira indireta na regulação dos níveis de ascorbato e glutathione, e consequentemente as EROs e a PCD, e de maneira direta na alteração de vias de outros hormônios e de genes relacionados à resposta imune em folhas inoculadas com o patógeno necrotrófico *S. sclerotiorum* e com o patógeno biotrófico *O. neolycopersici*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estilos de vida de fungos fitopatogênicos: *Sclerotinia sclerotiorum* e *Oidium neolycopersici* como modelos de patógenos de estilo de vida contrastantes em tomateiro

Evidências fósseis da associação entre fungos e plantas podem ser rastreadas desde o período Devoniano, há cerca de 450 milhões de anos (Taylor et al., 1992). O estudo das interações envolve geralmente a transferência de nutrientes de um organismo para outro, sendo que estas relações são usadas para classificar as interações plantas-microorganismos. As interações de plantas com fungos podem ser de vários tipos, podendo ser aparentemente neutra, mutuamente benéfica e prejudicial (Spanu; Panstruga, 2017). Como resultado de uma co-evolução com seus hospedeiros, os fungos fitopatogênicos adquiriram estratégias diversas e complexas para manipular as vias de defesa do hospedeiro, apresentando assim diversos estilos de vida (Thompson; Burdon, 1992). Tradicionalmente, os estilos de vida dos fungos fitopatogênicos são classificados baseados na aquisição de nutrientes e na viabilidade do tecido do hospedeiro após a infecção (Glazebrook, 2005).

Os fungos biotróficos são agentes patogênicos que penetram e estabelecem contatos próximos com as células do hospedeiro para o crescimento e reprodução durante seu ciclo de vida. Consequentemente, patógenos biotróficos causam danos mínimos à planta e os sintomas geralmente ocorrem devido a depleção de nutrientes extraídos pelo patógeno (Glazebrook, 2005). Os patógenos obtêm nutrientes através de estruturas de alimentação especializadas (haustórios), geralmente não produzem toxinas e secretam poucas enzimas de degradação da parede celular (CWDEs), produzem camadas interfaciais ricas em carboidratos e proteínas que separam o patógeno da membrana plasmática do hospedeiro e suprimem as defesas do hospedeiro a longo prazo (Mendgen; Hahn, 2002). O estilo de vida biotrófico é realizado de diversas maneiras: de forma intercelular (por ex. por *Cladosporium fulvum*); subcuticular (ex. por *Venturia inaequalis*); inter e intracelular (ex. por *Claviceps purpurea*, *Ustilago maydis* e fungos de ferrugem monocariótico); extracelular com haustório dentro das células epidérmicas (ex. oídios) e intercelular com haustório dentro de células do parênquima (ex. fungos de ferrugem dicarióticos e míldios) (Mendgen; Hahn, 2002).

O patógeno *Oidium neolycopersici* é um fungo biotrófico obrigatório, altamente polífago, que infecta o tomateiro (*Solanum lycopersicum*). O fungo provoca lesões superficiais, preferencialmente na face adaxial das folhas, mas também na face abaxial, pecíolos e caule (Jones; Whipps; Gurr, 2001). A absorção de nutrientes do hospedeiro é feita através de haustórios,

estruturas especializadas para fixação e absorção de nutrientes das plantas. O desenvolvimento de colônias maduras e esporulantes depende do sucesso da penetração inicial no hospedeiro e, em seguida, da formação e funcionamento prolongado de haustórios. Os mecanismos de defesa em acessos resistentes de tomateiro estão relacionados à presença de resposta de hipersensibilidade, aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico (NO) e de enzimas antioxidantes (Jones; Whipps; Gurr, 2001; Mlíčková et al., 2004; Tománková et al., 2006; Piterková et al., 2011).

Por outro lado, os fungos necrotróficos matam o tecido do hospedeiro por meio da secreção de uma grande diversidade de toxinas e enzimas degradadoras, muitas vezes antes do crescimento fúngico e colonização do hospedeiro (Glazebrook, 2005). Essas enzimas penetram no hospedeiro e subsequentemente degradam os componentes da parede celular que servem então como fonte de carbono para o patógeno. Este estilo de vida confere a este grupo de fitopatógenos a agressividade com que se desenvolvem no hospedeiro e da pouca sofisticação com que se alimenta, verificado também pela elevada quantidade de plantas que servem de hospedeiros a vários membros desse grupo (Kabbage et al., 2015).

De fato, análises genômicas de dois fungos necrotróficos modelos, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*, revelaram mais de 100 genes codificadores de potenciais enzimas ativadas por carboidratos (CAZyme) (Amselem et al., 2011). Em contraste, o fungo biotrófico *Blumeria graminis* possui apenas dez, um arsenal de enzimas hidrolíticas significativamente menor, consistente com seu estilo de vida biotrófico obrigatório (Spanu et al., 2010). Essas enzimas são, provavelmente, importantes quando o fungo está vivendo sob condições saprofíticas, o que constitui, em alguns casos, uma parcela significativa da vida de um patógeno necrotrófico e, portanto, pode ser usado principalmente para degradar detritos de plantas (Amselem et al., 2011).

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo ascomiceto necrotrófico cosmopolita com uma ampla gama de hospedeiros (> 400 espécies de plantas). Folhas infectadas geralmente apresentam lesões de aparência encharcada que se expandem rapidamente e transformam-se em tecidos necróticos, com o aparecimento posterior de um micélio branco cotonoso (Bolton; Thomma; Nelson, 2006). O fator chave que conhecidamente regula o sucesso patogênico deste fungo é a síntese e secreção de ácido oxálico (AO). Mutantes de *S. sclerotiorum* defectivos na produção de oxalato causam lesões limitadas (Godoy et al., 1990; Cessna et al., 2000). O ácido oxálico contribui com a patogênese aumentando a colonização de plantas hospedeiras, através da acidificação dos tecidos do hospedeiro e do sequestro de cálcio da parede celular dos hospedeiros, que facilita a ação das enzimas degradantes da parede (Marciano; Lenna; Magro, 1983).

Alguns fungos patogênicos podem ser claramente designados como biotróficos ou necrotróficos. No entanto, muitos outros se comportam como biotróficos e necrotróficos,

dependendo das condições em que se encontram ou os estádios de seus ciclos de vida. Estes patógenos são classificados em hemibiotróficos. Inicialmente invadem as células em um estágio biotrófico antes de uma transição para um estilo de vida necrotrófico, em que os nutrientes são obtidos a partir de células hospedeiras que eles matam (Yang; Li; Jørgensen, 2013).

Muitas espécies que comumente são consideradas necrotróficas podem ser de fato hemibiotróficas, pois apresentam um estágio biotrófico no início da infecção. Estas categorias não são tão claras e as designações tróficas podem precisar ser revisadas à medida que as evidências experimentais ficam disponíveis.

2.2. O sistema imune vegetal: modelos de defesa diferenciados para patógenos de estilos de vida contrastantes

As plantas, ao contrário de alguns animais, não apresentam células de defesa móveis e um sistema imune somático adaptativo. Em vez disso, plantas contam com a imunidade inata de cada célula e com sinais sistêmicos provindos dos locais de infecção (Jones; Dangl, 2006). Existem, em essência, dois ramos do sistema imunológico da planta. Um usa receptores transmembrana de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos ou microorganismos (*Microbe Associated Molecular Pattern* -MAMPs ou *Pathogen Associated Molecular Pattern* - PAMPs), tais como a flagelina de bactérias. O segundo age em grande parte dentro da célula, usando proteínas NB-LRR codificadas na sua maioria por genes R. Os efetores de patógenos são reconhecidos por proteínas NB-LRR e ativam respostas de defesa semelhantes (Jones; Dangl, 2006).

O modelo ‘zigzag’ foi proposto por Jones e Dangl (2006) (Figura 1). Este modelo é composto por quatro fases. Na fase 1, os MAMPs ou PAMPs são reconhecidos pelos receptores transmembranas (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs), resultando em uma imunidade desencadeada por PAMPs, também conhecida como PTI (*Pathogen Induced Immunity*), que pode resultar na paralização da colonização do patógeno. Na fase 2, os patógenos que obtiveram sucesso na fase 1 liberam efetores que contribuem para a virulência do patógeno. Isto irá resultar na suscetibilidade desencadeada por efetores (*Effector Triggered Susceptibility*- ETS). Na fase 3, um dado efector é especificamente reconhecido por uma das proteínas NB-LRR, resultando na imunidade desencadeada por efetores (*Effector Triggered Immunity* - ETI). ETI é uma resposta acelerada e amplificada de PTI, e geralmente resulta na resistência à doença. Na fase 4, a seleção natural induz a diversificação de efetores e liberação destes com o objetivo de evitar ou suprimir a ETI.

Figura 1. Modelo de defesa quantitativo gene-a-gene ou ‘zigzag’ de plantas contra patógenos. Na fase 1, PAMPs, MAMPs ou DAMPs são detectados por receptores de membrana do tipo PRR, desencadeando a imunidade dirigida por PAMPs (PTI). Na fase 2, efetores dos patógenos sobrepõem a PTI resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na fase 3, um efector pode ser reconhecido por proteínas de resistência ou R (NB-LRR) dentro da célula ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), que frequentemente ultrapassa o *threshold* para a resposta de hipersensibilidade (HR). Na fase 4, patógenos que não possuem efetores reconhecidos por proteínas R suprimem a ETI desencadeando uma ETS. Seleção para novos alelos de genes NB-LRR em plantas são adquiridos reconhecendo novos efetores e desencadeando uma ETI (Jones; Dangl, 2006).

As plantas reconhecem diversos PAMPs bacterianos. Lipopolissacarídeos (LPSs), como o lípidio A, são percebidos por uma variedade de plantas (Newman et al., 2007). Os peptidoglicanos (PGNs) são componentes importantes da parede celular de bactérias Gram-positivas e as cadeias de açúcares são reconhecidas como PAMP por *Arabidopsis* (Gust et al., 2007). O domínio N-terminal altamente conservado da flagelina (flg22) é outro PAMP extracelular que é reconhecido pela maioria das espécies de plantas (Zipfel et al., 2004).

Porém, nem todos os PAMPs são componentes extracelulares de patógenos. A proteína bacteriana *Cold Shock Protein* (CSP) e o fator de alongamento da tradução Tu (EF-Tu) são proteínas intracelulares reconhecidas como PAMPs (Felix; Boller, 2003; Zipfel et al., 2006). A quitina é um dos principais constituintes das paredes celulares dos fungos. Curiosamente, mecanismos distintos, mas com componentes comuns para a percepção de quitina são encontrados em diversas espécies de plantas (De Jonge et al., 2010; Mentlak et al., 2012; Faulkner et al., 2013). Outros PAMPs fúngicos conhecidos são a xilanase fúngica (Ron; Avni, 2004), endopoligalacturonases fúngicas (PGs) (Zhang et al., 2014), entre outros. Em *S. sclerotiorum*, um elicitor protéico foi parcialmente purificado e chamado de SCLEROTINIA CULTURE FILTRATE ELICITOR1 (SCFE1), que induz PTI por meio do reconhecimento do receptor RLP30/SOBIR1/BAK1 em *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2013). Além de detectar

microrganismos invasores por meio de PAMPs, as plantas também podem reconhecer padrões moleculares associados a danos (*Damage-Associated Molecular Pattern* - DAMPs). Assim, plantas podem reconhecer oligogalacturonídeos liberados de paredes celulares de plantas por enzimas hidrolíticas fúngicas (Ferrari et al., 2007). Além disso, Nep1 (peptídeo indutor de etileno e necrose 1) são proteínas secretadas por muitos patógenos e reconhecidas por receptores de plantas (Qutob et al., 2006), como é o caso do receptor RPL23, que reconhece uma sequência de 20 aminoácidos encontrados em proteínas do tipo Nep1 (Albert et al., 2015).

Muitas PRRs identificadas são receptores do tipo quinases (*Receptor-Like Kinases* - RLKs), contendo vários ectodomínios que reconhecem PAMPs ou DAMPs, um domínio transmembrana, e um domínio quinase intracelular, ou RLPs, que compartilham a mesma estrutura, mas falta o domínio quinase. Devido a RLPs não possuírem nenhum domínio quinase óbvio em sua região intracelular curta, eles provavelmente funcionam em conjunto com uma ou várias RLKs para a transdução do sinal intracelular (Zipfel, 2014).

A ativação de PRRs é frequentemente acompanhada por uma forma de morte celular programada nos locais da infecção chamada de resposta de hipersensibilidade (HR) que limita o crescimento do patógeno, embora a resistência das plantas nem sempre está associada a morte celular por HR (Padmanabhan; Cournoyer; Dinesh-Kumar, 2009; Greenberg; Yao, 2004)

Efetores são fatores de virulência que suprimem a defesa do hospedeiro por meio do ataque a PRRs ou da sinalização posterior (a jusante) a ativação de PRRs. A quantidade de efetores varia consideravelmente de acordo com o estilo de vida dos patógenos (Lowe; Howlett, 2012), sendo que as interações entre necrotróficos e seus hospedeiros são consideravelmente mais complexas do que anteriormente consideradas. Os efetores também podem desencadear respostas de defesa da planta, levando à resistência das plantas quando reconhecido diretamente ou indiretamente pelo sistema imune em uma relação gene-a-gene. Entre os efetores mais conhecidos encontram-se a fitotoxina coronatina em *Pseudomonas syringae*, que mimetiza o ácido jasmônico (Feys et al., 1994), polissacarídeos extracelulares em *B. cinerea* (El Oirdi et al., 2011), o ácido oxálico em *S. sclerotiorum* (Cessna et al., 2000) e efetores protéicos secretados através do sistema de secreção tipo III (TTSS) em bactérias (Gurlebeck et al., 2006).

Como elementos cruciais do ciclo coevolutivo do hospedeiro-patógeno, as plantas empregam uma família de receptores intracelulares polimórficos de ligação a nucleotídeos (*Nucleotide-Binding* - NB)/repetições ricas em leucina (*Leucine-Rich Repeats* -LRR) que interceptam efetores de patógenos e induzem uma resposta de resistência (ETI), que impede o crescimento de patógenos e está frequentemente associada à morte celular localizada do tipo HR em plantas (Jones; Dangl, 2006). Reações locais de resistência podem induzir a imunidade sistêmica de longa

duração denominada resistência sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance* - SAR), que prepara tecidos não infectados contra o ataque subsequente de patógenos (Fu; Dong, 2013).

A explicação mais parcimoniosa para a especificidade das proteínas NBS-LRR de plantas é que os patógenos são detectados através de interação direta de proteínas NB-LRR e efetores de patógenos. Muito pouco é conhecido sobre os eventos de sinalização necessários para ativar ETI mediada por NB-LRR. As proteínas NB-LRR, provavelmente, têm sua conformação modificada por proteínas *heat shock* ou outras chaperonas (Schulze-Lefert, 2004; Holt et al., 2005). Os LRRs parecem atuar como reguladores negativos que bloqueiam a ativação inadequada do NB. A ativação NB-LRR envolve mudanças conformacionais intra e intermoleculares e pode assemelhar-se ao mecanismo induzido pela qual a proteína animal relacionada Apaf-1 ativa a morte celular programada (Takken; Albrecht; Tameling, 2006).

A ativação de NB-LRR induz respostas diferenciais, como o acúmulo do hormônio ácido salicílico (SA) e de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos locais de infecção ou próximos, e sistemicamente (Dorey et al., 1997). A explosão oxidativa dependente de NADPH-oxidases, que acompanha a ETI, pode reprimir a disseminação da morte celular dependente de ácido salicílico nas células em torno dos sítios de infecção (Torres; Jones; Dangl, 2005). Mudanças locais e sistêmicas na expressão gênica são mediadas, em grande parte, por fatores de transcrição das famílias WRKY (possuem o domínio protéico WRKY) e TGA (ligam-se especificamente a variantes do palíndromo TGACGTCA) (Eulgem, 2005).

A hipótese da detecção direta por proteínas NB-LRR no reconhecimento de patógenos falha em explicar como um número limitado de proteínas de resistência de plantas pode reconhecer especificamente uma grande diversidade de patógenos potenciais e seus efetores. Essa aparente disparidade levou ao modelo indireto ou "modelo de guarda" de detecção de patógenos. Os princípios-chaves dessa hipótese são que diversos efetores possuem um alvo dentro da célula, e que este alvo ao ser modificado ativa uma proteína NB-LRR correspondente, levando a ETI (Jones; Dangl, 2006).

Três conseqüências importantes desse modelo, agora apoiado por evidências experimentais, são que: 1) diferentes efetores poderiam manipular o mesmo alvo do hospedeiro; (2) esse mecanismo poderia impulsionar a evolução de mais de uma proteína NB-LRR associada a um alvo de múltiplos efetores; e (3) esses NB-LRRs seriam ativados pelo reconhecimento de alterações no alvo pela ação dos efetores. Assim, esse mecanismo de detecção indireta permitiria a planta monitorar um número limitado de alvos-chave da patogênese e responder quando esses alvos são perturbados, limitando o número de proteínas de resistência necessárias para uma resistência adequada. Embora apenas algumas proteínas de resistência às plantas sejam

caracterizadas, existem evidências crescentes de que as plantas usam mecanismos diretos e indiretos de detecção de patógenos (Zhang et al., 2014; Khan; Subramaniam; Desveaux, 2016).

Um número de eventos celulares associados a PTI e ETI são conhecidos. Estes incluem despolarização da membrana plasmática, modificação da atividade de canais iônicos, rápido influxo de íons de cálcio do apoplasto, explosão de EROs, ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) ou proteína quinases dependentes de cálcio (CDPKs), reprogramação da expressão gênica, deposição de calose e lignina na parede celular em locais de tentativa de infecção e, frequentemente, morte celular programada localizada do tipo HR (McDowell; Dangl, 2000). Existe extensa sobreposição entre os perfis de expressão gênica elicitados por muitos PAMPs. O perfil de expressão gênica de PTI e ETI são bastante semelhantes, sugerindo que as respostas são as mesmas no geral, mas variam em magnitude (Boller; Felix, 2009; Schwessinger; Ronald, 2012).

O modelo de resistência gene a gene, que prevê um sistema de defesa do hospedeiro em múltiplas camadas, aplica-se particularmente bem à interação de plantas com muitos oomicetos, fungos e bactérias biotróficos e hemibiotróficos. Por outro lado, a resistência de plantas a patógenos necrotróficos é frequentemente poligênica (Brodersen et al., 2006; Mengiste et al., 2003; Nandi et al., 2005; Veronese et al., 2006). Para fungos necrotróficos e patógenos bacterianos que produzem toxinas não específicas e um grande número de enzimas de degradação da defesa celular e de supressão de defesa, existe, muitas vezes, pouca resistência efetiva, sugerindo que essas poderosas funções de virulência podem sobrepor-se aos processos de PTI e ETI. Em alguns casos, as toxinas efetoras são especificamente detectadas pelas proteínas do hospedeiro, e isso pode levar à suscetibilidade, ao invés de resistência (Friesen et al., 2008). Assim, além dos MAMPs, a detecção de DAMPs, provavelmente, desempenha um papel importante para a defesa celular contra necrotróficos (Mengiste, 2012).

Há ainda a resistência “*non-host*”, onde a maioria das plantas apresentam resistência à infecção pela maioria dos patógenos. Esta resistência pode ser mediada por pelo menos dois mecanismos. No primeiro, os efetores de um patógeno poderiam ser ineficazes no hospedeiro, resultando em pouca ou nenhuma supressão de PTI e falha no crescimento do patógeno. No segundo, um ou mais efetores do possível patógeno poderia ser reconhecido pelas proteínas NB-LRR de plantas não hospedeiras, resultando em ETI. Estes dois cenários prevêem diferentes resultados em relação ao tempo e amplitude da resposta que eles iriam desencadear, e eles também dão origem a diferentes pressões evolutiva tanto no hospedeiro quanto no patógeno (Nuernberger; Lipka, 2005; Jones; Dangl, 2006).

2.3. Participação dos hormônios vegetais clássicos de defesa primária e suas interações com o ácido abscísico na resistência a patógenos de estilos de vida contrastantes

Os hormônios vegetais são importantes moléculas sinalizadoras que integram estímulos bióticos (Bari; Jones, 2009). Classicamente, a sinalização por ácido salicílico (SA) regula a resistência a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto que vias relacionadas ao ácido jasmônico (JA) e ao etileno (ET) ativam a resistência contra necrotróficos. Essas duas vias são, muitas vezes, anagônicas: elevada resistência a patógenos biotróficos é frequentemente correlacionada com maior suscetibilidade a patógenos necrotróficos e vice-versa (Robert-Seilanianz; Jones, 2011).

O papel do SA como molécula sinalizadora para resistência a doenças foi demonstrado apenas em 1990, quando foram detectados aumentos nos níveis de SA antes do desenvolvimento da resistência a doenças locais e/ou sistêmicas em tabaco e pepino (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990). Análises de mutantes de tabaco e arábida, incapazes de acumular SA confirmou que o SA é necessário para a PTI, ETI e a SAR. A SAR é uma resistência duradoura e de amplo espectro a patógenos biotróficos. Porém, o SA não é o sinal móvel indutor de SAR (Vernooij et al., 1994; Pallas et al., 1996). A metilação de SA gera metil SA (MeSA), sendo esse o sinal móvel no floema, que quando convertido de volta a SA em tecidos não infectados ativa a SAR (Park et al., 2007).

O SA promove a resistência a inúmeros patógenos biotróficos, como *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasitica*, *Agrobacterium tumefaciens*, *tobacco mosaic virus* (TMV), e hemibiotróficos, como *Phytophthora infestans* (Malamy et al., 1990; Anand et al., 2008; Shibata et al., 2010). Essa resistência não é só dependente do estilo de vida do patógeno, mas também é dependente do hospedeiro. A comparação entre o transgênico *NabG* (incapaz de acumular SA por superexpressar uma hidroxilase de salicilato) em tomateiro e em tabaco com seus respectivos tipos selvagens, revelou que em tomateiro, o SA não está envolvido na defesa contra *O. neolycopersici*, mas o transgênico *NabG* de tabaco mostrou um aumento na suscetibilidade à infecção por *O. neolycopersici* (Achuo et al., 2004).

Em plantas, o SA é sintetizado em plastídios através de duas rotas a partir do corismato, um produto da via do chiquimato. Uma rota é através da isocorismato sintase (ICS), que acredita-se ser responsável por mais de 90% do SA sintetizado durante a ativação da resposta ao estresse (Wildermuth et al., 2001). A outra via é mediada pela fenilalanina amônia-liase (PAL) (Lee; Leon; Raskin 1995).

A proteína NPR1, um co-regulador transcricional de genes dependentes de SA, atua a jusante do SA e é um regulador chave da via dependente de SA (Cao et al., 1997). A superexpressão do gene *NPR1* resultou em aumento da resistência a doenças em diversas espécies de plantas, como cenoura (Wally et al., 2009), arroz (Fitzgerald et al., 2004; Chern et al., 2005), tabaco (Srinivasan et al., 2009), tomate (Lin et al., 2004) e trigo (Makandar et al., 2006). O SA promove redução no estado redox celular, que acaba decompondo o oligômero de NPR1 para a forma de monômero, o qual transloca-se para o núcleo. A regulação dos níveis de monômeros de NPR1 no núcleo também são dependentes de SA. NPR1 e seus homólogos NPR3 e NPR4 foram descritos como sendo receptores de SA (Fu et al., 2012; Wu et al., 2012). NPR3 e NPR4 atuam com proteínas ligases CUL3 (*Cullin 3*), que regulam a degradação de NPR1 mediada pelo proteassomo e diferem na afinidade de ligação ao SA e capacidade de ligação a NPR1, de modo que os níveis de SA determinam quando o NPR1 é direcionado para degradação. Quando os níveis de SA são baixos, o NPR4 interage com NPR1, levando à sua degradação e, desta forma, na ausência de SA a ativação transcricional é reprimida. Níveis altos de SA facilitam a ligação entre NPR1 e NPR3, levando à remoção de NPR1 (Fu et al., 2012) (Figura 2). Quando os níveis de SA são intermediários, a interação entre NPR1 e NPR3 é impedida, permitindo que o NPR1 se acumule e ative defesas dependentes de SA (Figura 2). Ao interagir com fatores de transcrição da família TGA, a NPR1 atua como um co-ativador da transcrição gênica, ativando genes de resposta a SA como fatores de transcrição WRKY e um conjunto de genes codificantes de proteínas relacionadas a patogênese (PR), que por sua vez regulam e amplificam respostas transcricionais a jusante (Wang et al., 2006; Eulgem; Somssich, 2007) e contribuem para o aumento da resistência.

Além das defesas dependentes de SA e NPR1, outras vias de sinalização de defesa que são independentes dessas moléculas têm sido descritas. O ataque por patógenos necrotróficos, bem como por insetos herbívoros, elicit a produção de um grupo grande e diversificado de ácidos graxos oxigenados (oxilipinas), também conhecidos como jasmonatos, que podem ser potentes reguladores da sinalização de defesa (Farmer, Almeras; Krishnamurty, 2003; Halitschke; Baldwin, 2004).

Figura 2. Sinalização de SA na resistência a patógenos. a, Na ausência de SA, a NPR1 é degradada no proteassomo por CUL3NPR4, levando a uma maior suscetibilidade a doenças. b, Em plantas WT, o SA basal pode se ligar ao complexo NPR4 para reduzir sua acessibilidade à NPR1 e permitir que alguma NPR1 se acumule para conferir resistência basal. c e d, Em resposta ao desafio do patógeno, os níveis de SA estão aumentados tanto local, quanto sistemicamente. O nível mais alto de SA dentro da lesão pode levar à degradação mediada de NPR1 por CUL3NPR3 para permitir a PCD e a resistência desencadeada por efetores (c). Nas células vizinhas, o nível mais baixo de SA limita a interação NPR1-NPR3, permitindo que a NPR1 se acumule para inibir a PCD e estabelecer a SAR (d). (Fu et al., 2012).

A síntese de jasmonatos ocorre através da via octadecanóide, que se inicia com a liberação de ácido linolênico da membrana do cloroplasto, catalisado por uma fosfolipase (Creelman; Mulpuri, 2002). O ácido linolênico liberado é subsequentemente oxigenado por lipoxigenases (LOX), gerando um derivado hidroperóxido (Feussner; Wasternack, 2002). O ácido 13-hidroperoxi-octadecatrienóico resultante é desidratado pela sintase de óxido de aleno (AOS) para um intermediário de óxido de aleno instável, que sofre ciclização para formar um anel de ciclopentenona contendo ácido 12-oxo-fitotodienoico (OPDA), mediado pela ciclase de óxido de aleno (AOC) (Laudert et al., 1996; Laudert; Weiler, 1998; Ziegler et al., 2000; Turner et al., 2002). OPDA é reduzido em um processo catalisado pela OPDA redutase 3 (OPR3), produzindo uma ciclopentenona intermediária (Schaller et al., 2000). A via octadecanóide é finalizada com três ciclos de β -oxidação para produzir o membro da família jasmonato mais conhecido, o hormônio JA (Creelman; Mulpuri, 2002; Turner et al., 2002).

Após sua biossíntese, o sinal de JA, é provavelmente percebido e transduzido por receptores específicos de JA. Os principais reguladores da via de sinalização JA são a proteína F-BOX COI1 e as proteínas repressoras JAZ (Thines et al., 2007; Katsir et al., 2008). Na ausência

de JA, as proteínas repressoras JAZ associam-se ao co-repressor TPL através da proteína adaptadora NINJA, ou com HDA6, reprimindo vários fatores de transcrição, entre os quais se encontram o MYC2, EIN3 e EIL1 (Song et al., 2014). Na presença de JA, o COI1 liga-se ao JA-Ile, a forma bioativa do JA, que direciona as proteínas repressoras JAZ para degradação pelo proteassomo. A liberação sucessiva de ativadores transcricionais leva à ativação de genes responsivos ao JA (Thines et al., 2007; Katsir et al., 2008; Gfeller; Liechti; Farmer, 2010).

Dois ramos são distinguidos na sinalização dependente de JA. O MYC2 é o principal regulador do ramo MYC, que é co-regulado por JA e ABA, ativando os genes marcadores a jusante *VSP2* e *LOX2* (Lorenzo et al., 2004; Vos et al., 2013). Os fatores de transcrição EIN3, EIL1 e ERF, bem como o ERF1 e ORA59 regulam o ramo ERF, que é co-regulado por JA e ET, ativando o gene marcador a jusante *PDF1.2* (Zhu et al., 2011; Pieterse et al., 2012; Wasternack; Hause, 2013).

O papel do *cross-talk* nas respostas induzidas por JA e SA está emergindo como uma parte vital na resistência de plantas. O efeito mais conhecido do *cross-talk* JA/SA é o papel antagônico que esses hormônios desempenham na regulação do outro. O SA favorece o desenvolvimento da doença causado por patógenos necrotróficos, pela supressão dos genes de defesas dependentes de JA (El Oirdi et al., 2011). Usando o mutante do receptor JA, *coi1-1*, Van der Does et al. (2013) demonstraram ainda que o SA pode suprimir o gene *PDF1.2* ativado por ERF1, independentemente do COI1. Isso indicou que o SA antagoniza a sinalização de JA a jusante de COI1, possivelmente por interferir com fatores de transcrição regulados por JA. Posteriormente, o fator de transcrição ORA59 foi demonstrado ser degradado por SA. Em nível de sinalização de SA, o mutante *npr1-1* permitiu mostrar que o regulador NPR1 é essencial para a supressão da expressão gênica responsiva a JA (Spoel et al., 2003). Além disso, vários fatores de transcrição WRKY e TGA têm se mostrado importantes para o *cross-talk* SA/JA (Pieterse et al., 2012; Solano; Gimenez-Ibanez, 2013). No entanto, os mecanismos pelos quais esses reguladores transcricionais reprimem a sinalização de JA na presença de SA são em grande parte desconhecidos.

O etileno é a molécula mais simples de um hidrocarboneto insaturado (C_2H_4). Este hormônio funciona como um importante controlador de PTI contra patógenos biotróficos e um regulador central da via de sinalização imunológica das plantas. O etileno atua como um modulador positivo ou negativo da resistência a doenças dependendo da interação planta-patógeno (Broekaert et al., 2006; Groen; Whiteman, 2014). Geralmente, considera-se que o etileno funciona em conjunto com o JA na defesa contra patógenos necrotróficos através da ativação do fator de transcrição ERF1 (Lorenzo et al., 2003).

No geral, a biossíntese de etileno começa com a transformação do aminoácido metionina a S-adenosilmetionina (SAM), que por sua vez é convertido em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), catalisada pela ACC sintase (ACS). Finalmente, o etileno é sintetizado a partir de ACC pela catálise de uma segunda enzima, a 2-oxoglutarato ACC oxidase (ACO). Os níveis destas duas enzimas chave ACS e ACO são determinadas pelo etileno em um ciclo de *feedback* positivo conhecido como ciclo Yang (Wang; Li; Ecker, 2012).

A cascata de sinalização de etileno começa com a ligação do etileno aos seus receptores. Em plantas, os receptores de etileno constituem uma família multimembro, que em *arabidopsis* é composto por ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 e EIN4 (Hua; Meyerowitz, 1998). Esses receptores funcionam como reguladores negativos da via, ativando CTR1, um regulador negativo da via, reprimindo ativamente a resposta do etileno na ausência do hormônio (Hua; Meyerowitz, 1998; Kieber et al., 1993). A proteína EIN2 consiste em uma região hidrofóbica N-terminal constituída por 12 domínios transmembranares e um C-terminal hidrofílico (Alonso et al., 1999), que abriga uma sequência conservada de localização nuclear (Wen et al., 2012). O CTR1 inativa a proteína EIN2 por fosforilação direta em sua extremidade C-terminal.

Na presença de etileno, ocorre um movimento da extremidade C-terminal do EIN2 da membrana do retículo endoplasmático (ER) para o núcleo, permitindo que o sinal alcance os componentes EIN3 e EILs (Cho et al., 2012). EIN3 e seus homólogos (EILs, EIL1 em *arabidopsis*) são proteínas de curta duração que atuam como reguladores positivos da via de sinalização de etileno. EIN3 e EIL1 são dois fatores de transcrição chaves que geram respostas ao etileno e são ambos necessários e suficientes para a regulação da expressão de genes em resposta ao etileno, incluindo o gene F-box *EBF2* o gene do fator de transcrição ERF1 (Solano et al., 1998). As vias etileno e jasmonato convergem na ativação transcricional do fator de transcrição ERF1 (Lorenzo et al., 2003). A expressão de *ERF1* pode ser ativada rapidamente por etileno ou jasmonato ou pode ser ativada sinergicamente por ambos os hormônios conferindo resistência a fungos necrotróficos, como *B. cinerea* e *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo et al., 2002; Lorenzo et al., 2003).

O etileno também interage com as vias de sinalização de SA. Por exemplo, o etileno ativa a expressão do gene *PR1* em *arabidopsis*, enquanto o SA induz a expressão de genes relacionados a enzimas de biossíntese de etileno, indicando uma cooperação positiva desses dois hormônios (De Vos et al., 2006). No entanto, evidências da interação antagônica entre etileno e SA também existem. O etileno exerce efeito negativo sobre a expressão de *PR1* em plantas de *arabidopsis* aos 7 dias após a inoculação com *Verticillium longisporum* (Johansson; Staal; Dixelius, 2006). O mutante *ein3*, defectivo na sinalização de etileno, apresentou resistência a infecção por

patógenos bacterianos, enquanto o duplo mutante *ein3eil1* de etileno acumulou constitutivamente elevados níveis de SA, sugerindo um papel negativo da sinalização de etileno na biossíntese de SA (Chen et al., 2009).

Como hormônios associados a resposta de resistência/defesa clássicos, a resistência mediada por SA e respostas mediadas por JA/ET são geralmente eficazes contra diferentes tipos de patógenos. Esses três hormônios interagem sinergicamente, bem como antagonisticamente após a invasão de patógenos. Outros hormônios, como o ácido abscísico (ABA), auxinas (ácido indol-3-acético; IAA), citocininas (CKs), brassinosteróides (BRs), giberelinas (GA) e estrigolactonas, que são mais conhecidos por seus papéis na tolerância ao estresse ou crescimento e desenvolvimento das plantas, também regulam a defesa, sozinho ou em conjunto com os hormônios clássicos de defesa primária (Ton; Flors; Mauch-Mani, 2009; Robert-Seilantantz et al., 2011; Torres-Vera et al., 2014).

O hormônio ABA tem emergido como importante regulador das respostas de defesa biótica, promovendo resistência em algumas interações planta-patógeno, enquanto aumenta a suscetibilidade em outras. O ABA controla numerosos processos fisiológicos em plantas e é mais conhecido por seu papel regulador na tolerância ao estresse abiótico (Ton; Flors; Mauch-Mani, 2009). É um hormônio terpenóide derivado da clivagem de carotenóides C_{40} oriundos 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato da via plastidial. O primeiro precursor do ABA é a zeaxantina produzido por hidroxilação cíclica do licopeno, via intermediário caroteno. As etapas subsequentes incluem a síntese dos *cis* isômeros da violaxantina e neoxantina, cada um clivado para gerar o precursor de 15 carbonos do ABA. A formação de violaxantina é catalisada pela enzima zeaxantina epoxidase (ZEP), via o intermediário anteraxantina (Seo; Koshiba, 2002; Nambara; Marion-Poll, 2005; Hauser; Waadt; Schroeder, 2011). Em condições de elevada luminosidade, uma resposta reversa acontece nos cloroplastos, catalisada pela violaxantina de-epoxidase (VDE). Essa enzima liga o ciclo das xantofilas ao ciclo do ascorbato-glutationa, por meio do uso do ascorbato como substrato na produção de zeaxantina (Bratt et al., 1995; Baroli; Niyogi, 2000; Müller; Li; Niyogi, 2001).

A enzima dioxigenase de 9-*cis*-epoxycarotenoid (NCED) cliva isômeros *cis* de violaxantina e neoxantina a um produto com 15 carbonos denominado xantoxina e a um metabólito com 25 carbonos. Devido às reações enzimáticas subsequentes ocorrerem no citosol (Cheng et al., 2002), presume-se que a xantoxina migre dos plastídeos para o citosol por um mecanismo desconhecido. O ABA, em sua forma biologicamente ativa, é produzido a partir da xantoxina por dois passos enzimáticos, por meio do intermediário aldeído abscísico. A conversão de xantoxina a aldeído abscísico é catalisada pela enzima ABA2. A oxidação do aldeído abscísico

a ácido carboxílico é o passo final na biossíntese de ABA, catalisada por uma oxidase de aldeído abscísico, AO (Nambara; Marion-Poll, 2005).

Em tomateiro, existem três mutantes deficientes em ABA: *notabilis* (*not*), *flacca* (*flc*) e *sitiens* (*sit*) (Imber; Tal, 1970; Groot; Karssen, 1992; Thompson et al., 2004; Taylor et al. 2000). O gene *not* codifica uma NCED induzida por estresse (Burbidge et al. 1999; Thompson et al., 2004), enquanto dois estudos bioquímicos independentemente indicaram que tanto *flc* e *sit* são prejudicados na conversão de ABA-aldeído para ABA (Sindhu; Walton 1988; Taylor et al. 1988). O mutante *flc* foi mostrado ter uma deleção de 6 pb fora do quadro de leitura causando uma deficiência em uma sulfúrilase que produz a forma sulfúrilada do cofator de molibdenio (MoCo), que é necessário para ambas atividades de aldeído oxidase e xantina desidrogenase (Sagi et al. 2002). O mutante *sit* é deficiente na atividade enzimática que codifica a AO na etapa final da biossíntese do ABA (Harrison et al., 2011).

O catabolismo do ABA é amplamente categorizado em dois tipos de reações: hidroxilação e conjugação. Existem três vias de hidroxilação do ABA que oxidam um dos grupos metila da estrutura do anel (C-7', C-8' e C-9'); a hidroxilação na posição C-8' é comumente considerada a via catabólica predominante do ABA (Cutler; Krochko, 1999; Zeevaart; Creelman, 1988). Os genes *CYP707A* de arábidoopsis foram identificados como codificadores de ABA 8'-hidroxilases (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004). Além das vias de hidroxilação, o ABA e seus catabólitos hidroxilados (8'-hidroxi ABA, PA, DPA e epi-DPA) podem ser conjugados a glicose (Boyer; Zeevaart, 1982; Hirai; Kondo; Ohigashi, 2003). Os conjugados de ABA são, geralmente, fisiologicamente inativos e se acumulam em vacúolos durante o envelhecimento, porém podem participar da sinalização da raiz-parte aérea (Bray; Zeevaart, 1985; Lehmann; Glund, 1986; Sauter; Dietz; Hartung, 2002).

Os primeiros eventos da via de sinalização de ABA ocorrem através de um módulo de sinalização central de três classes de proteínas: as proteínas PYRABACTIN (4-bromo-N-[pyridin-2-yl methyl}naphthalene-1-sulfonamide) RESISTANCE (PYR)/ REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (RCAR) (Ma et al. 2009; Park et al. 2009), a proteína fosfatase 2Cs (PP2Cs) e a proteína quinase relacionada a SNF1 2s (SnRK2s). Neste modelo, as PYR/RCARs atuam como receptores de ABA inibindo as PP2Cs na presença de ABA; as PP2Cs atuam como reguladores negativos de SnRK2, e a SnRK2s atua como regulador positivos da sinalização a jusante (Ma et al. 2009; Park et al. 2009; Umezawa et al. 2009; Vlad et al. 2009).

O local de percepção do ABA foi debatido durante vários anos, com evidências tanto para receptores extracelulares como intracelulares. Estudos iniciais sugeriram a presença de um receptor de ABA transmembranar (Hornberg; Weiler, 1984). Na sequência, um modelo de

percepção de ABA extracelular também foi sugerido (Schultz; Quatrano, 1997; Gilroy; Jones, 1994; Jeannette et al., 1999). No entanto, a dependência do pH extracelular nas respostas de ABA também indicou um local de ação do ABA intracelular (Anderson; Ward, Schroeder, 1994). Sendo assim, foram encontrados receptores de ABA localizados em diferentes partes da célula.

O ABA possui um papel diferenciado ao longo das diversas fases de defesa da planta. Assim, Ton, Mauch-Mani e Flors (2009) dividiram a participação do ABA em três fases de doenças ocasionadas por patógenos. Durante a Fase I, o ABA estimula a resistência contra fungos e oomicetos por mediação do fechamento estomático (Melotto et al., 2006; Melotto et al., 2008; Guimaraes e Stotz, 2004). Ao longo da Fase II, o ABA promove a deposição de calose e a geração de EROs em resposta à infecção por fungos e oomicetos. No entanto, em certos casos, a produção de ABA pode suprimir a produção inicial de EROs causando o aumento da suscetibilidade, como observado durante a interação entre o tomateiro e *B. cinerea* (Asselbergh et al., 2007). Por outro lado, os componentes da via de resposta ao ABA pode suprimir a deposição de calose induzida por bactérias e, portanto, contribuir negativamente para a resistência (de Torres-Zabala et al., 2007; Clay et al., 2009). Durante a Fase III, o ABA interage com os hormônios SA, JA e vias de defesa dependentes de ET. O ABA inibe a resistência dependente de SA (Yasuda et al., 2008; Mohr; Cahill, 2007), suprime as respostas de JA, que são reguladas sinergicamente por ET (Anderson et al., 2004), mas pode promover um ramo da resposta ao JA, que age antagonisticamente com ET (Lorenzo et al., 2004).

As primeiras indicações para um papel regulador do ABA na resistência às doenças fúngicas veio da descoberta de que o mutante *sit* de tomateiro é resistente ao fungo necrotrófico *B. cinerea* (Audenaert; De Meyer; Höfte, 2002). Foi demonstrado posteriormente que essa resistência é baseada no aumento do acúmulo de EROs durante as fases iniciais da penetração no tecido (Asselbergh et al., 2007). O pré-tratamento com o bloqueador 2-desoxi-D-glicose da síntese de calose não tem influência sobre a resistência induzida em *sitiens*, mas reduz a resistência basal em plantas do tipo selvagem. Assim, o aumento da produção de EROs em *sitiens* precede a defesa mediada pela deposição de calose contra *B. cinerea* (Asselbergh; Höfte, 2007).

Como mencionado anteriormente, o ascorbato é utilizado como substrato da enzima VDE para produção de zeaxantina. O mutante *vtc1* (vitamina C1) em arábida estimula a produção de ABA (Pastori et al., 2003). A mutação *sitiens* em tomateiro bloqueia a última etapa da biossíntese de ABA. Se essa mutação resultar em um acúmulo de precursores ABA, um desequilíbrio no ciclo da xantofila poderia ocorrer e causar um aumento na atividade da VDE (Ton; Flors; Mauch-Mani, 2009). VDE converte violaxantina em zeaxantina e, ao fazê-lo, oxida-se ascorbato a de-hidroascorbato. O resultado da presença da mutação seria a diminuição do

ascorbato reduzido, que poderia explicar o aumento da capacidade de produção de EROs em *sitiens* (Figura 3) (Ton; Flors; Mauch-Mani, 2009).

Figura 3. Via biossintética de ABA e sua interação com o ciclo ascorbato-glutationa. A possível mutação em no gene *sitiens*, que codifica uma oxidase do ABA aldeído, pode gerar acúmulo de intermediários na via e regular de forma diferencial o ciclo de ascorbato-glutationa. O aumento da atividade da enzima VDE, antagoniza a produção de ABA e permite a oxidação do ascorbato e da glutatona (Ton. Flors; Mauch-Mani, 2009).

Em tomateiro, foi observado que a deficiência de ABA no mutante *sitiens* provoca hipersensibilidade ao benzotiadiazol, um análogo ao SA, exibindo uma indução da atividade da PAL após o ataque do patógeno (Audenaert et al., 2002). A comparação do transcriptoma do mutante *sit* e do tomateiro selvagem confirmou a ativação transcricional da via biossintética de fenilpropanóides em *sit*, e também mostrou um aumento no acúmulo de transcritos relacionados à defesa induzidos por SA, como *PR1*, antes e logo após a inoculação com *B. cinerea* (Asselbergh et al., 2007). Foi mostrada que a calose bloqueia respostas de defesa induzidas por SA (Nishimura et al., 2003); portanto, a ação do ABA nas respostas dependentes de SA pode ser, em parte, devido ao aumento da deposição de calose.

O ABA promove suscetibilidade a *F. oxysporum* em arabis suprimindo a indução dos genes de defesa de JA e ET como *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*), *CHI* (*CHITINASE*), *PR4* (*PATHOGENESIS RELATED PROTEIN 4*) e *LEC* (*LEAFY COTYLEDON*) (Anderson et al., 2004). A expressão desses genes é regulada pela transcrição dos fatores *ORA59* (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR domain transcription factor 59*) e *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR 1*), no qual integra sinais de defesa dependentes de JA

e ET (Lorenzo et al., 2003; Pre et al., 2008). Por outro lado, a expressão de outros genes induzidos por JA, como *VSP2* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2*), são regulados pelo fator de transcrição MYC2, e foi sugerido que o ABA precede o JA na ativação de respostas a ferimentos mediadas por MYC2 (Lorenzo; Solano, 2005). Portanto, o MYC2 funciona como um mediador de ABA para reprimir as respostas a patógenos induzidas por JA/ET (Anderson et al., 2004; Lorenzo et al., 2004; Yadav et al., 2005; Dombrecht et al., 2007). Esses dois ramos da via de resposta ao JA agem antagonisticamente no outro (Lorenzo et al., 2004).

O ácido abscísico parece desempenhar um papel importante na infecção por *S. sclerotiorum*. A aplicação de ABA em meio BDA contendo micélio reduziu a taxa de crescimento do fungo; no entanto, quando o ABA foi pulverizado em plantas de feijão e pepino, houve um estímulo do desenvolvimento da doença (Al-Masri et al., 2002). Contudo, a aplicação exógena de ABA em plantas de canola resultou na redução do tamanho da lesão causada por *S. sclerotiorum* (Nováková et al., 2014), além de um forte aumento nos níveis de ABA e uma indução da expressão do gene marcador *RD26*, relacionado ao ABA, em plantas inoculadas com *S. sclerotiorum*, enquanto que a expressão gênica de *NCED3* não foi alterada (Nováková et al., 2014).

Assim como ocorre em canola e tomateiro, em arábida uma contribuição positiva do ABA na resistência é sugerida, onde mutantes insensíveis a ABA apresentam elevada suscetibilidade a infecção por *S. sclerotiorum* (Perchev et al., 2010). Apesar de a infecção por *S. sclerotiorum* aumentar a condutância estomática, Guo e Stotz (2010) usando mutantes insensíveis a ABA e mutantes afetados no fechamento estomático, provaram que o fechamento dos estômatos não regula a suscetibilidade a *S. sclerotiorum* em arábida. Somente os mutantes de ABA apresentaram elevada suscetibilidade a *S. sclerotiorum*, enquanto que não houve diferença nos mutantes afetados para o fechamento estomático (Guo; Stotz, 2010), concluindo que a participação do ABA na resistência a *S. sclerotiorum* não está relacionada a abertura estomática. Folhas de arábida inoculadas com *S. sclerotiorum* acumularam quantidades substanciais de zeaxantina, em detrimento da violaxantina e neoxantina, reduzindo a biossíntese do ABA e as respostas de defesa, resultando em um aumento da suscetibilidade de arábida a *S. sclerotiorum* (Zhou et al., 2015).

Um estudo sobre o efeito da seca, do estresse salino e do ABA na resistência do tomateiro à *O. neolyopersici* mostrou que o estresse salino não reduziu significativamente a infecção por *O. neolyopersici*, assim como nenhum aumento endógeno do ABA foi observado. Já o estresse hídrico aumentou cerca de duas vezes a concentração de ABA endógeno, restringindo o desenvolvimento de *O. neolyopersici* em tomateiro (Achuo et al., 2006). Em contraste, o mutante *sitiens* apresentou maior resistência a *O. neolyopersici* em comparação com o tipo selvagem. Já a

aplicação exógena de ABA causou um aumento na susceptibilidade do *sitiens* ao patógeno (Achu et al., 2006). Desta forma, parece evidente que o ABA participa da regulação da resistência a *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici*.

Por sua vez, os patógenos adotaram estratégias inovadoras para manipular os hormônios vegetais que regulam a defesa. As intervenções, frequentemente, empregadas por patógenos de plantas envolvem o sequestro, evasão ou interrupção das vias de sinalização e/ou *cross-talk* hormonal. O estilo de vida de um patógeno muitas vezes determina o tipo de estratégia de intervenção adotada (Glazebrook, 2005). A ativação de uma via de sinalização de um hormônio que regula negativamente a morte celular e/ou senescência pode ser benéfica para patógenos biotróficos que requerem células hospedeiras vivas para completar seus ciclos de vida. Em adição ou alternativamente, patógenos biotróficos podem suprimir vias de sinalização que promovem a morte celular e necrose para manter o hospedeiro vivo, enquanto for necessário. Como exemplos, os efetores HopI1 de *P. syringae* e Cmu1 do fungo biotrófico *Ustilago maydis* interferem no acúmulo de SA durante o desenvolvimento das doenças (Djamei et al., 2011; Xin; He, 2013). O efector XopJ do patógeno bacteriano *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* também suprime defesas mediada por SA e o desenvolvimento da necrose foliar por inibição da atividade do proteassomo (Üstün; Bartetzko; Börnke, 2013).

Em contraste, os patógenos necrotróficos manipulam as vias hormonais que induzem a morte das células e tecidos do hospedeiro. A ativação da via do JA promove a suscetibilidade a *P. syringae* em arabis. O efector AvrB, um tipo de proteína quinase, ativa a sinalização de JA. AvrB associa-se a proteínas RAR1, que codifica um componente crítico de sinalização de defesa (Shang et al., 2006). Esse patógeno também produz uma molécula chamada coronatina, que se assemelha ao ácido jasmônico, facilitando a abertura do estômato e a infecção (Melotto et al., 2006; Lee et al., 2013). A proteína SSITL (*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM INTEGRIN-LIKE*), um efector secretado produzido por *S. sclerotiorum*, suprime as defesas dependentes de JA (Zhu et al., 2013); porém o mecanismo permanece desconhecido. O patógeno necrotrófico *B. cinerea* produz um exopolissacarídeo indutor da via de SA que antagoniza a via de sinalização JA, desse modo permitindo que o fungo se desenvolva com sucesso no seu hospedeiro (El Oirdi et al., 2011).

A defesa de plantas contra patógenos não é somente regulada pelos hormônios clássicos de defesa, mas também por todos os hormônios, que foram descobertos originalmente por seus efeitos no crescimento ou desenvolvimento. Além dos hormônios, a homeostase hormonal e o *cross-talk* entre eles parecem ser características importantes na regulação da defesa, que por outro lado podem ser alterados por patógenos como um mecanismo para facilitar a infecção. A

diversidade de patógenos e de hospedeiros faz com que cada interação seja única, dificultando a obtenção de um modelo válido de visão integrada da sinalização hormonal no resultado da resposta imune da planta.

2.4. Sinalização molecular e estratégias de defesa de plantas contra patógenos

As plantas têm múltiplas linhas de defesa para evitar a infecção por patógenos invasores. O reconhecimento de PAMPs, MAMPs, DAMPs ou proteínas efetoras de patógenos desencadeia várias respostas de defesa, incluindo o fluxo de cálcio, a ativação de várias proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a indução da biossíntese de hormônios vegetais (Xu et al., 2014). Esses eventos iniciais estão envolvidos na sinalização das respostas de defesa intermediária e tardia, incluindo a ativação de inúmeros genes de defesa, fortalecimento da parede celular, biossíntese de fitoalexinas, HR e, eventualmente, a resistência induzida (Ausubel, 2005; Boller; Felix, 2009, Coll; Epple; Dangl, 2011; Dixon, 2001, Glazebrook, 2005, Greenberg; Yao, 2004, Jones; Dangl, 2006).

A ativação de MAPK é um dos primeiros eventos de sinalização após a planta detectar o patógeno invasor (Ichimura et al., 2002, Meng; Zhang, 2013). As cascatas de MAPK das plantas desempenham papéis centrais na via de sinalização de PTI através da transdução de sinais de receptores PRR para componentes a jusante (Chisholm et al., 2006, Dodds; Rathjen, 2010; Rodriguez; Petersen; Mundy, 2010, Tena; Boudsocq; Sheen; 2011). Vários PRRs mostraram desencadear a sinalização de MAPK na percepção de PAMPs. A ativação de MAPKs é realizada por meio de fosforilações realizadas por suas quinases a montante, MAPK quinases (MAPKKs), também conhecidas como MAPK e ERK quinase (MEKs). MAPKKs, por sua vez, são fosforiladas pelas suas quinases a montante, MAPKK quinases ou MEK quinase (MAPKKKs ou MEKKs). As três cascatas de quinases, conhecidas como cascatas MAPK, são módulos de sinalização importantes, que funcionam a jusante de receptores e convertem os sinais gerados nos receptores em respostas celulares em plantas (Widmann et al., 1999; Chang; Karin, 2001).

Os receptores PRRs mais bem caracterizados em plantas incluem o receptor FLS2 de flagelina bacteriana, que reconhece um peptídeo conservado de 22 aminoácidos (flg22) da flagelina (Gomez-Gomez; Boller, 2000); o receptor EF-Tu do fator de alongamento bacteriano EFR, que reconhece uma sequência de 18 aminoácidos conservados (elf18) de EF-Tu (Zipfel et al., 2006); e o receptor de quitina CERK1 de *Arabidopsis* (Miya et al., 2007, Wan et al., 2008). Ambas flg22 e elf18 podem desencadear uma forte e transitória ativação de MAPKs em *arabidopsis*, incluindo MPK3, MPK6, MPK4 e MPK11 (Asai et al., 2002, Suarez-Rodriguez et al.,

2007; Ranf et al., 2011; Bethke et al., 2012). Após a estimulação por PAMPs, tanto o FLS2 como o EFR formam heterodímeros com BAK1, um membro da subfamília de receptores quinases da embriogênese somática (SERK), semelhantes a receptores RLKs (Chinchilla et al., 2007). Recentemente, foi mostrado que BKK1, outro membro SERK, também é requerido para ativação de MAPK induzida por flg22 e elf18, e acredita-se que atue cooperativamente com BAK1 na sinalização de PAMP (Roux et al., 2011). Duas cascatas de MAPK são ativadas em *arabidopsis* na percepção da flg22. A primeira cascata MAPK a jusante do FLS2 consiste em MEKK1 (uma MAPKKK), MKK4/MKK5 (duas MAPKKs redundantes) e MPK3/MPK6 (duas MAPKs parcialmente redundantes) (Asai et al., 2002). A segunda cascata de MAPK ativada por flg22 é composta por MEKK1, MKK1/MKK2 (duas MAPKKs redundantes) e MPK4 com base em estudos genéticos e bioquímicos (Ichimura et al., 2006; Nakagami et al., 2006; Qiu et al., 2008; Suarez-Rodriguez et al., 2007). A cascata MPK3/MPK6 é reguladora positiva das respostas de defesa (Pedley; Martin, 2005; Pitzschke; Schikora; Hirt, 2009; Rodriguez; Petersen; Mundy, 2010) e em *arabidopsis* também são ativadas pelo elicitor de quitina (Miya et al., 2007) e por poligalacturonases bacterianas, um PAMP estruturalmente relacionado à quitina (Gust et al., 2007).

Por meio da fosforilação de proteínas alvo, incluindo enzimas e fatores de transcrição, as MAPKs podem controlar a síntese e/ou sinalização de hormônios de defesa, reprogramar a expressão gênica e direcionar o fluxo metabólico para a síntese de metabólitos antimicrobianos, entre outras respostas de defesa. MAPKs podem ativar a expressão de genes de defesa através de fosforilação direta de fatores de transcrição a jusante. Em *arabidopsis*, MPK6 interage e fosforila ERF104, um membro da família de fatores de resposta ao etileno, que ativam os genes de defensinas *PDF1.2a* e *PDF1.2b* (Bethke et al., 2009). VIP1, um fator de transcrição bZIP, é fosforilado por MPK3, que conseqüentemente leva à realocização de VIP1 do citoplasma para o núcleo para ativar o gene relacionado à patogenicidade *PR1* (Djamei et al., 2007).

Em resposta a um ataque de patógenos, a produção de compostos antimicrobianos de baixo peso molecular conhecidos como fitoalexinas é uma parte importante do repertório de defesa vegetal (Hammerschmidt, 1999; Dixon, 2001; Ahuja; Kissen; Bones, 2012). Famílias diferentes de plantas produzem diferentes classes de fitoalexinas (Ahuja; Kissen; Bones, 2012). Camalexina (3-tiazol-20-il-indole) é a principal fitoalexina produzida em *arabidopsis* e brássicas (Tsuji et al., 1992; Ahuja; Kissen; Bones, 2012). A produção de camalexina pode ser induzida em *arabidopsis* por uma série de patógenos biotróficos e necrotróficos (Glazebrook; Ausubel, 1994; Qiu et al., 2008; Ren et al., 2008). Nos últimos anos, a biossíntese e regulação da camalexina em *arabidopsis* foram relativamente bem estudadas (Ahuja; Kissen; Bones, 2012). Evidências

emergentes sugerem que as MAPKs desempenhem papéis-chave na regulação da produção de camalexina. A expressão constitutiva de MKK9, que ativa o MPK3/MPK6, induz a acumulação de camalexina (Xu et al., 2008; Su et al., 2011). Foi observado também que o fator de transcrição WRKY33 também controlou a produção de camalexina através de sua interação com a MPK4 (Qiu et al., 2008).

As EROs são moléculas derivadas, ativas ou parcialmente reduzidas, do oxigênio molecular como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) (Apel; Hirt, 2004). As espécies reativas de nitrogênio (ERN) também podem ser formadas na fase inicial das interações com patógenos (Luis et al., 2006). Dentro da célula, essas e outras EROs de vida curta, podem reagir de forma não específica e rápida com macromoléculas, incluindo DNA, proteínas, lipídios e carboidratos causando danos moleculares, como mutações de DNA, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, levando à morte celular e ao envelhecimento progressivo do organismo (Sharma et al., 2012). As enzimas NADPH oxidase, peroxidases, superóxido dismutase (SOD), oxalato oxidases, lipoxigenases, quinona redutases e aminas oxidases foram sugeridas de participar na geração de EROs, após a infecção por patógenos (Shetty et al., 2008). O acúmulo de EROs no apoplasto de tecidos vegetais infectados por patógenos é, principalmente, atribuído às isoformas de NADPH oxidases localizadas na membrana plasmática (Sagi; Fluhr, 2006). Em folhas de *Arabidopsis* a isoforma NADPH oxidase RBOHD é a principal responsável por uma explosão oxidativa induzida por patógenos (Jabs; Dietrich; Dangl, 1996).

Em condições fisiológicas de homeostase, essas moléculas são eliminadas por diferentes componentes da defesa antioxidante. No entanto, se o equilíbrio entre a produção e a remoção de EROs for alterado, os níveis intracelulares de EROs podem aumentar, resultando em alterações no transcriptoma celular. Além disso, as explosões locais de EROs mostraram estar envolvidas em vários processos de diferenciação. Isso indica que, apesar de seu efeito tóxico, a maioria dos organismos se adaptou à existência de EROs e desenvolveu processos para usá-los como mensageiros secundários para transduzir sinais extracelulares para o núcleo (Apel; Hirt, 2004; Foyer; Noctor, 2005).

Em geral, o acúmulo de EROs (explosão oxidativa) ocorre na interação incompatível entre planta e o patógeno biotrófico, mas não na interação compatível, como foi observado em oídio de cevada (Thordal-Christensen et al., 1997; Vanacker; Carver; Foyer, 2000), na ferrugem do trigo (Wang et al., 2007) ou nas interações da ferrugem da aveia, onde EROs e NO foram acumuladas (Tada et al., 2004). No caso de interações biotróficas, a resistência gene a gene é uma das formas mais eficazes de defesa de plantas. Este tipo de resistência é frequentemente

associado à HR (Jones; Dangl, 2006), uma morte celular programada que envolve o rápido acúmulo de EROs. Como os biotróficos precisam de células vegetais vivas e as EROs são prejudiciais também aos patógenos biotróficos (Ouf et al., 1993; Király; El-Zahaby, 2000), a explosão oxidativa não é favorável para a infecção por patógenos biotróficos.

Supõe-se que, em contraste com os patógenos biotróficos, nas interações entre planta e um patógeno necrotrófico, a indução da morte celular pelo patógeno e o acúmulo de EROs normalmente promovem o crescimento do patógeno e o desenvolvimento da doença. Os fungos necrotróficos devem sobreviver em ambiente hostil, de uma reação prévia de resistência do hospedeiro, muito provavelmente pela ação de uma série de enzimas, incluindo antioxidantes, que removem ou inativam EROs (Mayer; Staples; Gil-ad, 2001).

Um fator interessante nas interações entre plantas e patógenos necrotróficos é o ácido oxálico. Muitos patógenos necrotróficos produzem essa fitotoxina inespecífica como um fator chave de patogenicidade, incluindo dois fungos muito importantes economicamente, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* (Gentile, 1954; Cessna et al., 2000). Ambos os patógenos têm uma ampla gama de hospedeiros e importância econômica. Muito recentemente, foi feita uma análise genômica de *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*, a fim de entender melhor a complexidade da patogenicidade necrotrófica e sua ampla gama de hospedeiros (Amselem et al., 2011). O arsenal de genes associados à necrose foi similar entre os dois patógenos, incluindo genes envolvidos na degradação da parede celular e na produção de ácido oxálico (Amselem et al., 2011). Cessna et al. (2000) relataram que o ácido oxálico suprime a explosão oxidativa das células da planta hospedeira, defendendo assim o patógeno. No entanto, recentemente, Williams et al. (2011) descobriram que a OA pode induzir a morte celular programada (PCD) e desencadear a explosão oxidativa na célula hospedeira. Assim, parece que o OA produzido por *Sclerotinia* inicialmente suprime e depois induz o acúmulo de EROs em tecidos do hospedeiro durante interação compatível para alcançar sucesso na infecção (Williams et al., 2011). Estudos com mutantes do fungo deficientes em OA demonstraram que esta molécula é um supressor da defesa de plantas; permitindo que o fungo evada o reconhecimento (Williams et al., 2011). Na ausência de OA, a planta hospedeira é capaz de reconhecer o patógeno invasor e montar uma defesa que inclua uma explosão oxidativa pronunciada e deposição de calose (Liang et al., 2015).

De acordo com a hipótese de que a inibição do acúmulo de EROs não é favorável para patógenos indutores de necrose, a elevação da capacidade antioxidante das plantas suprimiu efetivamente os sintomas necróticos induzidos por fungos necrotróficos (Barna; Ádám; Király, 1993; Barna et al., 2003), vírus incompatíveis (Pogány et al., 2004) e bactérias (Barna; Smigocki; Baker, 2008).

A morte celular programada (*Programmed Cell Death* – PCD) é uma forma geneticamente controlada e organizada de morte celular que funciona na eliminação de células desnecessárias ou envelhecidas. A PCD é essencial para o crescimento e desenvolvimento de organismos multicelulares, bem como para uma resposta adequada ao ambiente, incluindo a HR em interações com patógenos biotróficos (Gadjev; Stone; Gechev, 2008). A HR e a autofagia são dois tipos distintos de PCD. Talvez a PCD mais conhecida em plantas em resposta a patógenos seja a resposta de hipersensibilidade associada com a ETI, que é desencadeada quando o hospedeiro tem um gene R dominante que corresponde a um gene avr dominante no patógeno. A HR é caracterizada pela resposta rápida e localizada, geralmente acompanhada de uma explosão oxidativa, aumento nos níveis de SA e deposição de calose (Thordal-Christensen et al., 1997; Dangl; Jones, 2001).

Os necrotróficos podem causar sintomas da doença e PCD em tecidos vegetais por meio da produção de fitotoxinas (Coffeen; Wolpert, 2004). O efeito oposto de EROs e PCD nas doenças causadas por patógenos necrotróficos é apoiado pelos experimentos com inibidor de BAX-1 (BI-1). BI-1 é uma proteína que inibe a morte celular induzida por BAX em mamíferos, em leveduras, animais e plantas. Além disso, a proteína BI-1 de cevada suprime a resistência basal e enfraquece a resposta de defesa oxidativa em resposta ao patógeno biotrófico *Blumeria graminis* f. sp. *bordei*, mas aumenta a resistência a patógenos necrotróficos *F. graminearum* e *B. cinerea* (Imani et al., 2006; Eichmann et al., 2010). A expressão de *BI-1* de cacaueteiro em tomateiro também reduziu a infecção por *M. perniciosa*, *S. sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *B. cinerea* (Scotton et al., 2017).

O gene *Mlo* de cevada retarda a senescência e protege contra a morte celular. As mutações nesse gene e a falta da proteína MLO conferem um espectro de resistência amplo e durável a praticamente todas as raças do oídio biotrófico, sem HR, porém com a formação de uma papila na parede celular das células da epiderme, que também é acompanhada pelo acúmulo de H₂O₂ (Hückelhoven et al., 1999; Piffanelli et al., 2002; Stein; Sommerville, 2002). Por outro lado, as mutações *mlo* na cevada causam não somente resistência total ao oídio biotrófico, mas um aumento na suscetibilidade ao necrotrófico *Bipolaris sorokiniana* (Jarosch; Kogel; Schaffrath, 1999; Kumar et al., 2001).

A autofagia é um processo evolutivamente conservado pelo qual constituintes do citoplasma, incluindo proteínas e organelas, são entregues para lisossomos ou vacúolos para degradação (Boya; Reggiori; Codogn, 2013). A autofagia pode ocorrer por pelo menos três vias, conhecidas como macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas e microautofagia. Na via de indução clássica, a autofagia é iniciada pela formação de uma membrana de isolamento ou "fagóforo", que pode crescer para englobar componentes citoplasmáticos e fechar-se com seu

carregamento, resultando na formação de um autofagossomo de dupla membrana (Boya; Reggiori; Codogn, 2013; He; Klionsky, 2009). O autofagossomo formado se funde com lisossomos ou vacúolos de modo que seu carregamento interno pode ser degradado por uma série de hidrolases lisossomais/vacuolares (Boya; Reggiori; Codogn, 2013; He; Klionsky, 2009).

Numerosos genes associados à autofagia (*ATG*) foram identificados em leveduras, muitos dos quais são compartilhados com animais e plantas (Bassham et al., 2006; Meijer et al., 2007; Kourtis; Tavernarakis, 2009). Essas proteínas regulam a formação de autofagossomos revestidos por dupla membrana e a subsequente fusão dessas vesículas com compartimentos lisossômico ou vacuolar para degradação da carga (Klionsky; Ohsumi, 1999).

Através da análise de mutantes deficientes em autofagia para respostas a patógenos biotróficos virulentos e avirulentos, foi observado que a autofagia regula de forma complexa a imunidade inata da planta, incluindo a PCD induzida por patógenos (Hofius et al., 2009; Kabbage; Williams; Dickman, 2013; Liu et al., 2005; Patel; Dinesh-Kumar, 2008; Yoshimoto et al., 2009). No entanto, há fortes evidências para um papel positivo da autofagia na resistência das plantas patógenos necrotróficos (Kabbage et al., 2013; Katsiarimpa et al., 2013; Lai et al., 2011; Lenz et al., 2011).

A sinalização indutora de HR é iniciada nas células onde o gene R reconhece o efector do patógeno. Estes sinais podem se difundir passivamente através do apoplasto e espaço extracelular ou através de plasmodesmos intracelulares, alcançando células vizinhas não infectadas, induzindo a HR. Se esses sinais permanecem limitados a essas células, não há indução de HR nas células próximas ao sítio de infecção. Neste caso, poderá ocorrer um favorecimento de crescimento de patógenos biotróficos e uma limitação do crescimento de patógenos necrotróficos (Lenz et al., 2011).

Um possível papel da autofagia é remover a indução de EROs e sinais que levam a PCD rápida. Em consonância com essa hipótese, mutantes do gene autofágico (*ATG6*) tem indução na expressão de muitos genes relacionados ao estresse oxidativo incluindo oxidases, oxidoredutases e peroxidases (Qin et al., 2007). Estas plantas também mostraram expressão muito aumentada de *PR1*, *enhanced disease susceptibility-1* (EDS1), e do gene *SEN1* associado a senescência, implicando que a sinalização de EROs não controlada na ausência de autofagia é suficiente para induzir respostas de defesa constitutiva (Xiong; Contento; Bassham, 2007).

Embora seja improvável que a autofagia alveje moléculas pequenas como NO e H₂O₂, sinais indutores de HR para degradação ou sequestro, existem outras formas para inibir sua atividade de sinalização. Por exemplo, a autofagia pode visar especificamente proteínas que integram estes sinais, ou proteínas necessárias para a sua propagação. A degradação seletiva de

proteínas oxidadas tem sido mostrada sob condições de estresse oxidativo em *arabidopsis*, enquanto a interrupção da autofagia pode resultar em estresse oxidativo constitutivo (Xiong; Contento; Bassham, 2007). Uma segunda possibilidade é que a autofagia possa ter como alvo a fonte desses sinais, em vez de seus alvos a jusante. Uma fonte potencial de EROs na célula da planta é a NADPH oxidase ligada à membrana (Hayward; Tsao; Dinesh-Kumar, 2009).

A suscetibilidade a *S. sclerotiorum* é mediada por EROs, induzidos por ácido oxálico. Mutantes deficientes de ácido oxálico não são patogênicos e desencadeiam um fenótipo de morte celular restrita. Apesar da planta reconhecer a presença do patógeno, visto pela presença de marcadores de defesa como a deposição de calose, foi verificado nessa condição a presença de autofagossomos. A autofagia, nesse caso, surge como a resposta de defesa a *Sclerotinia* associado a ausência de ácido oxálico (Kabbage, Williams; Dickman, 2013).

Dessa forma, a resistência a patógenos de estilos de vida contrastantes pode variar ainda com o tempo e intensidade com que a resposta é desencadeada, além do tipo de morte celular programada ativada.

REFERÊNCIAS

- Achuo EA, Audenaert K, Meziane H, Höfte M (2004) The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology*, 53(1): 65-72.
- Achuo EA, Prinsen E, Höfte M (2006) Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neohycoopersici*. *Plant Pathology*, 55(2): 178-186.
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17:73–90.
- Albert I, Böhm H, Albert M, Feiler CE, Imkampe J, Wallmeroth N, Brancato C, Raaymakers TM, Oome S, Zhang H, Krol E, Grefen C, Gust AA, Chai J, Hedrich R, Van den Ackerveken G, Nürnberger T (2015) An RLP23–SOBIR1–BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nature Plants*, 1(10) 1-9.
- Al-Masri MI, Ali-Shtayeh MS, Elad Y, Sharon A, Tudzynski P, Barakat R (2002) Effect of plant growth regulators on white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) on bean and cucumber. *Journal of Phytopathology*, 150(8-9): 481-487.
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*, 284(5423): 2148-2152.
- Amselem J, Cuomo CA, Van Kan JA, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S, Fournier E, Gout L, Hahn M, Kohn L, Lapalu N, Plummer KM, Pradier JM, Quévillon E, Sharon A, Simon A, ten Have A, Tudzynski B, Tudzynski P, Wincker P, Andrew M, Anthouard V, Beever RE, Beffa R, Benoit I, Bouzid O, Brault B, Chen Z, Choquer M, Collémare J, Cotton P, Danchin EG, Da Silva C, Gautier A, Giraud C, Giraud T, Gonzalez C, Grossetete S, Güldener U, Henrissat B, Howlett BJ, Kodira C, Kretschmer M, Lappartient A, Leroch M, Levis C, Mauceli E, Neuvéglise C, Oeser B, Pearson M, Poulain J, Poussereau N, Quesneville H, Rasclé C, Schumacher J, Ségurens B, Sexton A, Silva E, Sirven C, Soanes DM, Talbot NJ, Templeton M, Yandava C, Yarden O, Zeng Q, Rollins JA, Lebrun MH, Dickman M (2011) Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 7(8): e1002230.
- Anand A, Uppalapati SR, Ryu CM, Allen SN, Kang L, Tang Y, Mysore KS (2008) Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 146(2): 703-715.
- Anderson BE, Ward JM, Schroeder JI (1994) Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in Commelina guard cells. *Plant Physiology*, 104(4): 1177-1183.
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(12): 3460-3479.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, 415:977–83.
- Asselbergh B, Curvers K, França SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F, Höfte M (2007) 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*, 144(4): 1863-1877.
- Asselbergh B, Höfte M (2007) Basal tomato defences to *Botrytis cinerea* include abscisic acid-dependent callose formation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3): 33-40.

- Audenaert K, De Meyer GB, Höfte MM (2002) Absciscic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology*, 128(2): 491-501.
- Ausubel FM (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, 6(10):973–79.
- Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4): 473-488.
- Barna B, Adám AL, Király Z (1993) Juvenility and resistance of a superoxide tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften*, 80(9): 420-422.
- Barna B, Fodor J, Pogany M, Kiraly Z (2003) Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *Pest Management Science*, 59(4): 459-464.
- Barna B, Smigocki AC, Baker JC (2008) Transgenic production of cytokinin suppresses bacterially induced hypersensitive response symptoms and increases antioxidative enzyme levels in *Nicotiana* spp. *Phytopathology*, 98(11): 1242-1247.
- Baroli I, Niyogi KK (2000) Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402): 1385-1394.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy*, 2(1): 2-11.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R (2002) Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, 29(1): 23-32.
- Bethke G, Unthan T, Uhrig JF, Poschl Y, Gust AA, Scheel D, Lee J (2009) Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:8067–72.
- Bethke G, Pecher P, Eschen-Lippold L, Tsuda K, Katagiri F, Glazebrook J, Scheel D, Lee J (2012) Activation of the *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25:471–80.
- Boller T, Felix G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60:379–406.
- Bolton MD, Thomma BP, Nelson BD (2006) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7(1): 1-16.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, 15(7): 713.
- Boyer GL, Zeevaart JA (1982) Isolation and quantitation of β -D-glucopyranosyl abscisate from leaves of *Xanthium* and spinach. *Plant Physiology*, 70(1): 227-231.
- Bratt CE, Arvidsson PO, Carlsson M, Åkerlund HE (1995) Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynthesis Research*, 45: 169–175.
- Bray EA, Zeevaart JA (1985) The compartmentation of abscisic acid and β -D-glucopyranosyl abscisate in mesophyll cells. *Plant Physiology*, 79(3): 719-722.
- Broekaert WF, Delaure SL, De Bolle MF, Cammue BP (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review Phytopathology*, 44: 393-416.
- Brodersen P, Petersen M, Bjørn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J (2006) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid-and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal*, 47(4): 532-546.
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB (1999) Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *The Plant Journal*, 17(4): 427-431.

- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1): 57-63.
- Cessna SG, Sears VE, Dickman MB, Low PS (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell*, 12(11): 2191-2199.
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410:37-40.
- Chen H, Xue L, Chintamanani S, Germain H, Lin H, Cui H, Cai R, Zuo J, Tang X, Li X, Guo H, Zhou JM (2009) ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2* expression to negatively regulate plant innate immunity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(8): 2527-2540.
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell*, 14(11): 2723-2743.
- Chern M, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC (2005) Overexpression of a rice *NPR1* homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(6): 511-520.
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448:497-500.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124:803-814.
- Cho YH, Lee S, Yoo SD (2012) EIN2 and EIN3 in ethylene signalling. *Annual Plant Reviews* 44: 169-187.
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science*, 323(5910): 95-101.
- Coffeen WC, Wolpert TJ (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell*, 16(4): 857-873.
- Coll NS, Epple P, Dangl JL (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differentiation*, 18:1247-56.
- Creelman RA, Mulpuri R (2002) The oxylipin pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, e0012.
- Cutler AJ, Krochko JE (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4(12): 472-478.
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839): 826.
- De Jonge R, Van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, Thomma BP (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*, 329(5994): 953-955.
- De Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Egea PR., Grant M. (2007) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO journal*, 26(5): 1434-1443.
- De Vos M, Van Zaanen W, Koornneef A, Korzelius JP, Dicke M, Van Loon LC, Pieterse CM (2006) Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(1): 352-363.
- Dixon R (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411:843-47.
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H (2007) Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science*, 318(5849): 453-456.

- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, Feussner K, Meinicke P, Stierhof, Schwarz H, Macek B, Mann M, Kahmann R (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, 478(7369): 395.
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11:539–48.
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM, Kazan K (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(7): 2225–2245.
- Dorey S, Baillieul F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S (1997) Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10: 646–655.
- Durrant WE, Dong X Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 185–209.
- Eichmann R, Bischof M, Weis C, Shaw J, Lacomme C, Schweizer P, Duchkov D, Gensel G, Kumlehn J, Hückelhoven R (2010) *BAX INHIBITOR-1* is required for full susceptibility of barley to powdery mildew. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(9): 1217–1227.
- El Oirdi M, El Rahman TA, Rigano L, El Hadrami A, Rodriguez MC, Daayf F, Vojnov A, Bouarab, K. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *The Plant Cell*, 23(6): 2405–2421.
- Eulgem T (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, 10: 71–78.
- Eulgem T, Somssich IE (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4): 366–371.
- Farmer EE, Almeras E, Krishnamurthy V (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:372–378.
- Faulkner C, Petutschnig E, Benitez-Alfonso Y, Beck M, Robatzek S, Lipka V, Maule AJ (2013) LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22): 9166–9170.
- Felix G, Boller T (2003) Molecular Sensing of Bacteria in Plants THE HIGHLY CONSERVED RNA-BINDING MOTIF RNP-1 OF BACTERIAL COLD SHOCK PROTEINS IS RECOGNIZED AS AN ELICITOR SIGNAL IN TOBACCO. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8): 6201–6208.
- Ferrari S, Galletti R, Denoux C, De Lorenzo G, Ausubel FM, Dewdney J (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology*, 144(1): 367–379.
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1): 275–297.
- Feys BJ, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell*, 6(5): 751–759.
- Fitzgerald HA, Chern MS, Navarre R, Ronald PC (2004) Overexpression of (*At*) *NPR1* in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(2): 140–151.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7): 1866–1875.
- Friesen TL, Faris JD, Solomon PS, Oliver RP (2008) Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology*, 10(7): 1421–1428.

- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402): 228.
- Fu ZQ, Dong X (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64:839–63.
- Gentile AC (1954) Carbohydrate Metabolism and Oxalic Acid Synthesis by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 29(3): 257.
- Gfeller A, Liechti R, Farmer EE (2010) Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Science Signaling*, 3(109): cm4.
- Gilroy S, Jones RL (1994) Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiology*, 104(4): 1185–1192.
- Glazebrook J, Ausubel FM (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91:8955–59.
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 43: 205–227.
- Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R (1990) Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 37(3): 179–191.
- Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* 5:1003–11.
- Greenberg JT, Yao N (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6(3): 201–211.
- Groen SC, Whiteman NK (2014) The evolution of ethylene signaling in plant chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7): 700–716.
- Gürlebeck D, Thieme F, Bonas U (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*, 163(3): 233–255.
- Groot SP, Karssen CM (1992) Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds: studies with the *sitiens* mutant. *Plant Physiology*, 99(3): 952–958.
- Guimaraes RL, Stotz HU (2004) Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology*, 136(3): 3703–3711.
- Guo X, Stotz HU (2010) ABA signaling inhibits oxalate-induced production of reactive oxygen species and protects against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology*, 128(1): 7–19.
- Gust AA, Biswas R, Lenz, H. D, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, Nürnberger T (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44): 32338–32348.
- Halitschke R, Baldwin IT (2004) Jasmonates and related compounds in plant–insect interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23:238–245.
- Hammerschmidt R (1999) Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, 37:285–306.
- Harrison E, Burbidge A, Okyere JP, Thompson AJ, Taylor IB (2011) Identification of the tomato ABA-deficient mutant *sitiens* as a member of the ABA-aldehyde oxidase gene family using genetic and genomic analysis. *Plant Growth Regulation*, 64(3): 301–309.
- Hauser F, Waadt R, Schroeder JI (2011) Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Current Biology*, 21(9): R346–R355.
- Hayward AP, Tsao J, Dinesh-Kumar SP (2009). Autophagy and plant innate immunity: defense through degradation. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(9):1041–1047.

- He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43.
- Hirai N, Kondo S, Ohigashi H (2003) Deuterium-labeled phaseic acid and dihydrophaseic acids for internal standards. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(11): 2408-2415.
- Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NH, Mattsson O, Petersen M (2009) Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell*, 137(4): 773-783.
- Holt BF, Belkadir Y, Dangl JL (2005) Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science* 309, 929–932.
- Hornberg C, Weiler EW (1984) High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature*, 310(5975): 321.
- Hua J, Meyerowitz EM (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 94(2): 261-271.
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel KH (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology*, 119(4): 1251-1260.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirte H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Recker J, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7:301–8.
- Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281:36969–76.
- Imani J, Altruschat H, Stein E, Jia G, Vogelsberg J, Kogel KH, Hückelhoven R (2006) Expression of barley *BAX Inhibitor-1* in carrots confers resistance to *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 7(4): 279-284.
- Imber D, Tal M (1970) Phenotypic reversion of *flacca*, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. *Science*, 169(3945): 592-593.
- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 273(5283): 1853-1856.
- Jarosch B, Kogel KH, Schaffrath U (1999) The ambivalence of the barley Mlo locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(6): 508-514.
- Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E (1999) Induction of *RAB18* gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *The Plant Journal*, 18(1): 13-22.
- Johansson A, Staal J, Dixelius C (2006) Early responses in the *Arabidopsis*-*Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(9): 958-969.
- Jones H, Whipps JM, Gurr SJ (2001) The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. *Molecular Plant Pathology*, 2(6): 303-309.
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323.
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19): 7100-7105.
- Kabbage M, Williams B, Dickman MB (2013) Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens*, 9(4): e1003287.
- Kabbage M, Yarden O, Dickman MB (2015) Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. *Plant Science*, 233: 53-60.

- Katsiarimpa A, Kalinowska K, Anzenberger F, Weis C, Ostertag M, Tsutsumi C, Schwechheimer C, Brunner F, Hückelhoven R, Isono E (2013) The deubiquitinating enzyme AMSH1 and the ESCRT-III subunit VPS2.1 are required for autophagic degradation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(6): 2236-2252.
- Khan M, Subramaniam R, Desveaux D (2016) Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology*, (29):49-55.
- Kieber JJ, Ecker JR (1993) Ethylene gas: it's not just for ripening any more!. *Trends in Genetics*, 9(10): 356-362.
- Király Z, El-Zahaby HM (2000) Effect of reactive oxygen species on rust and powdery mildew pathogens and on symptoms. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 35(1/4): 239-240.
- Klionsky DJ, Ohsumi Y (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1): 1-32.
- Kourtis N, Tavernarakis N (2009) Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death and Differentiation*, 16(1): 21.
- Kumar J, Hückelhoven R, Beckhove U, Nagarajan S, Kogel KH (2001) A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology*, 91(2): 127-133.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E (2004) The Arabidopsis cytochrome *P450 CYP707A* encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal*, 23(7): 1647-1656.
- Lai Z, Wang F, Zheng Z, Fan B, Chen Z (2011) A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, 66(6): 953-968.
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Holländer-Czytko H, Weiler EW (1996) Cloning, molecular and functional characterization of Arabidopsis thaliana allene oxide synthase (*CYP 74*), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Molecular Biology*, 31(2): 323-335.
- Laudert D, Weiler EW (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *The Plant Journal*, 15(5): 675-684.
- Lee HI, León J, Raskin I (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10): 4076-4079.
- Lee S, Ishiga Y, Clermont K, Mysore KS (2013) Coronatine inhibits stomatal closure and delays hypersensitive response cell death induced by nonhost bacterial pathogens. *PeerJ*, 1: e34.
- Lehmann H, Glund K (1986) Abscissic acid metabolism-vacuolar/extravacuolar distribution of metabolites. *Planta*, 168(4): 559-562.
- Lenz HD, Haller E, Melzer E, Kober K, Wurster K, Stahl M, Bassham DC, Vierstra RD, Parker JE, Bautor J, Molina A, Escudero V, Shindo T, van der Hoorn, RAL, Gust AA, Nürnberger T (2011) Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *The Plant Journal*, 66(5): 818-830.
- Liang X, Liberti D, Li M, Kim YT, Hutchens A, Wilson R, Rollins JA (2015) Oxaloacetate acetylhydrolase gene mutants of *Sclerotinia sclerotiorum* do not accumulate oxalic acid, but do produce limited lesions on host plants. *Molecular Plant Pathology*, 16(6): 559-571.
- Lin WC, Lu CF, Wu JW, Cheng ML, Lin YM, Yang NS, Black L, Green SK, Wang JF, Cheng C-P (2004) Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research*, 13(6): 567-581.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K., Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121(4): 567-577.

- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15(1): 165-178.
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(7): 1938-1950.
- Lorenzo O, Solano R (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5): 532-540.
- Lowe RG, Howlett BJ (2012) Indifferent, affectionate, or deceitful: lifestyles and secretomes of fungi. *PLoS Pathogens*, 8(3): e1002515.
- Luis A, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2): 330-335.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930): 1064-1068.
- Makandar R, Essig JS, Schapaugh MA, Trick HN, Shah J (2006) Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(2): 123-129.
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250(4983): 1002-1004.
- Marciano P, Di Lenna P, Magro P (1983) Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology*, 22(3): 339-345.
- Mayer AM, Staples RC, Gil-ad NL (2001) Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, 58(1): 33-41.
- McDowell JM, Dangl JL (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2): 79-82.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126(5): 969-980.
- Melotto M, Underwood W, He SY (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 46: 101-122.
- Mendgen K, Hahn M (2002) Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, 7(8): 352-356.
- Meng X, Zhang S (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 245-266.
- Mengiste T, Chen X, Salmeron J, Dietrich R (2003) The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(11): 2551-2565.
- Mengiste T (2012) Plant immunity to necrotrophs. *Annual review of phytopathology*, 50: 267-294.
- Mentlak TA, Kombrink A, Shinya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma BPHJ, Talbot NJ (2012) Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell*, 24(1): 322-335.
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Schmid E, Blum W, Inverardi B (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250(4983): 1004-1006.
- Meijer WH, van der Klei IJ, Veenhuis M, Kiel JA (2007) ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy*, 3(2): 106-116.

- MIÝčkovš K, Luhovš L, Lebeda A, Mieslerovš B, Peč P (2004) Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(10): 753-761.
- Mohr PG, Cahill DM (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Functional & Integrative Genomics*, 7(3): 181-191.
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4): 1558-1566.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:19613–18.
- Nakagami H, Soukupova H, Schikora A, Zarsky V, Hirt H (2006) A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281:38697–704.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 165-185.
- Nandi A, Moeder W, Kachroo P, Klessig DF, Shah J (2005) *Arabidopsis* *ssi2*-conferred susceptibility to *Botrytis cinerea* is dependent on EDS5 and PAD4. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(4): 363-370.
- Newman MA, Dow JM, Molinaro A, Parrilli M (2007) Invited review: priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin Research*, 13(2): 69-84.
- Nishimura MT, Stein M, Hou BH, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*, 301(5635): 969-972.
- Nováková, M., Šásek, V., Dobrev, P. I., Valentová, O., & Burketová, L. (2014). Plant hormones in defense response of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum*—reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 308-317.
- Nuernberger T, Lipka V (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, 6(3): 335-345.
- Ouf MF, Gazar AA, Shehata ZA, Király Z, Barna B (1993) The effect of superoxide anion on germination and infectivity of wheat stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks and Henn.) uredospores. *Cereal Research Communications*, 21(1): 31-37.
- Padmanabhan M, Cournoyer P, Dinesh-Kumar SP (2009) The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: A wealth of possibilities. *Cell Microbiology*, 11:191-198.
- Pallas JA, Paiva NL, Lamb C, Dixon RA (1996) Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 10:281–93.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR., Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TFF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324(5930): 1068-1071.
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*, 15(4): 939-951.
- Patel S, Dinesh-Kumar, SP (2008) *Arabidopsis* *ATG6* is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*, 4(1): 20-27.
- Pedley KF, Martin GB (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:541–47

- Percepied L, Balagué C, Riou C, Claudel-Renard C, Rivière N, Grezes-Besset B, Roby D (2010) Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7): 846-860.
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28: 489-521.
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins NC, Panstruga R, Schulze-Lefert P (2002) The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiology*, 129(3): 1076-1085.
- Piterková J, Hofman J, Mieslerová B, Sedlářová M, Luhová L, Lebeda A, Petřivalský M (2011) Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp.–*Oidium neohycopersici* interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 37-44.
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:421–26.
- Pogány M, Koehl J, Heiser I, Elstner EF, Barna B (2004) Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to *Tobacco necrosis virus* and confers tolerance to oxidative stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(1): 39-47.
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM, Memelink J (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*, 147(3): 1347-1357.
- Qin G, Ma Z, Zhang L, Xing S, Hou X, Deng J, Liu J, Chen Z, Qu LJ, Gu H (2007) *Arabidopsis AtBECLIN1/AtAtg6/AtVps30* is essential for pollen germination and plant development. *Cell Research*, 17:249–63.
- Qiu JL, Fiil BK, Petersen K, Nielsen HB, Botanga CJ, Thorgrimsen S, Palma K, Suarez-Rodriguez MC, Sandbech-Clausen S, Lichota J, Brodersen P, Grasser KD, Mattsson O, Glazebrook J, Mundy J, Petersen M (2008) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO Journal*, 27:2214–21.
- Qiu JL, Zhou L, Yun BW, Nielsen HB, Fiil BK, Petersen K, MacKinlay J, Loake GJ, Mundy J, Morris PC (2008) *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology*, 148:212–22.
- Qutob D, Kemmerling B, Brunner F, Küfner I, Engelhardt S, Gust AA, Luberacki B, Seitz HU, Stahl D, Rauhut T, Glawischnig E, Schween G, Lacombe B, Watanabe N, Lam E, Schlichting R, Scheel D, Nau K, Dodt G, Hubert G, Gijzen M, Nürnberger T (2006) Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *The Plant Cell*, 18(12); 3721-3744.
- Ranf S, Eschen-Lippold L, Pecher P, Lee J, Scheel D (2011) Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant Journal*, 68:100–13.
- Ren D, Liu Y, Yang KY, Han L, Mao G, Glazebrook J, Zhang S (2008) A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:5638–43.
- Robert-Seilanianz A, Grant M, Jones JD (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 317-343.
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61:621–49.
- Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovskiy FG, Tör M, de Vries S, Zipfel C (2011) The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases

- BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell*, 23:2440–55.
- Sagi M, Scazzocchio, C, Fluhr R (2002) The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *The Plant Journal*, 31(3): 305-317.
- Sagi M, Fluhr R (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, 141(2): 336-340.
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M (2004) *Arabidopsis* *CYP707A*s encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology*, 134(4): 1439-1449.
- Sauter A, Dietz KJ, Hartung W (2002) A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell & Environment*, 25(2): 223-228.
- Schaller F, Biesgen C, Müssig C, Altmann T, Weiler EW (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*, 210(6): 979-984.
- Schultz TF, Quatrano, RS (1997) Evidence for surface perception of abscisic acid by rice suspension cells as assayed by Em gene expression. *Plant Science*, 130(1): 63-71.
- Schulze-Lefert P (2004) Plant immunity: the origami of receptor activation. *Current Biology*, 14: R22–R24.
- Schwessinger B, Ronald PC (2012) Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual Review of Plant Biology*, 63:451–482.
- Scotton DC, Azevedo MDS, Sestari I, Da Silva JS, Souza LA, Peres LEP, Leal jr GA, Figueira A (2017) Expression of the *Theobroma cacao* *Bax-inhibitor-1* gene in tomato reduces infection by the hemibiotrophic pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Molecular Plant Pathology*, 18(8): 1101-1112.
- Seo M, Koshiba T (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7(1): 41-48.
- Shang Y, Li X, Cui H, He P, Thilmony R, Chintamanani S, Zwiesler-Vollick J, Gopalan S, Tang X, Zhou JM (2006) RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50): 19200-19205.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012: 1-26.
- Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB, Shetty HS (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3): 267-280.
- Shibata Y, Kawakita K, Takemoto D (2010) Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene-and salicylic acid-mediated signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(9): 1130-1142.
- Sindhu RK, Walton DC (1988) Xanthoxin metabolism in cell-free preparations from wild type and wilted mutants of tomato. *Plant Physiology*, 88(1): 178-182.
- Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development*, 12(23): 3703-3714.
- Solano R, Gimenez-Ibanez S (2013) Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4 (72): 1-11.
- Song S, Qi T, Wasternack C, Xie D (2014) Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Current Opinion in Plant Biology*, 21: 112-119.
- Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, Burgis TA, Soanes DM, Stüber K, Lebrun MH, Panstruga R (2010) Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science*, 330(6010): 1543-1546.

- Spanu PD, Panstruga R (2017) Biotrophic Plant-Microbe Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 192.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CMJ (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3): 760-770.
- Srinivasan T, Kumar KRR, Meur G, Kirti PB (2009) Heterologous expression of *Arabidopsis* NPR1 (*AtNPR1*) enhances oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Biotechnology Letters*, 31(9): 1343-1351.
- Stein M, Somerville SC (2002) MLO, a novel modulator of plant defenses and cell death, binds calmodulin. *Trends in Plant Science*, 7(9): 379-380.
- Suarez-Rodriguez MC, Adams-Phillips L, Liu Y, Wang H, Su SH, Jester PJ, Zhang S, Bent AF, Krysan PJ (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, 143:661-69.
- Su T, Xu J, Li Y, Lei L, Zhao L, Yang H, Feng J, Liu G, Ren D (2011) Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23:364-80.
- Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2004) Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(3): 245-253.
- Takken FL, Albrecht M, Tameling WI (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 383-390.
- Taylor IB, Linforth RST, Al-Naieb RJ, Bowman WR, Marples BA (1988) The wilted tomato mutants *flacca* and *siliens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant, Cell & Environment*, 11(8): 739-745.
- Taylor TN, Hass H, Remy W (1992) Devonian fungi: interactions with the green alga *Palaeonitella*. *Mycologia*, 84(6): 901-910.
- Taylor IB, Burbidge A, Thompson AJ (2000) Control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 51(350): 1563-1574.
- Tena G, Boudsocq M, Sheen J (2011) Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:519-29.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COH} complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661.
- Thompson JN, Burdon JJ (1992) Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature*, 360(6400): 121.
- Thompson AJ, Thorne ET, Burbidge A, Jackson AC, Sharp RE, Taylor IB (2004) Complementation of *notabilis*, an abscisic acid-deficient mutant of tomato: importance of sequence context and utility of partial complementation. *Plant, Cell & Environment*, 27(4): 459-471.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11(6): 1187-1194.
- Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, Lebeda A (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(1-3): 22-32.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(6): 310-317.

- Torres MA, Jones JD, Dangl JL (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 37: 1130–1134.
- Torres-Vera R, García JM, Pozo MJ, López-Ráez JA (2014) Do strigolactones contribute to plant defence? *Molecular Plant Pathology*, 15(2): 211–216.
- Tsuji J, Jackson EP, Gage DA, Hammerschmidt R, Somerville SC (1992) Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology*, 98:1304–1309.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*, 14 (1), S153–S164.
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41): 17588–17593.
- Üstün S, Bartetzko V, Börnke F (2013) The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ targets the host cell proteasome to suppress salicylic-acid mediated plant defence. *PLoS Pathogens*, 9(6): e1003427.
- Vanacker H, Carver TL, Foyer CH (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology*, 123(4): 1289–1300.
- Van der Does D, Leon-Reyes A, Koornneef A, Van Verk MC, Rodenburg N, Pauwels L, Goossens A, Körbes AP, Memelink J, Ritsema T, Van Wees SCM, Pieterse CMJ, Van Wees SC (2013) Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *The Plant Cell*, 25(2): 744–761.
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Laurière C, Merlot S (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(10): 3170–3184.
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell*, 6:959–965.
- Veronese P, Nakagami H, Bluhm B, AbuQamar S, Chen X, Salmeron J, Dietrich RA, Hirt H, Mengiste T (2006) The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell*, 18(1): 257–273.
- Vos IA, Verhage A, Schuurink RC, Watt LG, Pieterse CM, Van Wees S (2013) Onset of herbivore-induced resistance in systemic tissue primed for jasmonate-dependent defenses is activated by abscisic acid. *Frontiers in Plant Science*, 4 (539):1–11.
- Wally O, Jayaraj J, Punja ZK (2009) Broad-spectrum disease resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens in transgenic carrots (*Daucus carota* L.) expressing an *Arabidopsis NPR1* gene. *Planta*, 231(1): 131–141.
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim SY, Stacey MG, Stacey G (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20:471–481.
- Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 14(1): S131–S151.
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens*, 2(11): e123.
- Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, Han QM, Zhang HC, Kang ZS (2007) Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O₂[–] and H₂O₂) in the incompatible

- and compatible interaction of wheat—*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4-6): 230-239.
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6): 1021-1058.
- Wen X, Zhang C, Ji Y, Zhao Q, He W, An F, Jiang L, Guo H (2012) Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research*, 22(11): 1613.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews*, 79:143–80.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863): 562.
- Williams B, Kabbage M, Kim HJ, Britt R, Dickman MB (2011) Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens*, 7(6): e1002107.
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C (2012) The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports*, 1(6): 639-647.
- Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell*, 17(7): 1953-1966.
- Yang F, Li W, Jørgensen HJ (2013) Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLoS One*, 8(11): e81606.
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Nakashita H (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(6): 1678-1692.
- Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu, K. (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(9): 2914-2927.
- Xiong Y, Contento AL, Bassham DC (2007) Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis. *Autophagy*, 3(3): 257-258.
- Xin XF, He SY (2013) *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 473-498.
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D (2008) Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 283:26996–7006
- Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1): 439-473.
- Zhang W, Fraiture M, Kolb D, Löffelhardt B, Desaki Y, Boutrot FF, Tör M, Zipfel C, Gust AA, Brunner F (2013) Arabidopsis receptor-like protein30 and receptor-like kinase suppressor of BIR1-1/EVERSHED mediate innate immunity to necrotrophic fungi. *The Plant Cell*, 25(10): 4227-4241.
- Zhang L, Kars I, Essenstam B, Liebrand TW, Wagemakers L, Elberse J, Tagkalaki P, Tjoitang D, van den Ackerveken G, van Kan JAL (2014) Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the Arabidopsis receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiology*, 164(1): 352-364.

- Zhang, C., Liu, L., Wang, X., Vossen, J., Li, G., Li, T., Zheng Z, Gao J, Guo Y, Visser RGF, Li J, Bai Y, Du Y (2014) The *Pb-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. Theoretical and Applied Genetics, 127(6): 1353-1364.
- Zhou J, Zeng L, Liu J, Xing D (2015) Manipulation of the xanthophyll cycle increases plant susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum*. PLoS Pathogens, 11(5): e1004878.
- Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, Mu A, Jiang Z, Kim JM, To TK, Li W, Zhang X, Yu Q, Dong Z, Chen WQ, Seki M, Zhou JM, Guo H (2011) Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(30): 12539-12544.
- Zhu W, Wei W, Fu Y, Cheng J, Xie J, Li G, Yi X, Kang Z, Dickman MB, Jiang D (2013) A secretory protein of necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* that suppresses host resistance. PLoS One, 8(1): e53901
- Ziegler J, Stenzel I, Hause B, Maucher H, Hamberg M, Grimm R, Ganai M, Wasternack C (2000) Molecular cloning of allene oxide cyclase the enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. Journal of Biological Chemistry, 275(25): 19132-19138.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. Nature, 428(6984): 764.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones J D, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. Cell, 125(4): 749-760.
- Zipfel C (2014) Plant pattern-recognition receptors. Trends in Immunology, 35(7): 345-351.

3. A EXPLOSÃO OXIDATIVA EM TOMATEIRO CONTRA PATÓGENOS DE ESTILOS DE VIDA CONTRASTANTES É REGULADA PARCIALMENTE PELA VIA DE BIOSÍNTESE DO ABA

Jamille Santos da Silva^{1,2}; Juliana Leles Costa¹; Luciano Freschi³; Eduardo Purgatto⁴; Lazaro Eustáquio Pereira Peres²; Antonio Figueira¹

¹ Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP 13400-970, Brasil

² Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brasil

³ Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-970

⁴ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, SP 05508-000

Resumo

Os patógenos de plantas são classificados em biotróficos, necrotóxicos ou hemibiotróficos de acordo com seus estilos de vidas. A resistência a patógenos de estilos de vida contrastantes é mediada, muitas vezes, pela morte celular programada (PCD), que é desencadeada pela explosão oxidativa, e que, geralmente, está sujeita ao balanço hormonal na planta. Consequentemente, a regulação do sistema antioxidante por hormônios é de extrema importância na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na indução de PCD em interações com patógenos. Foi observado que o mutante para síntese de ácido abscísico (ABA), *sitiens*, exibe resposta contrastante em relação ao tomateiro 'Micro-Tom' (MT), apresentando maior suscetibilidade a *Sclerotinia sclerotiorum* e resistência parcial a *Oidium neolycopersici*. Essa resistência é parcialmente dependente da dose de ABA, sendo que plantas submetidas a elevados níveis de ABA comportaram-se similarmente ao tipo selvagem 'MT'. Durante a infecção ocorre um aumento nos níveis de ABA em 'MT' inoculado com ambos os patógenos e esse aumento parece ser regulado pela repressão da degradação do ABA. Na via de biossíntese de ABA, houve uma repressão dos genes *ZEP* e *VDE* sugerindo um possível menor acúmulo de intermediários da via em 'MT'. Essa repressão provocou uma redução na oxidação do ascorbato pela enzima VDE e permitiu que o ascorbato servisse de substrato para ascorbato peroxidases e oxidases do ascorbato com consequente remoção de H₂O₂ em 'MT'. Já o conteúdo de glutatona apresentou níveis elevados nas interações menos suscetíveis. Esses resultados sugerem que a interação entre a via de biossíntese do ABA e o metabolismo antioxidativo permitiu a regulação dos níveis de H₂O₂ e desenvolvimento da PCD, modificando a resistência a patógenos de estilos de vida contrastantes.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio; Morte celular, Ascorbato; Fungos

Abstract

Plant pathogens are classified as biotrophic, necrotrophic or hemibiotrophic according to their lifestyles. Resistance to pathogens of contrasting lifestyles is often mediated by programmed cell death (PCD), which is triggered by oxidative burst and is usually dependent on the hormonal balance of the plant. Consequently, the regulation of the antioxidant system by hormones is of extreme importance in the removal of reactive oxygen species (ROS) and induction of PCD in interactions with pathogens. It was observed that the mutant for the synthesis of abscisic acid (ABA), *sitiens*, exhibits a contrasting response in relation to the 'Micro-Tom' tomato, presenting

greater susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum* and partial resistance to *Oidium neolyopersici*. This resistance is partially dependent on the dose of ABA, and plants subjected to high levels of ABA behaved similarly to wild type 'MT'. During infection there is an increase in ABA levels in 'MT' inoculated with both pathogens and this increase seems to be regulated by the repression of ABA degradation. In the ABA biosynthetic pathway there was a repression of the *ZEP* and *VDE* genes, suggesting a possible lower accumulation of pathway intermediates in 'MT'. This repression resulted in a reduction in the oxidation of ascorbate by the enzyme VDE and allowed ascorbate to serve as a substrate for ascorbate peroxidases and ascorbate oxidases with consequent removal of H₂O₂. Glutathione content, on the other hand, presented high levels in the less susceptible interactions. These results suggest that the interaction between ABA biosynthesis pathway and antioxidative metabolism allowed the regulation of H₂O₂ levels and PCD development, modifying resistance to pathogens of contrasting lifestyles.

Palavras-chave: Reactive oxygen species; Cell death, Ascorbate; Fungi

3.1. Introdução

Os patógenos de plantas são classificados em biotróficos, necrotóxicos ou hemibiotróficos de acordo com seus estilos de vidas. Os biotróficos, como o *Oidium neolyopersici*, necessitam de células vegetais vivas do hospedeiro para se nutrirem, enquanto que os necrotóxicos, como *Sclerotinia sclerotiorum* matam as células do seu hospedeiro por meio da liberação de toxinas e enzimas de degradação da parede celular, onde o tecido morto servirá como fonte de nutrientes. Existe também outro grupo de patógenos, os hemibiotróficos, que são assim classificados por apresentarem duas fases distintas, uma inicial e biotrófica e uma fase posterior necrotóxica (Glazebrook et al., 2005).

Os diferentes estilos de vida dos patógenos induzem modificações na resposta de defesa da planta. O acúmulo de hormônios, o balanço hormonal e o *cross-talk* entre estes resultam em respostas diferenciadas de defesa. Classicamente, a sinalização por ácido salicílico (SA) está associada a regulação da resistência a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto que vias relacionadas ao ácido jasmônico (JA) e ao etileno (ET) ativam a resistência contra necrotóxicos. Essas duas vias são, muitas vezes, antagônicas (Robert-Seilanianz; Jones, 2011). Porém, outros hormônios, como o ácido abscísico (ABA), auxinas (ácido indol-3-acético [IAA]), citocininas (CKs), brassinosteróides (BRs), giberelinas (GA) e estrigolactonas, que são mais conhecidos por seus papéis na tolerância ao estresse abiótico, crescimento e desenvolvimento das plantas, também regulam a defesa, isolada ou conjuntamente com os hormônios clássicos de defesa primária (Ton; Flors; Mauch-Mani, 2009; Robert-Seilanianz et al., 2011; Torres-Vera et al., 2014).

A morte celular programada (*Programmed Cell Death* – PCD) é uma forma geneticamente controlada e organizada de morte celular que funciona na eliminação de células desnecessárias ou envelhecidas (Yen; Yang, 1998). Uma forma específica de PCD, chamada resposta de

hipersensibilidade (HR) é extremamente importante em interações planta-patógeno. Essa resposta geralmente é rápida, está associada ao reconhecimento de patógenos e a uma explosão oxidativa imediatamente anterior (Gechev et al., 2006). Essa explosão oxidativa é resultado do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que levam à morte celular, provavelmente, pelos danos que as EROs causam em proteínas, DNA e membranas (Møller; Jensen; Hansson, 2007; Roldán-Arjona; Ariza, 2009). A PCD pode, por um lado, favorecer o desenvolvimento de patógenos necrotróficos nos tecidos mortos, mas por outro, pode reduzir o desenvolvimento de patógenos biotróficos ao restringi-los no interior das células mortas. Assim, como a PCD é geralmente antecedida por um acúmulo de EROs, é natural supor que plantas que apresentem um maior acúmulo de EROs quando desafiadas por patógenos, apresentem maior resistência a patógenos biotróficos e maior suscetibilidade a patógenos necrotróficos.

O nível de EROs é resultado do balanço entre a síntese e degradação dessas moléculas. A degradação é realizada por diversas enzimas que constituem o sistema antioxidativo (Mittler, 2002). Entre as principais estão as ascorbato e a glutathione peroxidases, que além de reduzir o peróxido de hidrogênio, oxidam o ascorbato ou a glutathione reduzidas, respectivamente.

Os ciclos de oxirredução do ascorbato e glutathione interagem com a via das xantofilas pela enzima violaxantina de-epoxidase (VDE), que utiliza ascorbato como substrato para a produção de zeaxantina a partir de violaxantina e está diretamente relacionada a produção do hormônio ácido abscísico (Bratt et al., 19995; Baroli; Niyogi, 2000; Müller; Li; Niyogi, 2001). Em alguns trabalhos já foi verificado que o ácido abscísico desempenha um papel na resistência diferencial a *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici* (Achuo et al., 2006; Guo; Stotz, 2010; Perchepied et al., 2010). Porém, somente Zhou et al., (2015) verificou a importância da via de xantofilas e da síntese de ABA na resistência a *S. sclerotiorum*, por meio do aumento da atividade de VDE pelo pH reduzido devido ao ácido oxálico liberado pelo patógeno.

Aqui nós apresentamos evidências que mostram que a interrupção da via de xantofilas ocasionada pela mutação no gene da última etapa da produção de ABA no mutante *sitiens*, provoca um acúmulo de H_2O_2 , ocasionado parcialmente pela não oxidação do ascorbato por enzimas antioxidantes (peroxidases do ascorbato e oxidases do ascorbato) levando ao aumento da morte celular e resistência ao patógeno biotrófico *O. neolycopersici* e aumento da suscetibilidade ao patógeno necrotrófico *S. sclerotiorum*.

3.2. Resultados

O mutante *sitiens* com reduzidos níveis de ABA responde diferencialmente a patógenos de estilos de vida contrastantes

Com o objetivo de identificar os hormônios vegetais envolvidos na resposta diferencial de tomateiro cv. ‘Micro-Tom’ a fungos de estilos de vida contrastantes, folhas de plantas de seis mutantes hormonais (*diageotropica* (*dgt*), *Dwarf*, *jai1*, *Never ripe*, *procera* e *sitiens*) e quatro linhas transgênicas (*35S::AsCCD7*, *35S::AtCKX2*, *35S::AVP1* e *35S::nabG*) (Tabela S1) foram inoculadas com *S. sclerotiorum* e *O. neolyopersici*. As avaliações das lesões foram realizadas aos 2, 3, 4 e 5 dias após a inoculação (DAI) para *S. sclerotiorum* e aos 8, 10, 12, 14, 16 e 18 DAI para *O. neolyopersici*. Para *Sclerotinia*, o tempo ideal foi o de 2 DAI, pois os genótipos com folhas pequenas apresentaram limitação de área foliar para expansão da doença com 3 DAI. Já para *Oidium*, o tempo de 18 DAI foi o que apresentou maior contraste entre os genótipos. Sendo assim, as avaliações da área das lesões causadas por *S. sclerotiorum* foram realizadas aos 2 (DAI) e da área e do número de lesões para *O. neolyopersici* foi aos 18 DAI comparando os mutantes em relação ao controle ‘MT’.

Os mutantes e transgênicos *dgt*, *Dwarf*, *jai1*, *Never ripe*, *procera*, *35S::asCCD7*, *35S::AtCKX2*, *35S::AVP1* e *35S::nabG* apresentaram as médias das áreas de lesão semelhantes entre si, não diferindo estatisticamente do controle ‘MT’, quando inoculados com *S. sclerotiorum* (Figura 1A). O mutante para o receptor de ácido jasmônico, *jai1*, não diferiu significativamente do controle ‘MT’ na média da área de lesão (Figura 1A). O homólogo deste receptor em arabidopsis, COI1, é reconhecido por participar das respostas de defesa da planta contra patógenos necrotróficos, incluindo *S. sclerotiorum* (Guo; Stotz, 2007). Diferentemente do que foi observado no presente experimento com ‘MT’, o mutante *coi1-2* em arabidopsis apresenta elevada suscetibilidade a *S. sclerotiorum* e níveis basais de JA e JA-Ile elevados; porém, o mutante *coi1-2* quando infectado apresenta um aumento na quantidade de JA-Ile. Já os níveis de SA nas folhas de *coi1-2* em arabidopsis foram 4,7 vezes maiores quando comparado com o selvagem, confirmando o antagonismo entre JA e SA (Stotz et al., 2011). Para a interação *Brassica napus* × *S. sclerotiorum* tanto o ácido jasmônico quanto o ácido salicílico são necessários para a ativação da defesa, sendo que a via de sinalização de SA é inicialmente acompanhada da sinalização por JA (Wang et al., 2012).

A baixa sensibilidade ao etileno encontrada no mutante *Never ripe* não alterou a média da área da lesão quando comparada com o ‘MT’, não diferindo estatisticamente quando inoculado com *S. sclerotiorum* (Figura 1A). Em arabidopsis, o mutante da proteína regulatória da sinalização

de etileno, *ein2*, com reduzida sensibilidade ao etileno, apresentou maior suscetibilidade a *S. sclerotiorum* do que a planta selvagem (Guo; Stotz, 2007). Ao contrário, Al-Masri et al. (2006) verificaram a presença de etileno em isolados de *S. sclerotiorum* e que a aplicação de ethephon, agente liberador de etileno, aumentou o tamanho da lesão ocasionada por *S. sclerotiorum* em feijão e pepino, enquanto que a aplicação de aminoethoxyvinylglycine (AVG), inibidor da enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) da via de síntese do etileno, reduziu o tamanho da lesão (Al-Masri et al., 2006). Desta forma, o papel da participação do etileno na infecção por *S. sclerotiorum* permanece ainda contraditório.

Seria esperado que o transgênico *35S::nabG* apresentasse menor área de lesão quando comparado com o 'MT' (Figura 1A). Porém, essa maior resistência a *S. sclerotiorum* não foi observada, sendo que o transgênico *35S::nabG* não apresentou diferença estatística para o tamanho de lesão aos 2 DAI quando comparado ao 'MT' (Figura 1A). Perchepied et al. (2010) analisaram mutantes para síntese e sinalização de SA em arabidopsis quando inoculados com *S. sclerotiorum*, mas esses não mostraram nenhuma diferença significativa quando comparados com o tipo selvagem.

Apesar de o ácido salicílico promover a defesa vegetal contra patógenos biotróficos e facilitar a progressão da doença para patógenos necrotróficos, o ácido salicílico parece induzir as respostas de defesa contra *S. sclerotiorum*. Em canola, a aplicação de ácido salicílico promoveu resistência à doença, assim como o nível de SA aumentou logo após a infecção (Wang et al., 2012; Nováková et al., 2014). Da mesma maneira, mutantes *nabG* de arabidopsis inoculados com *S. sclerotiorum* apresentaram maior suscetibilidade quando comparado com o genótipo selvagem (Zhu et al., 2013). Penn e Daniel (2013) mostraram que *S. sclerotiorum* é capaz de degradar salicilato *in vitro*, assim como uma hidroxilase de salicilato foi predita estar presente no genoma de *S. sclerotiorum* (Amselem et al., 2011).

O ácido abscísico foi o único hormônio que pareceu desempenhar um papel importante na infecção por *S. sclerotiorum* em tomateiro. O mutante *sitiens*, com reduzidos níveis de ácido abscísico, apresentou maior média da área de lesão do que o controle 'MT', demonstrando assim maior suscetibilidade a *S. sclerotiorum* (Figura 1A e 1C). Em outros trabalhos, foi verificado que a aplicação de ABA em meio BDA contendo micélio reduziu a taxa de crescimento do fungo *S. sclerotiorum*; no entanto, quando o ABA foi pulverizado em plantas de feijão e pepino, houve um estímulo do desenvolvimento da doença (Al-Masri et al., 2002). Contudo, a aplicação exógena de ABA em plantas de canola resultou na redução do tamanho da lesão causada por *S. sclerotiorum* (Nováková et al., 2014). Foi observado também um forte aumento nos níveis de ABA e uma indução da expressão do gene marcador *RD26*, relacionado ao ABA, em plantas de canola

inoculadas com *S. sclerotiorum*, enquanto que a expressão gênica de *NCED3* não foi modificada (Nováková et al., 2014).

Assim como ocorre em canola e tomateiro uma contribuição positiva do ABA na resistência é sugerida em arabidopsis, onde plantas mutantes insensíveis a ABA apresentam elevada suscetibilidade a infecção por *S. sclerotiorum* (Perchevied et al., 2010). Apesar da infecção por *S. sclerotiorum* aumentar a condutância estomática, com o uso de mutantes insensíveis a ABA e mutantes afetados no fechamento estomático, Guo e Stotz (2010) provaram que o fechamento dos estômatos não regula a susceptibilidade a *S. sclerotiorum* em arabidopsis. Somente os mutantes de ABA apresentaram elevada suscetibilidade a *S. sclerotiorum*, enquanto que não houve diferença nos mutantes afetados para o fechamento estomático (Guo e Stotz, 2010), concluindo que a participação do ABA na resistência a *S. sclerotiorum* não está relacionada a abertura estomática. Folhas de arabidopsis inoculadas com *S. sclerotiorum* acumularam quantidades substanciais de zeaxantina em detrimento da violaxantina e neoxantina, precursores do abscísico ácido (ABA), reduzindo a biossíntese deste hormônio e as respostas de defesa, resultando em um aumento da suscetibilidade de arabidopsis a *S. sclerotiorum* (Zhou et al., 2015). Em resumo, *S. sclerotiorum* parece afetar a produção de ABA, que está diretamente ligada à resistência a *S. sclerotiorum* por meio de mecanismos complexos desconhecidos, possivelmente na interferência da sinalização de SA, JA e ET (Adie et al., 2007; Kaliff et al., 2007; Mauch-Mani; Mauch, 2005).

De maneira geral, o patógeno *S. sclerotiorum* é um típico fungo necrotrófico, visto como um patógeno agressivo, que rapidamente mata as células e tecidos do hospedeiro e que apresenta mais do que quatrocentos hospedeiros (Boland; Hall, 1994). Provavelmente, devido a esta agressividade, pouca diferença foi encontrada entre os genótipos testados quando comparados com o 'MT'.

Similar ao que ocorreu com o fungo necrotrófico *S. sclerotiorum*, houve pouca variação na resistência dos mutantes e transgênicos inoculados com *O. neolycopersici*. Foram realizadas avaliações temporais da área inoculada e do número de lesões em toda a planta, já que este patógeno se dispersa através do ar, originando novas lesões. Somente o mutante *sitiens* e o transgênico de citocinina *35S::AtCKX2* apresentaram uma tendência de serem menos suscetíveis quando comparado com o controle 'MT' (Figura 1B e 1C).

A resistência em espécies do gênero *Solanum* a *Oidium* sp é encontrada em espécies selvagens (*S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. chilense* e *S. peruvianum*), onde o principal mecanismo de resistência encontrado a este patógeno biotrófico é a HR, em alguns casos acompanhado pelo limitado desenvolvimento do patógeno (Mieslerová et al., 2000). Apesar de alguns mecanismos

bioquímicos na interação tomateiro x *Oidium* sp. serem conhecidos, pouco se sabe sobre a participação dos hormônios nesta interação (Tománková et al., 2006).

O mutante *jai1*, insensível ao ácido jasmônico, apresentou um leve acréscimo de suscetibilidade, porém não significativa quando comparada com ‘MT’ (Figura 1B). Em concordância com o observado, mutantes de tomateiro defectivos em ácido jasmônico, *def1*, e inoculados com *O. neolyopersici* não apresentaram diferença nos sintomas quando comparados com o selvagem, sugerindo que a resistência baseada em ácido jasmônico não é requerida nesta interação (Thaler et al., 2004).

Não houve diferença no tamanho da lesão e no número de lesões provocados por *O. neolyopersici* no mutante *Never ripe.*, com baixa sensibilidade ao etileno, quando comparado com o ‘MT’ (Figura 1B). Plantas de tabaco transformadas com o gene *etr1-1* de arábido, insensíveis ao etileno, quando inoculadas com *O. lycopersici* apresentaram um desenvolvimento da doença similar as plantas não transformadas, assim como ocorreu para outros patógenos biotróficos, sugerindo que a sinalização por etileno não é requerida para a resistência a *O. neolyopersici* e a patógenos biotróficos (Geraats et al., 2003).

O ácido salicílico é conhecido por conferir resistência a patógenos biotróficos (Vlot et al., 2009). Desta forma, esperava-se que as plantas do transgênico *35S::nabG*, com reduzidos níveis de AS, apresentassem maior suscetibilidade quando inoculadas com *O. neolyopersici*. No entanto, o transgênico *35S::nabG* não apresentou diferença significativa na média da área de lesão e no número de lesões provocadas por *O. neolyopersici*, quando comparado com o ‘MT’ (Figura 1B). Achuo et al. (2004) encontraram resultados similares, em que mutantes *nabG* de tomateiro apresentaram níveis similares de infecção por *O. neolyopersici* ao selvagem. A aplicação de benzothiadiazole (BTH), um análogo de AS, em tomateiro também não afetou a interação tomateiro x *O. neolyopersici*. Já em tabaco, houve diferença tanto nos mutantes *nabG*, quanto na aplicação de BTH, sendo que as plantas de *nabG* apresentaram maior suscetibilidade e as plantas com aplicação de BTH apresentaram maior resistência ao *O. neolyopersici* (Achuo et al., 2004). Isso sugere que o AS provavelmente não desempenha um papel importante na defesa basal de tomateiro contra *O. neolyopersici*.

Na interação tomateiro x *O. neolyopersici*, o ABA parece ter um papel fundamental na resistência a esse patógeno. O mutante de ácido abscísico *sitiens* apresentou elevada resistência, onde apesar de não haver diferença significativa no tamanho da lesão originada da inoculação, a média foi inferior ao do ‘MT’ (Figura 1B e 1C). Já o número de lesões apresentou diferença significativa, sugerindo que o hormônio promove a resistência a novas infecções (Figuras 1B).

Um estudo sobre o efeito da seca, do estresse salino e do ABA na resistência do tomateiro à *O. neolyopersici* mostrou que o estresse salino não reduziu significativamente a infecção por *O. neolyopersici*, assim como nenhum aumento endógeno do ABA foi observado (Achuo et al., 2006). Já o estresse hídrico aumentou cerca de duas vezes a concentração de ABA endógeno, restringindo o desenvolvimento de *O. neolyopersici* em tomate (Achuo et al., 2006). Em contraste, o mutante *sitiens*, deficiente em ABA, apresentou maior resistência a *O. neolyopersici* em comparação com o tipo selvagem, como foi observado neste trabalho. Já a aplicação exógena de ABA causou um aumento na susceptibilidade do *sitiens* ao patógeno (Achuo et al., 2006). Quando comparado com 'MT', foi observada resistência a *O. neolyopersici* no transgênico *35S::CKX2*, com reduzidos níveis citocinina, que apresentou uma redução na área de lesão e no número de lesões provocados por este patógeno (Figura 1B). Nishiyama et al. (2011), utilizando mutantes de *arabidopsis* deficientes em citocinina pela superexpressão de citocinina oxidase, e mutantes do gene *ipt* da biossíntese, verificou que os níveis de ABA foram significativamente reduzidos e a expressão dos genes da via de biossíntese de ABA foi reprimida em comparação com o selvagem, sugerindo que a resistência a *O. neolyopersici* observada no transgênico *35S::CKX2* naquele experimento poderia ser indiretamente ocasionada pelos reduzidos níveis de ABA.

Juntos estes resultados sugerem que o ácido abscísico apresenta um papel relevante nas interações planta x patógeno, principalmente com *S. sclerotiorum* e *O. neolyopersici*, e que este pode mediar mecanismos complexos de resposta de defesa dependentes do estilo de vida do patógeno.

Figura 1. (A) Área da lesão da doença (cm²) inoculados com *Sclerotinia sclerotiorum* avaliada aos 2 DAI nos mutantes e transgênicos hormonais introgrididos na cv. 'Micro-Tom'. (B) I-Área da lesão da doença (cm²) e II- número de lesões por planta nos mutantes e transgênicos hormonais introgrididos na cv. 'Micro-Tom' inoculados com *Oidium neolycopersici* avaliada aos 18 DAI. (C) Plantas de 'MT' e do mutante *sitiens* inoculadas com *S. sclerotiorum* aos 2 DAI e *O. neolycopersici* aos 18 DAI. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Foram avaliados quatro blocos com sete plantas em cada bloco.

A resposta diferencial a patógenos de estilos de vida contrastantes é parcialmente dependente do nível de ABA

Para confirmar a hipótese de que o ABA participa na resposta diferencial a infecção por *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici* foi realizado um experimento utilizando o 'MT' como controle, juntamente com o mutante *sitiens* e com o mutante *sp12*, com elevados níveis de ABA (Thompson et al., 2007), com ou sem aplicação de 100 μ M ABA ou 2 μ M fluridone, um inibidor da síntese de ácido abscísico, com o objetivo de restauração do fenótipo. Assim, obtivemos os tratamentos 'MT', 'MT'+100 μ M ABA, 'MT'+2 μ M fluridone, *sitiens*, *sitiens*+100 μ M ABA, *sp12* e *sp12*+2 μ M fluridone inoculados com *S. sclerotiorum* ou *O. neolycopersici*, onde foram avaliados a área de lesão aos 2 DAI para *Sclerotinia* e a área de lesão e o número de lesões para *Oidium* aos 18 DAI.

Foi observado que o mutante *sitiens* apresentou maior suscetibilidade que o controle 'MT' quando inoculado com *Sclerotinia* apresentando diferença estatisticamente significativa (Figura 2A). Esse resultado foi similar ao encontrado no experimento anterior. Apesar do mutante *sp12* apresentar elevados níveis de ABA, este apresentou área de lesão de *S. sclerotiorum* similar ao 'MT' (Figura 2A). O mesmo comportamento foi observado em plantas de 'MT' com aplicação exógena de 100 μ M ABA, onde não foi possível diferenciar um aumento na resistência a *S. sclerotiorum* (Figura 2A). Assim, plantas que são esperadas terem elevados níveis de ABA ('MT'+ABA e *sp12*) não apresentaram aumento na resistência a *S. sclerotiorum*.

Já a aplicação exógena de 100 μ M ABA no mutante *sitiens* conferiu maior resistência a *S. sclerotiorum*, reduzindo a área de lesão quando comparado com o mutante *sitiens* sem aplicação exógena de ABA, e apresentando comportamento similar ao 'MT', verificando a restauração do fenótipo e confirmando o papel do ABA nesta interação (Figura 2A). Já a aplicação exógena de 2 μ M fluridone em 'MT' e *sp12* provocou um aumento da suscetibilidade a *S. sclerotiorum*, observado através do aumento na área de lesão (Figura 2A). A restauração dos baixos níveis de ABA com aplicação exógena promove um aumento na resistência, enquanto que a redução dos níveis desse hormônio aumenta a suscetibilidade a *S. sclerotiorum*. Já a resistência a *S. sclerotiorum* promovida pelo ABA é parcialmente dependente da dose, sendo que níveis mais elevados de ABA não induzem aumento na resistência a *S. sclerotiorum*.

Apesar da tendência de redução do tamanho da lesão provocada por *O. neolycopersici* no mutante *sitiens* observada no *screening* com mutantes e transgênicos, essa redução não foi estatisticamente significativa (Figura 1BI). Porém, neste experimento, o mutante *sitiens* apresentou redução no tamanho da lesão de *O. neolycopersici* quando comparado com o 'MT', similar ao

observado no experimento anterior; essa resistência foi estatisticamente significativa (Figura 2B). O mesmo foi verificado com o número de lesões, em que um número significativamente menor de lesões foi observado no mutante *sitiens* (Figura 2B). Era esperado que o mutante *sp12*, com elevados níveis de ABA, apresentasse maior suscetibilidade que o ‘MT’. Porém, foi observado um comportamento similar ao do ‘MT’ quando avaliado para a área de lesão inoculada e número médio de lesões (Figura 2B), sugerindo que elevados níveis de ABA não provocam um aumento na suscetibilidade a infecção por *O. neolycopersici*. A aplicação exógena de ABA em ‘MT’ resultou em um comportamento similar ao *sp12*, não modificando a resistência a esse patógeno, portanto, não apresentando diferença estatística no tamanho da lesão (Figura 2B). Curiosamente, no tratamento ‘MT’+ABA houve um aumento no número médio de lesões de *O. neolycopersici* (Figura 2B). Assim, igualmente ao comportamento observado em plantas com níveis mais elevados de ABA e inoculadas com *S. sclerotiorum*, níveis mais elevados de ABA não promovem maior suscetibilidade a *O. neolycopersici*.

Já a aplicação de ABA em mutantes *sitiens* aumentou a média da área de lesão e o número de lesões quando comparado com *sitiens* sem aplicação exógena, ambos inoculados com *O. neolycopersici*, apresentando diferença estatística nos dois parâmetros avaliados (Figura 2B). Assim, a aplicação exógena de ABA levou a restauração do fenótipo em *sitiens* inoculado com *O. neolycopersici*, assim como foi observada com *sitiens* inoculado com *S. sclerotiorum*. Achuo et al. (2006) observaram que plantas de tomateiro WT e *sitiens* inoculadas com *O. neolycopersici* e pulverizadas com 100 μ M ABA não tiveram alteração no tamanho das lesões. Já o mutante *sitiens* com aplicação elevada de ABA (>250 μ M) apresentou maiores lesões com a aplicação de ABA exógena.

A aplicação exógena do inibidor de ABA, 2 μ M fluridone via radicular em plantas de ‘MT’ e do mutante *sp12* promoveu uma redução da área de lesão, assemelhando-se ao mutante *sitiens*, porém somente plantas do tratamento *sp12*+fluridone apresentaram alterações estatisticamente significativas e igual ao mutante *sitiens* (Figura 2B). Já o número médio de lesões foi fortemente reduzido com a aplicação de fluridone e apresentou diferença estatística do ‘MT’ e *sp12* sem aplicação de fluridone (Figura 2B).

Estes resultados confirmam que o ABA participa da regulação da defesa a esses dois patógenos de estilos de vida contrastantes, porém de maneira parcialmente dependente do nível de ABA, onde níveis mais elevados de ABA, como observados nos tratamentos ‘MT’+ABA e *sp12*, não provocam mudanças na resistência/suscetibilidade a ambos os patógenos quando comparado com o ‘MT’.

Figura 2. Área da lesão da doença (cm²) nos mutantes *sitiens* (*sit*), *sp12* e no controle 'MT' com aplicação exógena de 100 µM ABA ou 2 µM fluridone (flu) inoculados com (A) *Sclerotinia sclerotiorum* avaliados aos 2 DAI e com (B) *Oidium neolycopersici* avaliados aos 18 DAI. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Foram avaliadas 10 repetições em cada tratamento.

A interação com ambos os patógenos induzem a um acúmulo de ABA em ‘MT’, resultante da repressão da degradação do ABA

Para entender o comportamento do ABA durante a infecção por ambos os patógenos, foi realizada a quantificação do hormônio ABA em folhas de plantas de ‘MT’ e *sitiens* inoculadas com *S. sclerotiorum* ou *O. neolyopersici*. A quantificação indicou um acúmulo de ABA em ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum* em 24 HAI e em ‘MT’ inoculado com *O. neolyopersici* em 168 HAI (Figura 3A). Os níveis de ABA do ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum* retornam ao nível do controle não inoculado em 48 HAI (Figura 3A). O nível basal de ABA do controle ‘MT’ não inoculado para *O. neolyopersici* permaneceu elevado, devido, provavelmente, a um estresse ocasionado pela ausência de câmara úmida e baixa umidade que ocorre na câmara de crescimento durante o período de 168 h, enquanto que no controle ‘MT’ não inoculado para *S. sclerotiorum* a presença da câmara úmida fez com que o nível de ABA não aumentasse no período mais curto (Figura 3A). Já o nível de ABA em *sitiens* foi alterado somente quando inoculado com *O. neolyopersici*, porém a magnitude do aumento foi muito pequena (Figura 3A). Estes dados confirmam os níveis reduzidos de ABA no mutante *sitiens*, e sugerem que provavelmente os patógenos não possuem habilidade para sintetizar este hormônio.

Para confirmar o aumento nos níveis de ABA foi realizado um experimento com a linha transgênica *RD29B::GUS*. Essa linha transgênica possui o gene repórter de β -glucoronidase (*GUS*) dirigido por promotor responsivo ao ABA (Nakashima et al., 2006; Bihmidine et al., 2013). Plantas *RD29B::GUS* foram inoculadas com *S. sclerotiorum* ou *O. neolyopersici* e coletadas para o ensaio histoquímico aos 24 HAI ou 168 HAI, respectivamente. Um controle positivo com aplicação exógena de solução 100 μ M ABA foi utilizado. Foi verificado que as plantas inoculadas com ambos os patógenos tiveram uma indução da expressão do gene *GUS*, observado pela forte coloração azul nos momentos analisados (Figura 3B), indicando um possível acúmulo de ABA e indução de genes resposnsivos ao ABA. Foi possível observar também coloração azulada no controle positivo em forma de pontuações, possivelmente pela deposição em formas de gotas da solução de ABA na superfície das folhas (Figura 3B), sendo o gene induzido no local de deposição da gota.

Para avaliar o acúmulo do hormônio ABA foi realizado a análise da expressão de dois genes associados ao metabolismo de ABA, sendo um de síntese (*NCED1*) e outro de degradação (*CYP707a*) em folhas de ‘MT’ e *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum* em 2 DAI e *O. neolyopersici* em 168 HAI. O nível de expressão foi relativo ao ‘MT’ não inoculado usando dois genes de referência, *GAPDH* e *ubiquitin*. O ABA é derivado de 9-cis-neoxantina ou de 9-cis-violaxantina

ou de ambos, que são clivados pela enzima dioxigenase 9-cis-epoxicarotenoide (NCED) para produzir xantoxina, o precursor de ABA (Cutler; Krochko, 1999; Liotenberg et al., 1999; Taylor et al., 2000). No genoma de tomateiro são encontrados três genes codificando esta enzima *NCED1* (*notabilis*), *NCED2* e *NCED4* (Fernando-Pozo et al., 2015). Apesar do gene *NCED1* codificar esta enzima chave no controle da síntese de ABA, não foi possível observar diferença significativa na sua expressão entre os genótipos ‘MT’ e *sitiens* não inoculados e inoculados com *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici* em diferentes momentos após a inoculação (Figura 3C). Isso talvez tenha ocorrido porque a mutação em *sitiens* ocorre em uma oxidase do ABA-aldeído da etapa final da via de produção de ABA, posterior a *NCED*. Assim, o acúmulo de ABA não parece ser pela indução da via de síntese de ABA.

Os membros da família *CYP707A* codificam ABA 8'-hidroxilases, enzima que hidroxila o ABA na posição 8' para produzir 8'-hidroxi-ABA, no qual espontaneamente se isomeriza a ácido faséico, sendo considerada a principal via de catabolismo do ABA (Nambara; Marion-Poll, 2005). Foi observada uma tendência de inibição na expressão gênica do *CYP707A* no genótipo ‘MT’ inoculados com ambos os patógenos a partir de 24 HAI, com repressão significativa detectada em ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum* aos 24 HAI (Figura 3C), sugerindo que o acúmulo deste hormônio neste tempo pode ser devido, pelo menos parcialmente, a repressão da degradação de ABA. Já o mutante *sitiens* apresentou repressão significativa na expressão do gene *CYP707A* (Figura 3C). Isto pode ter ocorrido porque o mutante *sitiens* possui reduzidos níveis de ABA, fazendo com que não seja necessária a expressão deste gene de degradação (Figura 3C).

Desta forma, independente do estilo de vida do patógeno, a infecção por *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici* induz a um acréscimo nos níveis de ABA, possivelmente, pela repressão da via de degradação do hormônio.

Figura 3. (A) Níveis de ácido abscísico em folhas de 'MT' (barras pretas) e *sitiens* (barras cinzas) não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 e 48 HAI e com *Oidium* sp. em 168 HAI. As médias são resultantes de três replicatas biológicas. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro do genótipo e minúsculas entre genótipos pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). (B) Coramento histoquímico de GUS em transgênicos *RD29B::GUS*, com promotor responsivo ao ácido abscísico, inoculados com *S. sclerotiorum* e *O. neolyopersici*, avaliados com 24 HAI e 168 HAI, respectivamente, e com aplicação exógena de 100 μ M ABA, como controle positivo (C) Expressão relativa de genes responsivos ao ácido abscísico em folhas de 'MT' e *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum* (barras pretas) e *O. neolyopersici* (barras cinzas), em relação ao controle 'MT' não inoculado de cada período. A expressão gênica relativa foi calculada no programa REST utilizando os valores do C_Q determinado por RT-qPCR e normalizados pelos genes de referência *GAPDH* e *ubiquitin*. O '*' indica significância estatística a $p < 0,05$ de acordo com o REST. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento

A via da biossíntese de ABA é regulada durante a interação com ambos os patógenos em ‘MT’ e *sitiens*, resultando em um provável acúmulo de intermediários no mutante *sitiens*

O ácido abscísico pertence a classe de metabólitos conhecidos como isoprenóides, também chamado de terpenóides (Nambara; Marion-Poll, 2005). Evidências da biossíntese de ABA a partir de carotenóides foram obtidas com experimentos com ^{18}O , análise genética molecular de mutantes e estudos bioquímicos (Rock; Zeevaart, 1991; Schwartz; Qin; Zeevaart, 2003). O ABA é produzido através de algumas reações a partir de zeaxantina e parte desta via é conhecida também como ciclo das xantofilas. Este ciclo produz a violaxantina a partir de zeaxantina pela enzima zeaxantina epoxidase (ZEP) e uma reação reversa ocorre transformando violaxantina em zeaxantina através da enzima violaxantina de-epoxidase (VDE) (Figura 4). Em

Para verificar mudanças ocorridas no ciclo das xantofilas em folhas de ‘MT’ e do mutante *sitiens*, quando inoculadas com ambos os patógenos, foi realizada a análise da expressão de genes da via de ABA através de RNA-Seq.

Em ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum* 24 HAI foi verificada uma maior repressão do gene da enzima VDE, fazendo com que a conversão de violaxantina a zeaxantina seja baixa (Figura 4). Porém, em *sitiens* inoculado com *S. sclerotiorum* 24 HAI, essa repressão do gene VDE apresentou-se menor, sugerindo uma participação da enzima VDE na conversão de violaxantina a zeaxantina (Figura 4).

VDE é uma proteína encontrada no lúmen do cloroplasto, solúvel em pH neutro, mas que se liga à membrana do tilacóide sob pH ácido e é codificada por apenas um gene em tomateiro (Yamamoto; Higashi, 1978; Hager; Holocher, 1994; Liu et al., 2003). VDE usa ascorbato como co-substrato e tem sua atividade induzida sob pH reduzido (Bratt et al., 1995). Esperava-se que a inoculação de *S. sclerotiorum* induzisse a expressão do gene que codifica a enzima VDE, visto que esse patógeno possui um mecanismo de redução do pH celular através da liberação de ácido oxálico (Marciano; Di Lenna; Magro, 1983). Porém, o gene que codifica VDE teve sua expressão reprimida, ao invés de ser induzida pelo baixo pH do lúmen (Figura 4).

Em resposta a inoculação com *O. neolycopersici*, a expressão do gene de VDE foi reprimida nos dois genótipos. Porém, o ‘MT’ apresentou menor repressão do gene da enzima VDE quando comparado com o mutante *sitiens* (Figura 4). Em compensação o gene da enzima ZEP, apresentou uma leve indução, sugerindo um possível aumento do fluxo da via para a produção de ABA (Figura 4).

Outro ponto importante a ser notado é a diferença na indução de genes da via de síntese de ABA de acordo com o estilo de vida do patógeno. Foi observado que há uma tendência de

maior acúmulo de ABA em plantas de ‘MT’ inoculadas com *O. neolycopersici* do que com *S. sclerotiorum* (Figura 3A) e em plantas do transgênico *RD29B::GUS* com *O. neolycopersici* (Figura 3B). Em plantas inoculadas com *O. neolycopersici* há uma indução do gene *NCED1*, enquanto que em plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* há indução do gene *ABA2* (Figura 4). Provavelmente, o gene *NCED1*, mesmo sendo pertencente a uma família gênica, seja um gene que codifica uma enzima limitante na via de biossíntese de ABA (Sun et al., 2012) e a indução ou repressão desse gene, pode provocar mudanças bruscas nos níveis de ABA, como observado em plantas inoculadas com *O. neolycopersici* (Figura 3A).

Uma observação interessante, é que se esperava uma repressão do gene *sitiens* em mutantes de *sitiens*, porém isso não foi observado (Figura 4).

Em resumo, plantas de ‘MT’ inoculadas com ambos os patógenos apresentam uma fluidez da via de biossíntese de ABA, devido a repressão do gene *VDE* e ausência da mutação no gene que codifica a enzima da etapa final de formação de ABA (*sitiens*). Já no mutante *sitiens*, provavelmente ocorre o acúmulo de intermediários, devido a mutação ocorrida no gene *sitiens*.

Figura 4. Heatmap de genes relacionados ao ciclo das xantofilas e biossíntese do ABA onde em azul e laranja representam valores de log2 fold change positivos e negativos, em relação ao controle ‘MT’ não inoculado, respectivamente. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento.

A interação com ambos os patógenos desencadeia explosão oxidativa somente no mutante *sitiens*, induzindo resposta de hipersensibilidade em plantas inoculadas com *O. neolycopersici*.

Uma rápida geração de EROs pode ser observada após a detecção do patógeno. Um dos principais papéis das EROs é servir como moléculas de sinalização nas células. No entanto, foi demonstrado que altos níveis de EROs levam à morte celular por serem moléculas altamente reativas e destrutivas a compostos celulares (Møller; Jensen; Hansson, 2007; Roldán-Arjona; Ariza, 2009).

Para investigar a participação do ABA no acúmulo de EROs, foi realizada a quantificação de H_2O_2 por espectrofotometria em folhas de plantas de 'MT' e *sitiens* inoculadas ou não com *S. sclerotiorum* a 24 HAI ou *O. neolycopersici* a 168 HAI (Figura 5A). Os níveis quantificados por espectrofotometria indicam todo o H_2O_2 encontrado intracelularmente e extracelularmente. Houve acúmulo de H_2O_2 em 'MT' e *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum* ou *O. neolycopersici* (Figura 5A), quando comparado com os controles não inoculados. Os níveis basais de H_2O_2 em *sitiens* são mais elevados sem a inoculação quando comparado com 'MT' não inoculado (Figura 5A), indicando uma maior produção de H_2O_2 nesse mutante. No geral, com ou sem inoculação, os níveis de H_2O_2 são maiores em *sitiens*, indicando um possível efeito destrutivo (Figura 5A). Este resultado foi confirmado parcialmente e a extensão dessa produção foi observada em um ensaio histoquímico com 3,3-diaminobenzidina (DAB), no qual é visualizado o acúmulo de H_2O_2 apoplástico, e foi observado um grande acúmulo de H_2O_2 no mutante *sitiens* ao redor do sítio de infecção de *S. sclerotiorum* em 24 DAI e de *O. neolycopersici* em 168 HAI (Figura 5B). Não foi observado nenhum acúmulo de H_2O_2 apoplástico em plantas não inoculadas (Figura 5B). A elevada produção de H_2O_2 em *sitiens* em condições de alta umidade e baixa luminosidade parece estar associada ao desbalanço na cadeia transportadora de elétrons entre os fotossistemas (ver nível de expressão relativa de genes do fotossistema em *sitiens* não inoculado-Figura S4).

Para esclarecer se o papel dessa geração de H_2O_2 é de sinalização ou de morte celular, foi realizado um ensaio histoquímico com 0,05 % *Trypan Blue* para verificar a morte celular em folhas inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI ou *O. neolycopersici* em 168 HAI. Correspondente ao encontrado com o acúmulo de H_2O_2 , o coramento com *Trypan Blue* revelou uma intensa morte celular no mutante *sitiens* inoculados com ambos os patógenos (Figura 5C). Essa necrose é bem típica em algumas novas lesões de *O. neolycopersici* no mutante *sitiens*, onde esta morte celular é rápida e aparecem como pontuações que parecem limitar o crescimento do patógeno (Figura 5D). Já em 'MT', ocorre geralmente uma clorose antecedente a necrose, o que normalmente não

é observado em *sitiens*. Provavelmente, este tipo de morte celular em *sitiens* seja ocasionada pelo elevado acúmulo de H_2O_2 (EROs), levando a resistência do tipo HR a *O. neolycopersici* e suscetibilidade a *S. sclerotiorum*.

Figura 5. (A) Conteúdo de H_2O_2 em folhas de 'MT' e *sitiens* não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI e *O. neolycopersici* em 168 HAI. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) (B) Ensaio histoquímico de coramento de (A) H_2O_2 com DAB e (B) de morte celular com Trypan Blue em folhas de 'MT' e *sitiens* não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI e *O. neolycopersici* em 168 HAI (D) Morte celular em folhas de *sitiens* similar a HR em novas lesões de *O. neolycopersici*. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento.

O funcionamento adequado da via de biossíntese de ABA permite a remoção de H_2O_2 por meio do ascorbato em ‘MT’, enquanto a resistência a *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici* parece ser mediada pelo aumento do conteúdo de GSH

O status antioxidante parece estabelecer o limiar para respostas gerais de defesa da planta. Uma das principais vias de remoção de H_2O_2 das plantas inclui o ciclo ascorbato-glutationa ou ciclo ‘Foyer-Hallinwell-Asada’, que ocorre nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias, apoplasto e peroxissomos e que interage com o ciclo das xantofilas nos cloroplastos (Foyer; Noctor, 2011). Esses antioxidantes de baixo peso molecular funcionam como tampões redox, que interagem com numerosos componentes celulares. Os antioxidantes ácido ascórbico e glutathione são encontrados em altas concentrações em cloroplastos e outros compartimentos celulares (5 a 20 mM ácido ascórbico e 1 a 5 mM de glutathione) e são cruciais para a defesa contra o estresse oxidativo (Noctor; Foyer, 1998). Além disso, esse ciclo se encontra interagindo diretamente com o ciclo das xantofilas e de biossíntese de ABA no cloroplasto, através da enzima VDE (López-Carbonell, Munné-Bosch, Alegre, 2006).

Desta forma, foi realizada a quantificação desses antioxidantes reduzidos e oxidados com o objetivo de verificar sua participação na remoção de H_2O_2 e como os níveis destas moléculas são afetados em ‘MT’ e *sitiens* inoculados com *Sclerotinia* ou *Oidium*. O conteúdo de ascorbato reduzido diminuiu com a infecção por cada um dos patógenos em ‘MT’ (Figura 6A) e o conteúdo de ascorbato oxidado (dehidroascorbato) apresentou um leve aumento em ‘MT’ (Figura 6B). Essa redução no conteúdo de ascorbato pode sugerir uma oxidação do ascorbato, e que provavelmente, tenha ocorrido uma participação do ascorbato na remoção de H_2O_2 do apoplasto nesse genótipo. Ao verificar a expressão de genes relacionados ao ascorbato, foi possível observar uma forte indução de uma oxidase do ascorbato em todos os tratamentos (Figura 6C-seta azul). Porém, um outro gene para a oxidase do L-ascorbato é reprimido em *sitiens* inoculados com ambos os patógenos (Figura 6C-seta vermelha). Diferentemente do citoplasma, onde são encontrados NADPH e glutathione, a principal forma de remoção de EROs no apoplasto é através de oxidases e peroxidases do ascorbato, que utiliza ascorbato como substrato, sendo este transportado do citoplasma para o apoplasto (Horemans et al., 2000). Já a expressão do gene que codifica a enzima dehidroascorbato redutase (DHAR), que liga o ciclo do ascorbato ao ciclo da glutathione, foi reprimido em todos os tratamentos, mas principalmente em ‘MT’ inoculado com *Sclerotinia* (Figura 6C). A repressão da expressão desse gene induz a um acúmulo de ascorbato oxidado (Figura 6B) e a um acúmulo de glutathione reduzida (Figura 7A). Assim, em ‘MT’ o ascorbato produzido na célula parece ser utilizado pela peroxidases e peroxidases do

ascorbato (Figura S3) ou transportado para o apoplasto para a remoção de H_2O_2 por oxidases e peroxidases do ascorbato.

Já no mutante *sitiens* não foi observado nenhuma mudança no conteúdo de ascorbato reduzido (Figura 5A) com a inoculação com ambos os patógenos, porém, o conteúdo de dehidroascorbato teve uma tendência de redução (Figura 6B), indicando um possível acúmulo de ascorbato pela dehidroascorbato redutase. Ou seja, apesar da expressão do gene que codifica a enzima DHAR estar reprimida em *sitiens*, essa enzima parece ser regulada pós-transcricionalmente permitindo a regeneração do ascorbato reduzido (Figura 6C). Outra hipótese, é de que o ascorbato reduzido não é oxidado e o único gene que poderia explicar, através da sua expressão, a ausência de modificação no conteúdo de ascorbato reduzido é o gene da oxidase do L-ascorbato (Figura 6C), pois este teve uma leve tendência de repressão da expressão. Porém, fica claro, que esta análise é a nível transcricional, e muitas outras mudanças a níveis pós-transcricionais ocorrem e que podem modificar totalmente a regulação de uma proteína.

Figura 6. (A) Conteúdo de (A) ascorbato reduzido (AsA) (B) e ascorbato oxidado (DHA) em folhas de ‘MT’ e *sitiens* não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI e *O. neolycopersici* em 168 HAI. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) (C) Heatmap de genes relacionados ao metabolismo do ascorbato onde em azul e laranja representam valores de $\log_2$ fold change positivos e negativos, em relação ao controle ‘MT’ não inoculado, respectivamente. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento.

Provavelmente, devido a repressão da expressão do gene da enzima DHAR (Figura 6C) e do conteúdo elevado de dehidroascorbato (Figura 6B), o ciclo do ascorbato parece induzir a repressão da oxidação da glutatona reduzida, levando ao acúmulo de glutatona reduzida em ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum* (Figura 7A). Porém, no mutante *sitiens* inoculado com *S. sclerotiorum*, o conteúdo de glutatona reduzida diminui, provavelmente pela indução da

regeneração do ascorbato reduzido a partir do DHA (Figura 6B e 7A), sendo sugerido também que essa redução no conteúdo de glutathione pode ser devido a sua oxidação na remoção de H_2O_2 .

Em ‘MT’ inoculado com *O. neolycopersici*, o nível de glutathione reduzida foi diminuído (Figura 7A). Esse resultado, pode sugerir uma participação da oxidação de glutathione na remoção de EROs dentro da célula. Assim, as interações suscetíveis (*sitiens* inoculado com *Sclerotinia* e ‘MT’ inoculado com *Oidium*) parecem utilizar a glutathione reduzida, verificado pela redução do conteúdo desta, para a remoção das H_2O_2 e tentativa de redução da morte celular.

Era esperado uma redução nos níveis de glutathione no mutante *sitiens* quando inoculado com *O. neolycopersici*, visto que a redução na remoção de EROs nessa interação poderia aumentar a suscetibilidade. Porém, foi encontrado que os níveis de glutathione teve um grande aumento nessa interação. Foi verificado que na interação incompatível entre o genótipo ‘AlgR’ de cevada e oídio, ocorre um aumento nos níveis de glutathione, enquanto que na interação compatível entre o genótipo ‘AlgS’ e oídio não é observado um aumento na quantidade desse antioxidante (Vanacker; Carver; Foyer, 2000). A maior disponibilidade de EROs pode ativar a síntese de glutathione (Ball et al., 2004), e o aumento resultante na glutathione citosólica está de alguma forma ligada à indução ou ativação de uma glutathione tiorredoxina ou glutaredoxina que é capaz de reduzir a NPR1 no citoplasma (Kovacs; Durner; Lindermayr, 2015). A redução da NPR1 está associada ao seu acúmulo no núcleo e sua interação com fatores de transcrição TGA para induzir a expressão de genes PR (Zhou et al., 2000). Apesar de não ter sido visualizado diferença entre o transgênico de ácido salicílico, *35S::nabG* e o ‘MT’ na resistência a *O. neolycopersici* (Figura 1B), este hormônio é reconhecidamente importante na defesa contra patógenos biotróficos e na indução da HR em interações incompatíveis. Desta forma, além de ter sido verificado um aumento nos níveis de ácido salicílico em *sitiens* inoculado com *O. neolycopersici* (Figura S1), foi observado aumento nos níveis de expressão de *NPR1* e *PR1a* (Figura S2). Assim, o elevado nível de glutathione pode estar relacionado a indução da sinalização de genes de AS, que está diretamente envolvido com a HR.

Em resumo, o estado redox da glutathione parecem ser reduzidos em interações suscetíveis e a oxidação da glutathione reduzida, nem sempre está associada a oxidação de ascorbato.

Figura 7. Conteúdo de (A) glutatona reduzida (GSH) (B) e glutatona oxidada (GSSG) em folhas de ‘MT’ e *sitiens* não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI e *O. neolycopersici* em 168 HAI. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$) (C) *Heatmap* de genes relacionados ao metabolismo do ascorbato onde em azul e laranja representam valores de $\log_2$ *fold change* positivos e negativos, em relação ao controle ‘MT’ não inoculado, respectivamente. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento.

3.3. Discussão

Tão importante quanto o nível dos hormônios associados a resposta de defesa clássicos, ácido jasmônico e ácido salicílico, é o nível de outros hormônios, que muitas vezes são mais reconhecidos por outras funções, que não sejam de defesa a patógenos. Entre esses, encontra-se o ácido abscísico, que é reconhecidamente importante na regulação da dormência de sementes, tolerância a estresses abióticos e amadurecimento de frutos (Finkelstein; Gampala; Rock, 2002; Tuteja, 2007; Jia et al., 2011). Já foram observadas a participação do ABA na resistência e/ou suscetibilidade em inúmeras interações entre hospedeiros e patógenos (Mohr; Cahill, 2003; Achuo et al., 2004; Asselbergh et al., 2008). Alguns trabalhos já demonstraram a participação do ABA na indução de resistência a *S. sclerotiorum* e suscetibilidade a *O. neolycopersici* (Achuo et al., 2006; Perchepped et al., 2010; Guo e Stotz, 2010). Aqui, nós verificamos que o mutante *sitiens*, com reduzidos níveis de ABA, apresenta uma resposta contrastante quando comparado com o MT, mostrando maior suscetibilidade a *S. sclerotiorum* e resistência parcial a *O. neolycopersici*. Essa resistência ou suscetibilidade a patógenos é parcialmente dependente de ABA, pois níveis de ABA mais elevados encontrados no mutante *sp12* e em MT com aplicação exógena de ABA não modificou a resistência a ambos os patógenos. Porém, apesar da confirmação do ABA nessas interações, não é bem conhecido como o ABA pode influenciar na resistência e suscetibilidade a esses patógenos.

Foi observado neste trabalho elevados níveis de H_2O_2 no apoplasto em *sitiens*. A produção de H_2O_2 no mutante *sitiens* já foi caracterizada em plantas de tomate inoculadas com *B. cinerea* (Asselbergh et al., 2007). Essa elevada produção de H_2O_2 na interação *sitiens* x *B. cinerea* foi inicial e mais forte do que no tomateiro selvagem e levou a um acúmulo de peroxidases no apoplasto e fortalecimento da parede celular e resultou em uma maior resistência a *B. cinerea*, mesmo sendo este um patógeno necrotrófico (Asselbergh et al., 2007; Asselbergh; Höfte, 2007). Aqui, foi verificado que esse aumento de H_2O_2 resultou em um aumento da morte celular programada em *sitiens* quando inoculados com ambos os patógenos.

Já que a participação dessas EROs é relevante na defesa a patógenos de estilos de vida contrastantes, principalmente na indução de morte celular do tipo HR, nada mais essencial do que se ter um sistema antioxidativo potente para a remoção do excesso dessas EROs, pois o limiar de produção e remoção de EROs é o que dita a resistência ou suscetibilidade a um patógeno necrotrófico ou biotrófico.

Os principais antioxidantes celulares não enzimáticos (ascorbato e glutatona) são encontrados no cloroplasto. Os papéis mais importantes do ascorbato estão na fotossíntese, atuando na reação de Mehler através da peroxidase do ascorbato para regular o estado redox da

cadeia transportadora de elétrons e como cofator para a VDE, uma enzima envolvida na fotoproteção encontrada no ciclo das xantofilas (Smirnoff; Wheeler, 2000). Uma mutação na via de biossíntese de ABA, como a que ocorre em *sitiens*, parece desencadear acúmulo de intermediários da via biossintética de ABA, que são removidos, em parte, pela redução da repressão do gene *VDE*, e uma provável oxidação do ascorbato por essa via, fazendo com que esse ascorbato fique indisponível para a remoção de H_2O_2 por peroxidases ou oxidases do ascorbato no cloroplasto e no apoplasto. Na sequência, esse ascorbato oxidado pela VDE parece ser prontamente repostado pela enzima DHAR. Como pode ser observado no mutante *sitiens*, além de possuir elevados níveis de H_2O_2 no apoplasto quando inoculados, o mesmo parece não conseguir oxidar o ascorbato por peroxidases do ascorbato e remover o H_2O_2 , que consequentemente resultará em um maior acúmulo dessa e de outras EROs.

Muitos fatores afetam a síntese da glutathiona, mas os considerados mais importantes são a atividade da gamma glutamilcisteína sintetase (γ -ECS) e a disponibilidade de cisteína. O aumento da atividade de γ -ECS pode resultar de alterações transcricionais ou pós-transcricionais (May et al., 1998), mas, até o momento, poucas condições mostraram indução de transcritos de *GSH1* (codifica uma gamma glutamilcisteína sintetase) ou *GSH2* (codifica uma glutathiona sintetase) (Xiang & Oliver, 1998; Sung et al., 2009). No entanto, nem a aplicação de H_2O_2 exogenamente, nem o H_2O_2 intracelular levam a indução dos transcritos *GSH1* ou *GSH2* em rosetas de arabidopsis, apesar de ter sido verificado um aumento nos teores de glutathiona nessas condições (Smith et al., 1984; May; Leaver, 1993; Willekens et al., 1997; Sánchez-Fernández et al., 1998; Xiang; Oliver, 1998; Queval et al., 2009). Embora tenham sido apresentadas algumas evidências de que a produção da proteína γ -ECS é regulada em nível traducional (Xiang; Bertrand, 2000), o controle pode ser por meio de modificações pós-traducionais através do estado redox da célula. No presente trabalho, foi observado que os níveis de glutathiona diferiram em todas as interações, sendo que as interações suscetíveis ('MT' x *Oidium* e *sitiens* x *Sclerotinia*) tiveram redução no conteúdo de GSH, quando comparado ao seu controle não inoculado. Essas modificações não foram confirmadas pelo nível de expressão dos genes de síntese gamma glutamilcisteína sintetase (*GSH1*) e sintetase da glutathiona (*GSH2*). Somente, foi verificado que esses genes *GSH1* e *GSH2* foram regulados de acordo com o patógeno sendo suas expressões induzidas com a inoculação com *Sclerotinia* e reprimidos com *Oidium*. Portanto, a regulação do *status* de glutathiona reduzida parece ocorrer através da síntese em nível traducional e não está diretamente relacionada a oxidação pela DHAR, visto que na interação *sitiens* x *O. neolycopersici* o elevado acúmulo de glutathiona não está relacionado com aumento nos níveis de ascorbato. Além da remoção de EROs nas interações, a glutathiona atua diretamente na regulação do status redox

da célula e monomerização do receptor de SA, NPR1, que induz a defesa a patógenos (Kovacs; Durner; Lindermayr, 2015).

Além do protagonismo da via do ABA na remoção de H_2O_2 apoplástico por meio do ascorbato e glutathione, o próprio hormônio deve ter um papel na resistência a *Sclerotinia* e *Oidium*, visto que a aplicação exógena de ABA no mutante *sitiens* induziu a resistência a *Sclerotinia* e suscetibilidade a *Oidium*. Assim, o ABA exógeno não pode modificar o acúmulo diferencial de intermediários da via das xantofilas devido a presença da mutação em *sitiens*, portanto não pode alterar indiretamente os níveis do ascorbato e da glutathione pela via das xantofilas. Assim, esse efeito observado no mutante com a aplicação exógena pode ser devido ao próprio hormônio ABA regulando genes de resistência ou suscetibilidade a patógenos.

Assim, um modelo é sugerido para os dois genótipos (Figura 8). Em 'MT', a via para produção de ABA é priorizada, provavelmente sem o acúmulo de zeaxantina. A enzima VDE é reprimida, não tendo gasto de ascorbato pela VDE. O ascorbato é então transportado para o apoplasto, onde encontra maior atividade de ascorbato oxidase e peroxidases e remove assim o H_2O_2 produzido. Já em *sitiens*, ocorre uma maior produção de H_2O_2 , mesmo quando não inoculado. Para a remoção desse peróxido, há a necessidade de uma maior atividade antioxidante, porém o ascorbato parece ser utilizado pela VDE e fica indisponível para ser transportado para o apoplasto e remover H_2O_2 . Já o nível de glutathione parece ser regulado pós-traducionalmente e pode estar relacionada a remoção de EROs e modificação no *status* redox da célula em interações suscetíveis.

Figura 8. Participação da via de biossíntese do ABA na resistência a patógenos de estilos de vida contrastantes. Alterações na via de síntese do ABA, provocada por mutações, como em *sitiens*, podem levar ao acúmulo de zeaxantina e aumentar a atividade de VDE, que por sua vez, oxida o ascorbato, reduzindo seus níveis para remoção de H_2O_2 através de peroxidases e oxidases do ascorbato. Esse ascorbato é prontamente regenerado pela enzima DHAR. O elevado nível de H_2O_2 induz a morte celular fazendo com que esse genótipo apresente suscetibilidade a *S. sclerotiorum* e resistência a *O. neolycopersici*.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Produção de inóculo dos fungos *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici*

O isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* 003 (cedido gentilmente pelo Dr. Ricardo Gioria, fitopatologista da Sakata Seed Sudamerica) foi cultivado em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-agar (BDA), com repicagem a cada dois meses em câmara de cultivo ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 16 h de luz branca fluorescente). Já o fungo *Oidium neolycopersici* foi obtido a partir de plantas de tomates ‘Sweet Grape’ infectadas cultivadas em casas de vegetação pertencentes ao grupo Mallmann, Mogi-Guaçu. Plantas saudáveis de tomateiro ‘Santa Clara’ e de ‘MT’ foram usadas para manutenção do inóculo em estufas e câmaras de cultivo. A espécie dos isolados de oídio utilizados foi identificada por meio do sequenciamento da ITS (Kiss et al., 2001).

Experimentos de patogenicidade de *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici*

Seis mutantes hormonais (*diageotropica*, *Dwarf*, *jai1*, *Never ripe*, *procera* e *sitiens*) e quatro linhas transgênicas (*35S::asCCD7*, *35S::AtCKX2*, *35S::AVP1* e *35S::nahG*) (Tabela S1), todos sob o *background* genético de ‘MT’ foram empregados para avaliação de sintomas da doença, utilizando o ‘MT’ como controle suscetível. As sementes de todos os genótipos foram semeadas em vasos de 250 mL contendo substrato PlantMax HT + vermiculita expandida (1:1) e mantidas em estufa até um dia anterior a inoculação. Plantas com aproximadamente 21 dias de germinação (21 DAG) foram transferidas um dia antes da inoculação para câmara de crescimento, mantida a 23°C, 50% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 h luz e intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* foram mantidas em câmara úmida por 24 h antes e durante todo o experimento, enquanto que plantas inoculadas com *O. neolycopersici* não foram submetidas a câmara úmida. A inoculação de *S. sclerotiorum* foi realizada por meio da deposição do escleródio, germinado previamente em meio BDA, no folíolo terminal da terceira ou quarta folha verdadeira. Já a inoculação com *O. neolycopersici* foi realizada em discos foliares de 6 mm de diâmetro, contendo micélio e conidióforos que foram friccionados sobre o folíolo terminal sadio da terceira ou quarta folha verdadeira. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (quatro blocos com 7 plantas por genótipo, totalizando 28 plantas avaliadas por genótipo).

Para o experimento com tratamento de ABA e fluridone, plantas de ‘MT’, *sitiens* e *sp12* (Tabela S1), todos sob *background* genético de ‘MT’ foram empregadas para avaliação dos sintomas da doença utilizando o ‘MT’ como controle suscetível. As plantas foram germinadas e conduzidas conforme anteriormente. Plantas dos genótipos ‘MT’ e *sp12* foram submetidas a aplicação de 50 mL da solução 2 μM do inibidor da síntese de ABA (fluridone) via radicular, de acordo com Gamble e Mullet (1986), uma semana antes da inoculação, com o objetivo de simular uma planta com baixos níveis de ácido abscísico, como é o caso do *sitiens*. Já nos genótipos ‘MT’ e *sitiens*, a parte aérea foi pulverizada com uma solução 100 μM de ABA, diluído previamente em KOH e com o pH ajustado para 6,0, por quatro vezes antes da inoculação em intervalos de dois dias, com o objetivo de simular uma planta com altos níveis de ácido abscísico, como é o caso do *sp12*. Todos estes tratamentos foram acompanhados dos genótipos sem aplicação exógena de fluridone ou ABA, com aplicação de uma solução de água com o pH ajustado para 6,0 com KOH. A inoculação foi realizada conforme descrito anteriormente. Em plantas tratadas com ABA e inoculadas com *Oidium* sp. solução 100 μM de ABA foi aplicada duas vezes por semana após a inoculação, na face abaxial da folha, com o objetivo de manutenção do nível de ABA durante todo o experimento sem prejudicar o desenvolvimento do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado contendo 10 plantas por tratamento.

Em ambos os experimentos, foi avaliada a área da lesão (cm²) em plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* aos 2 DAI e em plantas inoculadas com *O. neolycopersici* aos 18 DAI, através da análise de fotos digitais das folhas com sintomas pelo software ImageJ (Abramoff et al., 2004). Foi quantificado também o número de novas lesões de *O. neolycopersici* em toda a planta com 18 DAI. Os valores da área e o número de lesões de plantas que apresentaram sintomas foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Duncan), utilizando o pacote estatístico SAS - *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 1996).

Quantificação de ABA

Cerca de 100 mg de massa fresca foi transferida para um tubo de centrífuga e foi adicionado solução de extração isopropanol:ácido acético (95:5). Em seguida, foi adicionado 0,25 µg de [²H₆]-ABAd e vortexado. As amostras foram então mantidas sob agitação no gelo por de 2 h no escuro e posteriormente homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 25.000 g a 4°C. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e levado para secagem em *speed-vac* até restar apenas cerca de 50 µL em cada microtubo. Foi adicionado acetato de etila e água deionizada nas amostras, homogeneizado em vórtex e centrifugado por 5 min a 25.000 g a 4°C. A fase superior foi coletada por três vezes, juntando todas as frações extraídas em um mesmo microtubo. As frações coletadas foram secas completamente utilizando *speed-vac*. Cada amostra foi ressuspensa em 200 µL de metanol, agitada e transferida para cada inserto do vial de CG e secos completamente em *speed-vac*.

As amostras foram ressuspensas em metanol pelo inserto do vial e agitadas intensamente por 20 min. Foi adicionado trimetilsilildiazometano e incubadas por 30 min sob agitação. As amostras foram secas completamente em fluxo de nitrogênio, utilizando o secador de amostras e ressuspensas com metanol. Após a derivatização, todas as amostras foram injetadas no CG-MS (GCMS-QP2010 SE; Shimadzu) em um modo de monitoramento íon seletivo. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 MS (30 m, 0,25 mm diâmetro-0,25 µm film, Agilent) de fase estacionária usando hélio como gás transportador, a um fluxo de 0,83 mL min⁻¹ no seguinte programa: 2 min a 100 °C, seguido de aumento de 10 °C min⁻¹ até 140 °C, 25 °C min⁻¹ a 160 °C, 35 °C min⁻¹ a 250 °C, 20 °C min⁻¹ a 270 °C, e 30 °C min⁻¹ a 300 °C. A temperatura do injetor foi de 250 °C, e os seguintes parâmetros operacionais de espectrometria de massa foram utilizados: tensão de ionização, 70 eV (ionização de impacto de elétrons); temperatura da fonte de íons a 230 °C; e interface de

temperatura, 260 °C. As concentrações endógenas foram calculadas com base em cromatogramas extraídos.

Ensaio histoquímico de GUS, Trypan Blue e DAB

A atividade reporter de GUS foi visualizada em folhas do transgênico *RD29B::GUS* (Tabela S1) não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI e com *O. neolycopersici* em 7 DAI e ainda com aplicação exógena de 100 µM de ABA, como controle positivo. As folhas foram incubadas em tampão contendo 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-gluc) por 12 h at 37 ° C com coleta posterior e clareamento com 96% etanol.

Para visualizar a morte celular em folhas de ‘MT’ e *sitiens* não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI e com *O. neolycopersici* em 7 DAI foram coradas com 0.05% Trypan blue por 1 h a 25 °C e lavadas duas vezes com tampão PBS. As folhas foram clareadas com ácido acético e etanol (3:1, v/v).

Para detecção in situ de H₂O₂, folhas de ‘MT’ e *sitiens* não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI e com *O. neolycopersici* em 7 DAI foram coradas com 3,3-diaminobenzidina (DAB). As folhas foram destacadas e transferidas para uma solução contendo 1 mg. mL⁻¹ DAB-HCl (pH 4,0). Foi realizada uma infiltração a vácuo por 1 h com posterior incubação por 2 h a temperatura ambiente no escuro. As amostras foram então lavadas e clareadas com 96% etanol em ebulição por 5 min.

Expressão diferencial de genes por RT-qPCR e RNA-Seq

Plantas de ‘MT’ e *sitiens* foram germinadas, conduzidas em estufa e câmara de crescimento e inoculadas conforme descrito anteriormente. As plantas de ‘MT’ e *sitiens* inoculadas e controles foram coletadas nos períodos de 0, 6, 9, 12, 24, 48 HAI com *S. sclerotiorum* e 0, 6, 9, 12, 24, 48 e 168 HAI com *O. neolycopersici*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado contendo três replicatas biológicas com cada replicata contendo quatro folhas oriundas de duas plantas. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C, para análise da expressão de genes marcadores hormonais e transcriptoma. O RNA total foi extraído dos folíolos de tomateiros não inoculados ou inoculados utilizando Trizol (Invitrogen). A síntese de cDNA foi conduzida utilizando 1 µg de RNA total tratado com DNase, 1 mM de cada dNTP, 5 µM *primer* poli-T (oligo-dT 18 pb) seguida de incubação à 65 °C

por 5 min e resfriado à 4 °C por 5 min. A transcrição reversa foi conduzida numa reação contendo tampão da enzima 5X RT Buffer (Fermentas), 200 U de RevertAid Premium Reverse (Fermentas) e 20 U de Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas) com volume final da reação 20 µL. A reação de transcrição reversa foi incubada a 50 °C por 30 min, 85 °C por 5 min e armazenados a -20 °C. As amplificações foram conduzidas no termociclador de RotorGene-3000 (Corbett Research, Austrália) com incubações iniciais a 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa RotorGene Real-Time Analysis 6.0 (Corbett Research), o qual forneceu os valores de ciclo de quantificação (C_Q) para análise da expressão gênica do tratamento (inoculado) em relação ao controle, sendo normalizados com dados de dois genes de referência *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e *Ubiquitin* (UBI) (Tabela S2) Os tratamentos ‘MT’ e *sitiens* inoculados foram comparados com o ‘MT’ não inoculado de cada tratamento. Para isso, foi utilizado o programa Relative Expression Software Tool (REST-2009).

Preparo de bibliotecas e sequenciamento do RNA

O RNA total foi extraído dos folíolos de tomateiros controles ou inoculado utilizando Trizol (Invitrogen). Assim, aproximadamente 100 mg de tecido vegetal macerado foi transferido para um tubo de centrífuga de 2 mL, e adicionado 1 mL de Trizol e vortexado. Após a homogeneização, foi feita uma incubação de 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 9.000 g por 15 min a 4°C. Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, sendo adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após 5 min em temperatura ambiente, foi realizada uma nova centrifugação a 9.000 g por 15 min a 4°C. A fase superior foi coletada para um novo microtubo, e foram adicionados 500 µL de isopropanol. Em seguida, foi feita uma incubação de 10 min e centrifugação a 9.000 g por 10 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 75% e centrifugado 9000 g por seis min a 4°C, e posteriormente ressuspensionado em 20 µL de água DEPC e armazenados a -80 °C.

Com base na análise de expressão diferencial de genes relacionados à defesa realizada em todos os períodos descritos no item anterior, foi verificado que nos tempos de 24 HAI com *S. sclerotiorum* e 168 HAI com *O. neolycopersici* houve uma expressão diferencial desses genes, indicando uma possível alteração no transcriptoma nesses períodos. Assim, esses tempos foram utilizados para o sequenciamento do RNA. Vinte e quatro bibliotecas foram sequenciadas com três repetições para cada tratamento, sendo doze bibliotecas do genótipo ‘MT’ e doze do

genótipo *sitiens*. Dentro de cada genótipo, três bibliotecas são correspondentes a plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* as 24 HAI (horas após a inoculação) e três são correspondentes a plantas inoculadas com *O. neolycopersici* após 168 HAI (dias após a inoculação), as outras seis bibliotecas são controles não inoculados de cada tratamento inoculado. Cada patógeno teve seu controle, pois o fungo *S. sclerotiorum* necessita de elevada umidade para se desenvolver, portanto o controle foi feito com plantas em câmara úmida a partir da inoculação. Já o fungo *O. neolycopersici* necessita de ambiente mais seco, portanto o controle foi realizado sem câmara úmida.

As amostras de RNA foram avaliadas quanto a sua qualidade e integridade em RNA Chip no LabChip GX/GXII (Perkin Elmer, Reino Unido) de acordo com o protocolo do kit HT RNA LabChip (Caliper, EUA). Foram construídas bibliotecas de cDNA a partir de 1000 ng de RNA de cada amostra. Foi utilizado o kit KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation da KAPA Biosystems, conforme recomendações do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas em single read de 50 pb em uma *lane da flow cell* no sequenciador HiSeq 4000. Foi gerado aproximadamente 6,5 milhões de *reads* para cada amostra, totalizando 158 milhões de *reads* em 24 amostras.

Análise das sequências do RNA-Seq de ‘MT’ e do mutante *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici*

A qualidade das sequências foi avaliada usando a ferramenta FastQC (Patel; Jain, 2012). Após a análise de qualidade foi feita a remoção de 12 pb à esquerda das sequências das 24 bibliotecas com o programa PRINSEQ (Schmieder; Edwards, 2011). As sequências dos adaptadores foram eliminadas com o CUTADAPT (Martin, 2011).

Os *reads* trimmados foram então mapeados contra os genomas dos fragmentos do ribossomo de tomateiro para retirada dos reads que mapearam nestas sequências (contaminantes não poli-adenilados) com o programa ‘sortmeRNA’ (Kopylova, 2012). Os *reads* filtrados de cada uma das bibliotecas foram mapeados contra o genoma de referência do tomateiro ITAG2.4 (The tomato genome consortium, 2012) utilizando o programa ‘TopHat2’ (Kim et al., 2013). Após a etapa de alinhamento dos reads, o programa ‘featureCounts’ (Liao; Smyth; Shi, 2014) foi utilizado para obtenção dos valores de *read counts*, que representam o número de *reads* que foram mapeados em um gene. *Reads* que apresentaram mais de uma opção de melhor alinhamento não foram considerados nas análises.

Genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando-se um modelo generalizado linear (glm, *generalized linear model*) implementado no pacote edgeR do ambiente estatístico R (<http://www.r-project.org/>). O método de Benjamin & Hochberg foi aplicado para

a correção dos p-values após a execução de múltiplos testes (Benjamini; Hochberg, 1995). Genes apresentando FDR (*False Discovery Rate*) inferior a 0,05 (5%) e *fold-change* igual a superior a 2 foram considerados diferencialmente expressos.

Através do pacote goseq (Young et al., 2010) foram realizadas análises de enriquecimento funcional para os transcritos diferencialmente expressos, com correção para viés de tamanho utilizando um arquivo contendo o identificador do gene e os termos GO associados a cada um deles, além da descrição da função de cada transcrito. Foram considerados os termos sobre-representados com valor-p ajustado para FDR igual ou inferior a 10 %.

Conteúdos de H₂O₂, ascorbato e glutathiona

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi medido com AmpliFlu red (Sigma), com base na medida colorimétrica da formação de resorufina na presença de H₂O₂ (Zhou et al., 1997). Amostras de folhas frescas foram maceradas com N₂ líquido na presença de 100 mM tampão fosfato de potássio pH 7,5 e centrifugado a 12.000 x g (4 °C) durante 30 min. O sobrenadante foi imediatamente utilizado para determinação de H₂O₂. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. O teor de peróxido de hidrogênio foi calculado a partir de uma curva padrão, e os resultados foram expressos em nmol H₂O₂ g⁻¹ matéria fresca (MF).

Os conteúdos de ascorbato reduzido (ASA) e o total (ASA e DHA) foram realizados de acordo com Kampfenkel et al. (1995). Cerca de 100 mg de amostras de folhas frescas maceradas em N₂ líquido na presença de 5% (m/v) TCA e centrifugados a 12,000 g (4 °C). O sobrenadante foi usado imediatamente para determinação de ASC e GSH. O ensaio para ascorbato reduzido é baseado na redução do Fe³⁺ a Fe²⁺ por ASA, e o ascorbato total foi mensurado após a completa redução com 10 mM DTT e 0,5% (m/v) N-ethylmaleimide. O complexo Fe²⁺-2,2 bipyridil foi lido a 525 nm, e o conteúdo de ascorbato oxidado (DHA) foi obtido pela subtração da fração reduzida do conteúdo total.

O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi mensurado como descrito por Griffith (1980). O conteúdo total de glutathiona (GSH + GSSG) foi mensurado na presença de 1 unidade de glutathiona redutase, 0,15 mM NADPH, 6 mM DTNB e 100 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,0). A absorbância foi lida a 412 nm. O conteúdo de glutathiona oxidada (GSSG) foi calculado pela subtração da fração reduzida do conteúdo de glutathiona total.

REFERÊNCIAS

- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7): 36-42.
- Achuo EA, Audenaert K, Meziane H, Höfte M (2004) The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology*, 53(1): 65-72.
- Asselbergh B, Curvers K, França SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F, Höfte M (2007) 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*, 144(4): 1863-1877.
- Asselbergh BOB, Achuo AE, Höfte M, Van Gijsegem F (2008) Absciscic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant Pathology*, 9(1): 11-24.
- Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez M M, Godoy M, Sanchez Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* 19:1665-1681.
- Al-Masri MI, Ali-Shtayeh MS, Elad Y, Sharon A, Tudzynski P, Barakat R (2002) Effect of plant growth regulators on white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) on bean and cucumber. *Journal of Phytopathology*, 150(8-9): 481-487.
- Al-Masri MI, Elad Y, Sharon A, Barakat R (2006) Ethylene production by *Sclerotinia sclerotiorum* and influence of exogenously applied hormone and its inhibitor aminoethoxyvinylglycine on white mold. *Crop Protection*, 25(4): 356-361.
- Amselem J, Cuomo CA, Van Kan JA, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S, Fournier E, Gout L, Hahn M, Kohn L, Lapalu N, Plummer KM, Pradier JM, Quévillon E, Sharon A, Simon A, ten Have A, Tudzynski B, Tudzynski P, Wincker P, Andrew M, Anthouard V, Beever RE, Beffa R, Benoit I, Bouzid O, Brault B, Chen Z, Choquer M, Collémare J, Cotton P, Danchin EG, Da Silva C, Gautier A, Giraud C, Giraud T, Gonzalez C, Grossetete S, Güldener U, Henrissat B, Howlett BJ, Kodira C, Kretschmer M, Lappartient A, Leroch M, Levis C, Mauceli E, Neuvéglise C, Oeser B, Pearson M, Poulain J, Poussereau N, Quesneville H, Rascle C, Schumacher J, Ségurens B, Sexton A, Silva E, Sirven C, Soanes DM, Talbot NJ, Templeton M, Yandava C, Yarden O, Zeng Q, Rollins JA, Lebrun MH, Dickman M (2011) Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 7(8): e1002230.
- Asselbergh B, Curvers K, França SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F, Höfte M (2007) 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*, 144(4): 1863-1877.
- Asselbergh B, Höfte M (2007) Basal tomato defences to *Botrytis cinerea* include abscisic acid-dependent callose formation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3): 33-40.
- Ball L, Accotto G-P, Bechtold U, Creissen G, Funck D, Jimenez A, Kular B, Leyland N, Mejia-Carranza J, Reynolds H, et al (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 2448–2462.
- Baroli I, Niyogi KK (2000) Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402): 1385-1394.

- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289–300.
- Bihmidine S, Lin J, Stone JM, Awada T, Specht JE, Clemente TE (2013) Activity of the *Arabidopsis* RD29A and RD29B promoter elements in soybean under water stress. *Planta* 237: 55–64.
- Boland GJ, Hall R (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 93–100.
- Bratt CE, Arvidsson PO, Carlsson M, Åkerlund HE (1995) Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynthesis Research*, 45: 169–175.
- Cutler AJ, Krochko JE (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4(12): 472–478.
- Fernandez-Pozo N, Menda N, Edwards J D, Saha S, Tecle IY, Strickler SR, Bombarely A, Fisher-York T, Pujar A, Foerster H, Yan A, Mueller LA (2015) The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, 43(D1): D1036–D1041.
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002) Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14(suppl 1): S15–S45.
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1): 2–18.
- Gamble PE, Mullet, JE (1986) Inhibition of carotenoid accumulation and abscisic acid biosynthesis in fluridone-treated dark-grown barley. *European Journal of Biochemistry* 160(1): 117–121.
- Geraats BP, Bakker PA, Lawrence CB, Achuo EA, Höfte M, Van Loon LC (2003) Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. *Phytopathology* 93: 813–821.
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28(11): 1091–1101.
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 43: 205–227.
- Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207–212
- Guo X, Stotz HU (2007) Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1384–1395.
- Guo X, Stotz HU (2010) ABA signaling inhibits oxalate-induced production of reactive oxygen species and protects against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology*, 128(1): 7–19.
- Hager A, Holocher K (1994) Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* 192: 581–589.
- Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H (2000) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(7–8): 531–540.
- Jia HF, Chai YM, Li CL, Lu D, Luo JJ, Qin L, Shen YY (2011) Absciscic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant physiology*, 157(1): 188–199.
- Kaliff M, Staal J, Myrenas M, Dixelius C (2007) ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20:335–345.
- Kampfenkel K, Van Montagu M (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry* 225: 165–167

- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4): R36.
- Kiss, L.; Cook, R. T.; Saenz, G. S.; Cunnington, J. H.; Takamatsu, S.; Pascoe, I.; Rossman, A. Y. (2001) Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycological Research*, 105(6): 684-697.
- Kopylova E, Noé L, Touzet H (2012) SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24): 3211-3217.
- Kovacs I, Durner J, Lindermayr C (2015) Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 208: 860–872.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2013) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7): 923-930.
- Liotenberg S, North H, Marion-Poll A (1999) Molecular biology of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37: 341–350.
- Liu YS, Gur A, Ronen G, Causse M., Damidaux R, Buret M, Hirschberg J, Zamir D (2003) There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnology Journal*, 1(3): 195-207.
- López-Carbonell M, Munné-Bosch S, Alegre L (2006) The ascorbate-deficient *vtc-1* *Arabidopsis* mutant shows altered ABA accumulation in leaves and chloroplasts. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(2): 137-144.
- Marciano P, Di Lenna P, Magro P (1983) Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology*, 22(3): 339-345.
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 17(1):10.
- Mauch-Mani, B.; Mauch, F. (2005) The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4): 409-414.
- May MJ, Leaver CJ (1993) Oxidative Stimulation of Glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology* 103: 621–627
- May MJ, Vernoux T, Sánchez-Fernández R, Montagu MV, Inzé D (1998) Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 12049–12054
- Mieslerová, B, Lebeda A, Chetelat, RT (2000) Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* spp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *Journal of Phytopathology* 148:303–311.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9): 405-410.
- Mohr PG, Cahill DM (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Functional & integrative genomics*, 7(3): 181-191.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (58): 459-481.
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4): 1558-1566.
- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Transcriptional Regulation of ABI3- and ABA-responsive Genes Including *RD29B* and *RD29A* in Seeds, Germinating Embryos, and Seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 60: 51–68.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 165-185.

- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmulling T, Tran LSP (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(6): 2169-2183.
- Nováková M, Šásek V, Dobrev PI, Valentová O, Burketová L (2014) Plant hormones in defense response of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum*—Reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. *Plant Physiology and Biochemistry* 80:308-317.
- Patel RK, Jain M (2012) NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PloS One*, 7(2) e30619.
- Penn CD, Daniel SL (2013) Salicylate degradation by the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current microbiology* 67: 218-225.
- Percepied L, Balagué C, Riou C, Claudel-Renard C, Rivière N, Grezes-Besset B, Roby D (2010) Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7): 846-860.
- Percepied L, Balagué C, Riou C, Claudel-Renard C, Rivière N, Grezes-Besset B, Roby D (2010) Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7): 846-860.
- Queval G, Thominet D, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakière B, Noctor G (2009) H₂O₂-Activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant* 2: 344–356
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 317-343.
- Rock CD, Zeevaart JA (1991) The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17): 7496-7499.
- Roldán-Arjona T, Ariza RR (2009) Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(2): 169-179.
- Sánchez-Fernández R, Ardiles-Díaz W, Montagu MV, Inzé D, May MJ (1998) Cloning and expression analyses of *AtMRP4*, a novel MRP-like gene from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG*, 258: 655–662.
- SAS INSTITUTE. SAS user's guide: statistics. 4th ed. Cary, 1996.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant physiology*, 131(4): 1591-1601.
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864.
- Sérino S, Gomez L, Costagliola G, Gautier H (2009) HPLC assay of tomato carotenoids: validation of a rapid microextraction technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 8753–8760
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 35(4): 291-314.
- Smith IK, Kendall AC, Keys AJ, Turner JC, Lea PJ (1984) Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science Letters* 37: 29–33.
- Stotz HU, Jikumaru Y, Shimada Y, Sasaki E, Stingl N, Mueller MJ, Kamiya Y (2011) Jasmonate-dependent and COI1-independent defense responses against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*: auxin is part of COI1-independent defense signaling. *Plant and Cell Physiology* 52:1941-1956.

- Sun L, Sun Y, Zhang M, Wang L, Ren J, Cui M, Wang Y, Ji K, Li P, Li Q, et al (2012) Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato. *Plant Physiology* 158: 283–298.
- Sung DY, Kim TH, Komives EA, Mendoza-Cózatl DG, Schroeder JI (2009) ARS5 is a component of the 26S proteasome complex, and negatively regulates thiol biosynthesis and arsenic tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59(5): 802-813.
- Taylor IB, Burbidge A, Thompson AJ (2000) Control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 51(350): 1563-1574.
- Thaler JS, Owen B, Higgins VJ (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135: 530-538.
- Thompson AJ, Andrews J, Mulholland BJ, McKee JM, Hilton HW, Horridge JS, Farquar GD, Smeeton RC, Smillie IRA, Black CL, Taylor IB (2007) Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiology*, 143(4): 1905-1917.
- Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, Lebeda A (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(1-3): 22-32.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(6): 310-317.
- Torres-Vera R, García JM, Pozo MJ, López-Ráez JA (2014) Do strigolactones contribute to plant defence? *Molecular Plant Pathology*, 15(2): 211-216.
- Tuteja N (2007) Absciscic acid and abiotic stress signaling. *Plant signaling & behavior*, 2(3): 135-138.
- Vanacker H, Carver TL, Foyer CH (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology*, 123(4): 1289-1300.
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Wang Z, Tan X, Zhang Z, Gu S, Li G, Shi H (2012) Defense to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape is associated with the sequential activations of salicylic acid signaling and jasmonic acid signaling. *Plant Science* 184:75-82.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Montagu MV, Inzé D, Camp WV (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO Journal* 16: 4806–4816
- Xiang C, Oliver DJ (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1539–1550
- Xiang C, Bertrand, D (2000) Glutathione synthesis in *Arabidopsis*: multilevel controls coordinate responses to stress. *Sulfur Nutrition and Sulphur Assimilation in Higher Plants*, 409-412.
- Yamamoto HY, Higashi RM (1978) Violaxanthin de-epoxidase: Lipid composition and substrate specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 190: 514–522.
- Yen CH, Yang CH (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant and cell physiology*.
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11(2): R14.
- Zhou J, Zeng L, Liu J, Xing D (2015) Manipulation of the xanthophyll cycle increases plant susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens*, 11(5): e1004878.
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry* 253: 162–168

- Zhou JM, Trifa Y, Silva H, Pontier D, Lam E, Shah J, Klessig DF (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2): 191-202.
- Zhu W, Wei W, Fu Y, Cheng J, Xie J, Li G, Yi X, Kang Z, Dickman MB, Jiang D (2013) A secretory protein of necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* that suppresses host resistance. *PLoS One*, 8(1): e539

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 – Mutantes hormonais e linhas transgênicas introgrididos na cv. ‘Micro-Tom’ inoculados com *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici*

Mutantes	Classe*	Descrição
<i>Diageotropica</i>	AUX	Baixa sensibilidade. Defectivo para uma proteína ciclofilina (Oh et al., 2006).
<i>Dwarf</i>	BR	Elevados níveis de brassinostéóides. Tipo selvagem de alelo D do gene da oxidase do alelo funcional da C-6 brassinosteróide oxidase, permitindo que a biossíntese de brassinosteróides seja concluída (Motoya et al. 2005).
<i>jai1</i>	JÁ	Insensibilidade ao JA. Alelo defectivo do receptor de JA (JAI1) (Li et al, 2004)
<i>Never ripe</i>	ET	Baixa sensibilidade. Defectivo para um receptor de etileno (Wilkinson et al., 1995).
<i>Procera</i>	GA	Supersensível a GA. Mutação para perda de função do domínio de repressão das proteínas DELLA (Bessel et al., 2008).
<i>Sitiens</i>	ABA	Mutação na enzima ABA-aldeído oxidase. Mutantes deficientes em ABA (Harrison et al., 2011).
<i>sp12</i>	ABA	Superexpressão do gene que codifica a enzima de biossíntese de ABA 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (Thompson et al., 2007).
Transgênicos		
<i>35S::asCCD7</i>	SL	Superexpressão do “antisense” para dioxigenases de carotenóides do tipo CCD7/MAX3. Transgênico com reduzidos níveis de estrigolactonas (Koltai et al., 2010).
<i>35S::AtCKX2</i>	CK	Baixos níveis de CK. Superexpressão do gene <i>AtCKX2</i> (Pino et al., 2010).
<i>35S::AVP1</i>	AUX	Superexpressão de uma pirofosfatase H ⁺ vacuolar que aumenta o transporte de auxina (Li et al., 2005).
<i>35S::nahG</i>	SA	Baixos níveis de AS. Expressão do gene <i>nahG</i> que catalisa conversão de AS para catecol (Brading et al., 2000).
<i>RD29B::GUS</i>	ABA	Transgênico contendo um promotor responsivo ao ABA fusionado a um gene repórter β-glucuronidase (Nakashima et al., 2006; Bihmidine et al., 2013)

Tabela S2 – Genes de referência e genes marcadores relacionados à síntese e degradação de ácido abscísico, sequência dos iniciadores e o número de acesso de tomateiro.

Gene	Iniciadores (5' - 3')	Número de acesso
<i>Glyceraldehyde dehydrogenase (GAPDH)</i>	3-phosphate TCCATCACAGCCACTGAGAA TCAACCACGGACACATCAAC GGACGGACGTACTCTAGCTGAT	TC1217630
<i>Ubiquitin (UBI)</i>	AGCTTTTCGACCTCAAGGGTA	TC232697
<i>9-cis-epoxycarotenoid 1(NCED1)</i>	dioxygenase CTTATTTGGCTATCGCTGAACC CCTCCAACCTTCAAACCTATTGC ATGGCTCTTTTGATTTGCATATC	Solyc07g056570
<i>ABA 8'-hydroxylase (CYP707a1)</i>	TTTGGGAGGTGGGGTTTG	Solyc04g078900

Figura S1. Níveis de ácido salicílico em folhas de 'MT' (barras pretas) e *sitiens* (barras cinzas) não inoculadas e inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 e 48 HAI e com *Oidium* sp. em 168 HAI. As médias são resultantes de três replicatas biológicas. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro do genótipo e minúsculas entre genótipos pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Figura S2. Expressão relativa de genes responsivos ao ácido salicílico NPR1 (A) e (B), e PR1a (C) e (D) em folhas de 'MT' (A) e (C) e *sitiens* (B) e (D) inoculados com *S. sclerotiorum* (barras pretas) e *O. neolycopersici* (barras cinzas), em relação ao controle 'MT' não inoculado de cada período. A expressão gênica relativa foi calculada no programa REST utilizando os valores do C_q determinado por RT-qPCR e normalizados pelos genes de referência *GAPDH* e *ubiquitin*. O * indica significância estatística a $p < 0,05$ de acordo com o REST. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento.

Figura S3. *Heatmap* de genes de peroxidases onde em azul e laranja representam valores de log₂ fold change positivos e negativos, em relação ao controle 'MT' não inoculado, respectivamente. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento.

Figura S4. *Heatmap* de genes relacionados ao fotossistema onde em azul e laranja representam valores de log₂ fold change positivos e negativos, em relação ao controle 'MT' não inoculado, respectivamente. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento.

4. ANÁLISE TRANSCRICIONAL E PROTEÔMICA REVELA UM NOVO PAPEL DO ÁCIDO ABCÍSIKO NA DEFESA CONTRA PATÓGENOS DE ESTILO DE VIDA CONTRASTANTES

Jamille Santos Da Silva^{1,2}; Juliana Leles Costa¹; Vinicius Augusto Carvalho De Abreu¹; Fernando Henrique Correr²; Adriana Franco Paes Leme³; Paulo José Pereira Lima Teixeira⁴; Piotr Mieczkowski⁴; Gabriel Rodrigues Alves Margarido²; Antonio Figueira¹

¹ Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP 13400-970, Brasil

² Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brasil

³ Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP13083-970

⁴ *Genome Sciences Building*, Chapel Hill, North Carolina 27514

Resumo

A resistência de plantas a patógenos representa um caráter agronomicamente relevante, visto que muitas perdas ocorrem devido às doenças no campo. Este caráter geralmente é modulado por hormônios vegetais, dentre os quais o ácido abscísico (ABA) pode desempenhar diferentes papéis na resistência. Assim, foi observado previamente que o mutante de tomateiro *sitiens* (reduzido nível de ABA) apresenta resposta diferencial a patógenos de estilo de contrastantes, apresentando suscetibilidade a *Sclerotinia sclerotiorum* e resistência parcial a *Oidium neolycopersici*, quando comparado com a cultivar 'Micro-Tom' (MT) selvagem. Assim, análises massal de transcritos por RNA-Seq e proteômica foram realizadas para tentar decifrar mecanismos moleculares e proteínas regulados por ABA na resistência ou suscetibilidade a patógenos de estilos de vida contrastantes. A análise de expressão gênica massal identificou 8331 e 5564 genes diferencialmente expressos em 'MT' e *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum*, respectivamente, enquanto que 911 e 2103 genes foram diferencialmente expressos em 'MT' e *sitiens* inoculados com *O. neolycopersici*, respectivamente. A análise de enriquecimento funcional da Ontologia de Genes revelou grupos de genes relacionados a autofagia induzidos em 'MT' inoculado com *S. sclerotiorum*, o que não foi observado no mutante *sitiens*. A análise de proteômica da interação entre 'MT' e *S. sclerotiorum* revelou a indução de proteínas associadas a síntese de etileno e relacionadas a patogênese em 'MT'. Já na interação com *O. neolycopersici*, *sitiens* apresentou uma maior indução de genes de resistência do tipo NBS-LRR, quando comparado a 'MT' e a proteômica revelou uma indução de uma endoquitinase que poderia estar envolvida na resistência de *sitiens* a *O. neolycopersici*.

Palavras-chave: Necrotrófico; Biotrófico; Hormônios; Autofagia

Abstract

The resistance of plants to pathogens represents an agronomically relevant trait, since diseases are a major cause of productivity losses in the field. This trait is usually modulated by plant hormones, among which abscisic acid (ABA) may play different roles in resistance. Thus, it was observed previously that the tomato mutant *sitiens* (reduced level of ABA) presented differential response to pathogens of contrasting lifestyle, presenting susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum* and partial resistance to *Oidium neolycopersici*, when compared to 'Micro-Tom' cultivar (MT). Thus, mass analysis by RNA-Seq transcripts and proteomics were performed to try to

decipher molecular mechanisms and ABA-regulated proteins in resistance or susceptibility to pathogens of contrasting lifestyles. Mass gene expression analysis identified 8331 and 5564 genes differentially expressed in 'MT' and *sitiens* inoculated with *S. sclerotiorum*, respectively, whereas 911 and 2103 genes were differentially expressed in 'MT' and *sitiens* inoculated with *O. neolycopersici*, respectively. The Gene Ontology functional enrichment analysis revealed groups of genes related to autophagy induced in 'MT' inoculated with *S. sclerotiorum*, which were not observed in the mutant *sitiens*. Proteomic analysis of the interaction between 'MT' and *S. sclerotiorum* revealed the induction of proteins associated with ethylene synthesis and related to pathogenesis in 'MT'. Whereas in the interaction with *O. neolycopersici*, *sitiens* presented a greater induction of NBS-LRR resistance genes when compared to 'MT' and the proteomic analysis revealed an induction of an endochitinase that could be involved in the resistance of *sitiens* to *O. neolycopersici*.

Keywords: Necrotrophic; Biotrophic; Hormones; Autophagy

4.1. Introdução

As relações entre plantas e microorganismos está relacionada, principalmente, ao modo de obtenção de nutrientes pelos microrganismos. Os microrganismos podem ser classificados de acordo com seus mecanismos de infecção e de aquisição de nutrientes. Os patógenos, por exemplo, são microrganismos que exercem uma interação prejudicial aos seus hospedeiros. Os fitopatógenos podem ainda ser classificados em biotróficos, necrotróficos ou hemibiotróficos de acordo com seus estilos de vida. Os biotróficos se alimentam de tecidos vivos, enquanto os necrotróficos se alimentam de células mortas. Já os hemibiotróficos apresentam uma fase inicial biotrófica e uma fase posterior necrotrófica (Glazebrook, 2005; Spanu; Panstruga, 2017).

A distinção entre as interações biotróficas e necrotróficas também pode ser evidente através da diferenciação de mecanismos e vias de sinalização distintas que as plantas usam na resposta a defesa de patógenos. Assim, respostas mediadas pelo hormônio ácido salicílico (SA) são consideradas típicas de reações ao ataque biotrófico, enquanto que as respostas mediadas pelos hormônios ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) estão associadas à patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005). Porém, outros hormônios como o ácido abscísico (ABA) podem atuar na resposta de defesa a patógenos.

O ABA é um importante hormônio vegetal que desempenha papéis de sinalização em diversos processos de crescimento e desenvolvimento de plantas, bem como nas respostas das plantas a vários estresses abióticos (Yamaguchi-Shinozaki; Shinozaki, 2006). Recentemente, o ABA também emergido como uma molécula de sinalização chave nas interações planta-patógeno (Asselbergh et al., 2008; Mauch-Mani; Mauch, 2005).

A aplicação exógena ou o acúmulo de ABA devido a mutações genéticas foi mostrado aumentar a suscetibilidade de várias espécies de plantas a patógenos bacterianos e fúngicos, incluindo uma maior resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Achuo et al., 2006; Fan et al., 2009; Koga

et al., 2004; Mohr; Cahill, 2003; Al-Masri et al., 2002; Nováková et al., 2014; Perchepped et al., 2010). Por outro lado, mutações que levam a deficiência de ABA resultaram em um aumento na resistência a *Botrytis cinerea* e *Oidium neolyopersici* em tomateiro (Achuo et al. 2006; Asselbergh et al. 2007, Audenaert et al. 2002) e a *Pseudomonas syringae* e *Peronospora parasitica* em arabidopsis (de Torres-Zabala et al., 2009; Mohr; Cahill, 2003).

A morte celular programada (PCD) é caracterizada por uma cascata de eventos rigidamente controlados, que culminam na morte orquestrada da célula. Em plantas, a autofagia e a resposta de hipersensibilidade (HR) são reconhecidas como dois meios principais pelos quais ocorre a PCD em resposta a patógenos. A HR é caracterizada pela resposta rápida e localizada, geralmente acompanhada de uma explosão oxidativa, aumento nos níveis de SA e deposição de calose (Thordal-Christensen et al., 1997; Dangl; Jones, 2001). A sinalização indutora de HR é iniciada nas células onde gene(s) R reconhece(m) o efector do patógeno, levando a resistência a patógenos biotróficos pela teoria gene-a-gene. A sinalização é induzida pelas proteínas R e muitos sinais podem difundir-se passivamente através do apoplasto e espaço extracelular ou através de plasmodesmos intracelulares, alcançando células vizinhas não infectadas, induzindo a HR.

Já a autofagia é um processo evolutivamente conservado pelo qual constituintes do citoplasma, incluindo proteínas e organelas, são entregues para lisossomos ou vacúolos para degradação (Boya; Reggiori; Codogn, 2013). Ao induzir a autofagia, a célula tenta sequestrar sinais que induzem a morte celular. Um possível papel da autofagia é remover sinais indutores de PCD, que podem difundir-se através do apoplasto e espaço extracelular, retardando a morte celular. Em plantas superiores, mutantes defectivos na autofagia resultam em senescência precoce e excessiva PCD relacionada à imunidade, independentemente das condições nutricionais (Yoshimoto et al., 2009).

Durante as interações planta-patógenos, os tipos de morte celular podem mediar tantos eventos que levam à suscetibilidade, quanto à resistência do hospedeiro. A morte celular por resposta de hipersensibilidade geralmente resulta na resistência a patógenos biotróficos, restringindo o patógeno biotrófico dentro da célula morta, e na suscetibilidade a patógenos necrotróficos, facilitando o seu desenvolvimento nas células vizinhas.

Aqui foi demonstrado, por meio da análise do perfil transcricional e proteômico de folhas inoculadas de tomateiro selvagem 'MT' e do mutante *sitiens* com baixos níveis de ABA inoculados com *S. sclerotiorum* e *O. neolyopersici*, que o ABA induz a autofagia, provavelmente retardando a morte celular rápida, resultando na resistência a *S. sclerotiorum*. Já a ausência de ABA, no mutante *sitiens*, resultou em uma maior indução de genes de resistência do tipo NBS-LRR, que leva a resposta de hipersensibilidade a *O. neolyopersici*.

4.2. Resultados

Análise da quantidade, qualidade e mapeamento de *reads* derivadas de análise de RNA-seq no genoma do tomateiro

Vinte e quatro bibliotecas de RNA foram sequenciadas, sendo doze bibliotecas do genótipo ‘MT’ e doze do mutante *sitiens*. Dentro de cada genótipo, três bibliotecas são correspondentes a plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* após 24 horas após a inoculação (HAI) e três são correspondentes a plantas inoculadas com *O. neolycopersici* a 168 HAI, as outras seis bibliotecas são controles não inoculados de cada tratamento inoculado.

O sequenciamento resultou num total de 158 milhões de *reads* de 50 pb, com uma média de 6,5 milhões de *reads* por biblioteca (Tabela 1). No geral, o número de *reads* obtido por biblioteca foi homogênea entre tratamentos, com exceção de 3 bibliotecas controles não inoculados de oídio (CTO), dos dois genótipos, MT CTO 2, Sit CTO 1 e Sit CTO2, que apresentam um número reduzido de *reads* (Tabela 1). Foi necessária a remoção de 12 pb à esquerda das *reads* de todas as bibliotecas devido a baixa qualidade do sequenciamento nos 12 primeiros nucleotídeos. Portanto, o número de *reads* foi o mesmo após a análise da qualidade pelo FASTQC, trimagem e retirada de adaptadores (Tabela 1).

Em seguida, as *reads* foram mapeadas as sequências de RNA ribossomal 5S, 18S e 25S de tomateiro com o objetivo de filtrar somente o mRNA. Cerca de 1,23 % das sequências foram alinhadas a sequências a rRNA e em seguida descartadas. O mapeamento foi realizado usando-se como referência a montagem do genoma de tomateiro ITAG2.5 (ftp://ftp.solgenomics.net/tomato_genome/assembly/build_2.50/). Cerca de 85 % das *reads* foram mapeadas no genoma de tomateiro, sendo que as bibliotecas inoculadas tiveram menor porcentagem de alinhamento (83,2%) quando comparado a *reads* de bibliotecas de plantas não inoculadas (86,8%), provavelmente devido à presença de sequências do fungo (Tabela 1). No mapeamento também foi encontrado cerca de 5 % das *reads* alinhadas em múltiplas sequências e 10 % das *reads* não foram mapeadas no genoma (Tabela 1).

Tabela 1- Total de *reads* sequenciadas e mapeadas nas sequências de rRNA e no genoma de tomateiro ITAG 2.5 das bibliotecas de folhas de Micro-Tom (MT) e do mutante *sitiens* (Sit) inoculadas ou não com *S. sclerotiorum* ou *O. neolyopersici*.

Amostras	Número total de leituras	Remoção de extremidades e adaptadores*	Mapeado sortmeRNA	Remoção de leituras alinhadas aos rRNA 5, 18 e 25S	Mapeado no tomateiro (Tophat2) (% de reads)	Múltiplos alinhamentos (Tophat2) (% de reads)
MT CTS	7.058.677	7.058.677	168.850	6.889.827	5.977.484(86,8)	322.966 (5,4)
MT CTS	6.503.347	6.503.347	187.056	6.316.291	5.474.019(86,7)	329.530 (6,0)
MT CTS	7.323.075	7.323.075	291.496	7.031.579	6.126.819(87,1)	382.231 (6,2)
MT SCL	6.585.952	6.585.952	40.034	6.545.918	5.513.377(84,2)	331.844 (6,0)
MT SCL	7.442.751	7.442.751	205.494	7.237.257	6.071.292(83,9)	398.030 (6,6)
MT SCL	6.633.185	6.633.185	48.414	6.584.771	5.421.491(82,3)	327.017 (6,0)
MT CTO	6.315.875	6.315.875	22.148	6.293.727	5.423.401(86,2)	200.418 (3,7)
MT CTO	4.900.124	4.900.124	48.895	4.851.229	4.251.543(87,6)	213.439 (5,0)
MT CTO	7.020.380	7.020.380	91.684	6.928.696	6.023.763(86,9)	361.905 (6,0)
MT OID	6.980.638	6.980.638	80.389	6.900.249	5.678.802(82,3)	264.645 (4,7)
MT OID	6.671.682	6.671.682	124.730	6.546.952	5.646.283(86,2)	296.419 (5,2)
MT OID	6.819.945	6.819.945	56.573	6.763.372	5.349.858(79,1)	273.903 (5,1)
Sit CTS	6.637.837	6.637.837	41.195	6.596.642	5.670.214(86,0)	249.080 (4,4)
Sit CTS	6.369.682	6.369.682	30.301	6.339.381	5.494.637(86,7)	228.066 (4,2)
Sit CTS	6.641.199	6.641.199	25.185	6.616.014	5.720.651(86,5)	251.696 (4,4)
Sit SCL	6.661.814	6.661.814	30.471	6.631.342	5.564.854(83,9)	275.504 (5,0)
Sit SCL	7.053.713	7.053.713	33.890	7.019.823	5.798.023(82,6)	343.505 (5,9)
Sit SCL	6.893.616	6.893.616	66.868	6.826.748	5.556.737(81,4)	350.836 (6,3)
Sit CTO	5.709.985	5.709.985	128.777	5.581.208	4.841.964(86,8)	234.632 (4,8)
Sit CTO	5.524.341	5.524.341	24.018	5.500.323	4.774.437(86,8)	219.596 (4,6)
Sit CTO	6.753.659	6.753.659	42.492	6.711.167	5.844.699(87,1)	320.687 (5,5)
Sit OID	6.557.586	6.557.586	38.620	6.518.966	5.488.320(84,2)	211.638 (3,9)
Sit OID	6.663.034	6.663.034	81.251	6.581.783	5.592.265(85,0)	249.795 (4,5)
Sit OID	6.331.517	6.331.517	34.393	6.297.124	5.219.163(82,9)	251.706 (4,8)
Total	158.053.614	158.053.614	1.943.224	156.110.389	132.524.096 (85)	6.889.088 (5)

*Retirada de 12 pb nas *reads*; CTS- controle não inoculado com presença de câmara úmida, CTO- controle não inoculado na ausência de câmara úmida, SCL-inoculado com *S.sclerotiorum* e OID-inoculado com *O. neolyopersici*

Análise comparativa do transcriptoma de folhas não inoculadas do mutante *sitiens* com ‘MT’

Apesar do mutante *sitiens* possuir somente uma mutação que afeta a enzima que converte ABA-aldeído a ABA (Taylor et al., 1988), a redução dos níveis de ABA na planta pode modificar a expressão e regulação de inúmeros genes em diversas condições, visto que este hormônio é essencial na regulação de inúmeros processos fisiológicos (Mauch-Mani; Mauch, 2005; Smet et al., 2006; Tuteja, 2007).

Assim, os controles não inoculados foram mantidos sob duas condições distintas de acordo com o patógeno a ser inoculado. Plantas controles não inoculadas com *S. sclerotiorum* foram mantidas em elevada umidade pela cobertura com um copo plástico transparente. Já as plantas controles não inoculadas com *O. neolycopersici* foram mantidas em baixa umidade devido à ausência de cobertura com copo transparente. Dessa forma, os dois controles derivam de condições distintas, além de representarem períodos diferentes após as respectivas inoculações (24 e 168 HAI).

Quando comparado o perfil transcricional do mutante *sitiens* com o ‘MT’ sob condições de elevada umidade (24 HAI), foram encontrados 49 genes diferencialmente expressos. Esse número de genes é considerado pequeno quando comparamos aos cerca de 35 mil genes codificadores de proteínas encontrados em tomateiro (Tomato Genome Consortium, 2012). Desses 49 genes diferencialmente expressos, 18 genes codificam apoproteínas A do fotossistema I, sete codificam apoproteínas CP43 e CP47 do fotossistema II, dois codificam proteínas D2 do fotossistema II e um codifica uma proteína H do centro de reação do fotossistema II. Todos esses genes associados aos fotossistemas se encontram reprimidos em *sitiens*, e codificam proteínas essenciais para a atividade catalítica desses fotossistemas. É possível que um desbalanço na transferência de elétrons entre os dois fotossistemas pode causar um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) neste mutante. Mutações em genes da síntese de precursores de ABA em arroz provocaram fotoinibição no fotossistema, devido a redução das proteínas núcleos CP43, CP47 e D1 do fotossistema II, juntamente com o acúmulo de EROs nestes mutantes (Fang et al., 2008).

Poucos genes foram induzidos em *sitiens* não inoculado quando comparados com os genes reprimidos em relação ao ‘MT’ sob alta umidade (24 HAI). Dos 49 genes diferencialmente expressos, oito genes foram induzidos em *sitiens*. Desses oito genes, três foram genes de resistência (genes R) a patógenos com domínios NBS-LRR. Estas proteínas estão envolvidas na detecção de diversos patógenos (Mchale et al., 2006). Geralmente, essas proteínas R podem

reconhecer efetores secretados por patógenos ou monitorar mudanças no *status* da célula vegetal. A partir do reconhecimento de um efector ou uma mudança no *status* da célula, estas proteínas atuam posteriormente em redes de vias de sinalização e induzem uma série de respostas de defesa da planta, como a ativação da explosão oxidativa, fluxos de íons e de cálcio, cascata de proteínas quinases associadas a mitógenos (MAPK), indução de genes relacionados a patogênese e a resposta de hipersensibilidade (Mchale et al., 2006).

Outro gene induzido em *sitiens* é o *BCL-2 BINDING ANTHANOGENE-1 (BAG-1)*. Este gene foi mostrado aumentar a atividade antiapoptótica de Bcl-2, sugerindo envolvimento em vias apoptóticas, aumentando a proteção da célula da morte celular programada (Takayama et al., 1995).

Outra análise realizada foi a de enriquecimento funcional de grupos de genes no pacote goseq (Young et al., 2010). A análise de enriquecimento encontra quais termos GO, de acordo com sua função, estão sobre-representados (ou sub-representados) dentro dos genes diferencialmente expressos usando anotações para esse conjunto de genes (ftp://ftp.solgenomics.net/tomato_genome/annotation/ITAG2.4_release/ITAG2.4.go.csv).

A análise de enriquecimento de genes mostrou um aumento de termos referentes a genes de componentes integrais de membrana, sendo estes associados a proteínas reprimidas do fotossistema e de genes relacionados a morte celular programada, sendo estes associados a genes *R* e ao *BAG-1*. Apesar da reduzida quantidade de genes diferencialmente expressos em folhas não inoculadas de *sitiens* quando comparada com o ‘MT’ sob elevada umidade, indica que, apesar da mutação ser em um gene de grande importância, poucos genes foram afetados dentro do metabolismo geral. Porém, os genes diferencialmente expressos encontrados estão associados a defesa vegetal podendo ser induzidos por uma provável produção de EROs nos fotossistemas. Assim, sugere-se que a deficiência de ABA no mutante *sitiens* pode induzir uma suscetibilidade a *S. sclerotiorum* e resistência a *O. neolycopersici* pela diferença na produção de EROs, morte celular programada e resposta de hipersensibilidade (HR), como foi descrito por Asselbergh et al (2007), Seifi et al. (2013) e Sivakumaran et al. (2016).

Quando o mutante não inoculado *sitiens* é exposto a um ambiente com baixa umidade, portanto mais estressante para este mutante, visto que a deficiência de ABA dificulta o fechamento estomático e aumenta a perda de água, o número de genes diferencialmente expressos aumenta em cerca de dez vezes, chegando a 505 genes diferencialmente expressos em relação ao controle ‘MT’.

Dos 505 genes diferencialmente expressos, 116 genes foram reprimidos em *sitiens*, sendo que não houve enriquecimento de termos referente a nenhuma classe de genes específica. Alguns

genes reprimidos estão associados a sinalização e degradação de ABA (*LATE EMBRYO ABUNDANCE PROTEIN*, *ABA 8'-HYDROXYLASE* e *NINJA-FAMILY PROTEIN*) indicando efeitos da possível redução dos níveis de ABA em *sitiens*. Outros genes associados a produção de metabólitos secundários e de ácido jasmônico também foram reprimidos (*CATHEPSIN D INHIBITOR PROTEIN*, *MYB 75*, *GERMACRENE-D SYNTHASE* e *LIPOXYGENASE*), assim como genes associados a produção de cera (*CER1* e *FATTY ACID ELONGASE 3-KETOACYL-COA SYNTHASE*).

Foram encontrados 389 genes induzidos em *sitiens*, sob condições de baixa umidade quando comparado a 'MT'. Houve enriquecimento de termos de GO detectados para as classes de genes com atividade quinase, atividade fenilalanina-amônia liase (síntese de SA), processo catabólico de lipídeos e proteínas com domínio de ligação LRR. Dos 389 genes, 76 são classificados com atividade quinase. A fosforilação de proteínas, provavelmente iniciada por receptores de membrana, pelo do reconhecimento de PAMPs/MAMPs, é capaz de transmitir o sinal de defesa *downstream* para a maquinaria de defesa da célula. Em alguns casos, o receptor contém um domínio quinase que pode desencadear a cascata de fosforilação, enquanto que em outros, um mensageiro secundário, como o Ca^{2+} , pode desencadear a fosforilação por essas proteínas quinases. No caso de *sitiens*, sugere-se que a baixa umidade pode ser reconhecida como um estresse abiótico, devido aos níveis reduzidos de ABA, desencadeando a ativação de genes relacionados a respostas a estresses abióticos, que pode desencadear uma resistência induzida (*priming*) contra patógenos. Essa defesa parece ser induzida também por íons de cálcio, devido a indução em *sitiens* de dez genes relacionados à calmodulina, proteína responsiva ao cálcio (Snedden; Fromm, 2001).

Diversos fatores de transcrição também foram induzidos significativamente. Dentre eles, treze fatores de transcrição da superfamília WRKY. Em *arabidopsis*, são conhecidos mais de 100 fatores de transcrição do tipo WRKY (Eulgem et al., 2000). A maioria dos membros desses fatores de transcrição indicam que estes possuem papéis na reprogramação transcricional associado à resposta imune da planta (Rushton et al., 2010). Os genes de fatores de transcrição da família WRKY induzidos foram: *WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY22*, *WRKY30*, *WRKY31*, *WRKY33*, *WRKY39*, *WRKY41*, *WRKY50*, *WRKY53*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY58* e *WRKY76*. Desses, os fatores *WRKY33*, *WRKY39*, *WRKY41*, *WRKY57*, *WRKY58* e *WRKY76* são regulados ou regulam a biossíntese de ABA (Jiang et al., 2012; Cai et al., 2014; Ding et al., 2014; Liu et al., 2015; Sun et al., 2015; Liu et al., 2016). Porém, onze genes dos fatores WKRY induzidos (*WRKY16*, *WRKY17*, *WRKY22*, *WRKY30*, *WRKY31*, *WRKY33*, *WRKY41*, *WRKY50*, *WRKY54*, *WRKY57*, e *WRKY76*) estão associados a resposta de defesa de plantas (Journot-Catalino et al.,

2006; Zheng et al., 2006; Higashi et al., 2008; Gao et al., 2011; Birkenbihl et al., 2012; Jaskiewicz et al., 2011; Peng et al., 2012; Lacroix et al., 2013; Jiang; Yu, 2016; Rushton et al., 2010; Liu et al., 2016; Liu et al., 2017).

Foram induzidos também genes relacionados a defesa: oito genes de resistência (genes *R*), do tipo NBS-LRR, *RIN4* (*RPM1 INTERACTING PROTEIN 4 TRANSCRIPT 2*), três genes de chitinases, três genes de Major allergen Mal d1, dois genes de endo-beta-1 3-glucanase, *ALTERNARIA STEM CANKER RESISTANCE*, PRs (incluindo a PR1), *NP24 PROTEIN PRECURSOR* e *AVR9/CF-9 RAPIDLY ELICITED PROTEIN 65*.

Outros três genes classificados dentro da função de fenilalanina-amônia liase foram induzidos no transcriptoma de *sitiens* em relação a 'MT'. Essa enzima catalisa a deaminação de L-fenilalanina para produção de ácido cinâmico, um precursor de várias rotas biossintéticas para várias classes de metabólitos secundários vegetais derivados de fenilpropanóides (Bate et al., 1994). Essa é uma enzima chave na produção de precursores para biossíntese de lignina e ácido salicílico (Mauch-Mani; Slusarenko, 1996), sugerindo uma indução na via de biossíntese de ácido salicílico (SA), evidenciado na quantificação desse hormônio em plantas não inoculadas de *sitiens* (sob condições de baixa umidade), em que a concentração de AS foi cerca de duas vezes maior do que plantas não inoculadas de 'MT' (Figura S1-artigo anterior).

Dados bioquímicos e moleculares sugerem que o SA induz a resposta de hipersensibilidade (HR) afetando uma etapa inicial que precede a geração de sinais anteriores a morte celular, incluindo os derivados da explosão oxidativa (Alvarez, 2000). A indução de três genes de peroxidases e de ascorbato oxidase podem indicar um papel do SA na indução da produção de EROs ou reorganização da parede celular (Low et al., 1996; Mur et al., 1996). A produção de EROs derivadas da explosão oxidativa, além de induzir mudanças nas proteínas estruturais da parede celular, funciona como um desencadeador local da morte celular programada e da HR (Milosevic; Slusarenko, 1996). Apesar de não ter sido detectada a indução significativa de nenhum gene desencadeador da morte celular programada, três genes que codificam a proteína *NECROTIC SPOTTED LESIONS 1* foram induzidos (Noutoshi et al., 2006). Essa proteína regula negativamente a morte celular programada, assim como o gene *BAG-1*, encontrado também em *sitiens* na presença de câmara úmida (Sawitzk et al., 2002). A indução desses genes *NSL1* e *BAG1*, provavelmente evita a morte celular programada na ausência de um elicitor patogênico, apesar de indicar uma possível participação desse processo quando as plantas são submetidas a inoculação com patógenos.

Curiosamente, alguns genes associados a biossíntese e resposta ao etileno foram induzidos em *sitiens*, sendo dois genes *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE*

OXIDASE, codificam a enzima que catalisa a última etapa da produção de etileno, dois genes de resposta *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 3*, *ETHYLENE-INDUCING XYLANASE RECEPTOR 2* e um gene receptor de etileno, *EIX receptor 1*.

Genes envolvidos no processo catabólico de lipídeos também foram detectados na análise por enriquecimento de termos no transcriptoma de folhas não inoculadas de *sitiens*, quando comparados com o ‘MT’. Em plantas, as vias metabólicas de ácidos graxos desempenham papel significativo na defesa contra patógenos. Historicamente, os ácidos graxos só foram atribuídos a papéis passivos na defesa da planta, como a biossíntese de precursores para componentes da cutícula ou do hormônio ácido jasmônico (Kachroo; Kachroo, 2009). No entanto, estratégias antisense revelaram que as oxilipinas, metabólitos produzidos a partir da oxidação de ácidos graxos insaturados, também são essenciais para a resistência das plantas contra patógenos (Blée, 2002). Os ácidos graxos podem ser liberados de membranas por muitas lipases, incluindo fosfolipases A e D, galactolipases, acil hidrolases, lipoxigenases e monoxigenases dependentes de citocromo P450 (Kagan, 1989; Porta, Rocha-Sosa; 1996; Froehlich et al., 2001). Alguns metabólitos derivados do catabolismo de ácidos graxos podem agir como metil jasmonato, ou como elicitores voláteis de respostas de defesa. Acredita-se ainda que as fito-oxilipinas possam desempenhar um papel fundamental na defesa, como moléculas sinalizadoras e/ou como substâncias protetoras, como antibacterianos ou como constituintes da cutina (a estrutura da cutícula que protege toda a parte aérea de uma planta) (Blée, 2002).

Apesar da pequena quantidade de genes diferencialmente expressos encontrados em folhas não inoculadas de *sitiens*, em condições de elevada e baixa umidade, quando em comparação com o ‘MT’, é possível observar que esse mutante apresenta indução de genes responsivos ao ácido salicílico, principalmente em condições de baixa umidade. O aumento dos níveis de ácido salicílico regula inúmeros genes de resposta à defesa, induzindo a resistência a patógenos biotróficos e suscetibilidade a patógenos necrotróficos. Além da indução de genes responsivos ao ácido salicílico, genes associados ao etileno são induzidos, sugerindo também uma participação desse hormônio na defesa a patógenos mediada por ABA.

Análise da expressão diferencial de genes do transcriptoma de folhas de ‘MT’ e *sitiens* inoculadas com *S. sclerotiorum* em comparação com o ‘MT’ não inoculado

Em todo o transcriptoma de *sitiens* e ‘MT’ foram identificados 33.810 genes expressos. Desses quase 34 mil genes, foram encontrados 8.331 genes diferencialmente expressos em folhas de ‘MT’ inoculadas com *S. sclerotiorum*, e 5.564 em folhas de *sitiens* inoculadas com *S. sclerotiorum* (Figura 1) em relação ao genótipo ‘MT’ não inoculado. Sendo assim, folhas de ‘MT’ apresentaram mais genes diferencialmente expressos do que o mutante *sitiens*.

O genótipo ‘MT’ apresentou maior resistência ao patógeno *S. sclerotiorum* do que *sitiens*. De modo geral, as classes de genes induzidas identificadas pelo enriquecimento de termos no transcriptoma de ‘MT’, como atividade quinase serina/treonina de proteínas, ligação ao íon cálcio, transdução de sinal, indicam que há uma cascata de sinalização mediada, provavelmente, pela presença e reconhecimento de efetores liberados pelo *S. sclerotiorum* por receptores imunes culminando, em muitas vezes, na HR no local da infecção por patógenos. Entre as três classes acima somente a de transdução de sinal não foi observada em *sitiens*.

Figura 1. Número de genes diferencialmente expressos em ‘MT’ e *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum* em 24 HAI [$P < 0.05$] comparado com ‘MT’ não inoculado. O número indica o número de genes diferencialmente expressos após a inoculação.

Foram identificadas também diversos genes do grupo de receptores SNAP enriquecidas, e induzidas somente no transcriptoma de folhas de ‘MT’ inoculadas (Figura 2). Estes receptores

atuam como um marcador para identificar uma membrana e interagir seletivamente com uma ou mais SNAREs em outra membrana, mediando a fusão de membranas, desempenhando um papel central na geração da especificidade do tráfego vesicular e na catálise do processo de fusão de membranas (Shen; Mizushima, 2014). A produção de calose é um processo secretório e a fusão das vesículas secretoras envolvidas com a membrana plasmática é mediada por proteínas SNAREs (Collins et al., 2003). Durante a formação da placa de calose, a calose sintase é transportada em vesículas para o local em que sua função é necessária (Verma; Hong, 2001). Interessantemente, as proteínas SNAREs tem sido envolvidas em respostas dependentes de ABA a estresses abiótico e resistência a patógenos (Zhu et al., 2002; Collins et al., 2003). É conhecido também que a proteína SNARE Vti1 é requerida para as vias de transporte de vesículas para o vacúolo (Von Mollard; Stevens, 1999) e sua homóloga em arábida, VTI12, é considerada necessária para autofagia (Surpin et al., 2003).

Figura 2. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo atividade receptor SNAP. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2$ fold change positivos e laranja indica valores negativos.

Uma indução de genes de proteínas vacuolares foi observada em ‘MT’ (Figura 3). Os vacúolos vegetais, geralmente servem como um compartimento lítico para a degradação de substâncias e como local de armazenamento de proteínas. Muitas proteínas são produzidas no retículo endoplasmático rugoso e são endereçadas para o vacúolo e algumas delas estão relacionadas ao tráfego de vesículas associados a autofagia dentro das células (Hara-Nishimura et al., 1998; Herman; Schmidt, 2004).

Figura 3. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo transporte vacuolar. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos laranja indica valores negativos.

Genes que codificam proteínas de ligação a outras proteínas também foram induzidos somente em ‘MT’. Como essa classe inclui diversas proteínas com diversas funções (proteínas com marcação para degradação, chaperonas e marcação de proteínas para sinalização) não é possível sugerir um papel dessa classe na resistência mediada por ABA em ‘MT’ a *S. sclerotiorum*.

Na análise de enriquecimento de termos de folhas inoculadas de ‘MT’ em comparação com folhas não inoculadas de ‘MT’, foi verificado muitos genes que codificam subunidades do proteassomo. Essa classe de genes também foi enriquecida em *sitiens*. Foram 28 genes de proteassomo induzidos, sendo que oito genes foram induzidos exclusivamente em ‘MT’, não sendo diferencialmente expressos no mutante *sitiens*.

As plantas utilizam métodos distintos para controlar o nível e atividade de suas proteínas constituintes. Um desses métodos, é a reparação seletiva de proteínas pelo proteassomo (Xiong et al., 2007). O proteassomo é um complexo de multisubunidades altamente conservado e composto de várias proteases multicatalíticas responsáveis pela maior parte da degradação de proteínas citosólica e nuclear (Smalle; Vierstra, 2004). A via do proteassomo fornece um

importante ponto de controle, degradando enzimas limitantes e fatores regulatórios chaves (Smalle; Vierstra, 2004).

No entanto, pouco é conhecido se o próprio proteassomo esteja envolvido na morte celular e na resistência contra patógenos. Pajerowska-Mukhtar e Dong (2009) mostraram que a subunidade do proteassomo PBA1 possui atividade DEVDase, uma atividade associada a caspase-3, cuja ação é responsável pela morte celular induzida por bactérias. Recentemente, várias proteínas associadas à ubiquitinação que desempenham papel na sinalização de defesa tem sido identificadas, indicando que a ubiquitinação é importante para a resistência das plantas contra patógenos (Dreher; Callis, 2007; Craig et al. 2009).

Lisofosfolídeos são um subgrupo da família dos glicerofosfolípidos derivados da hidrólise de fosfolídeos, contendo apenas um ácido graxo e um grupo fosfato. As lisofosfolipases são enzimas que atuam sobre membranas biológicas para regular os lisofosfolídeos multifuncionais (Balsinde, 2002). O grupo de genes codificadores dessas lipases foi enriquecido no transcriptoma de 'MT', sendo estes genes induzidos (Figura 4). O catabolismo dos fosfolídeos é essencial para a função celular e abrange uma variedade de processos, incluindo a produção metabólica de ácidos graxos incomuns, reorganização e degradação da membrana, e a produção de mensageiros secundários (Chapman, 1998). Na interação planta-patógeno, as mudanças a curto prazo na atividade da fosfolipase estão, provavelmente, envolvidas na sinalização durante a percepção de patógenos. As subseqüentes mudanças a longo prazo na atividade das fosfolipases são mais prováveis de atuar nas mudanças no citoesqueleto, reorganização da membrana, ou degradação de membranas de organelas e da célula (Roy et al., 1995; Chandra et al., 1996; Legendre et al., 1996).

O metabolismo de lipídeos está associado diretamente a produção de autofagossomos e de corpos lipídicos restritos a vacúolos, que juntos atuam na autofagia de células do tapete em das anteras em arroz, onde mutantes defectivos na autofagia, mostraram reduzidos acúmulos de lipídeos, devido ao comprometimento na edição de fosfatidilcolinas e na desaturação lipídica (Kurusu et al., 2014).

Figura 4. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo lisofosfolipase. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e laranja indica valores negativos.

Foi observado somente em ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum* um enriquecimento de termos para genes reprimidos associados a ligação a clorofila, ao centro de reação do fotossistema I e aos plastídeos, indicando uma possível degradação dessas moléculas e organelas (Figuras 5 e 6). É comum observar que a clorose do tecido vegetal é induzida por patógenos e isso pode ser devido à degradação direta ou à ruptura dos cloroplastos (Hofius et al., 2009). Durante o ataque do patógeno, as plantas provavelmente remobilizam nitrogênio, desencadeiam uma explosão de EROs e geram moléculas de sinalização de resposta patogênica de dentro do cloroplasto de células para outras organelas ou células circundantes (Ishida et al., 2008). Embora a maior parte da degradação de organelas e estruturas celulares nas plantas sejam mediadas pela autofagia, evidências mostram que a autofagia desempenha um papel na degradação do cloroplasto durante a senescência (Wada et al., 2009; Ishida; Wada, 2009). Porém, o papel da autofagia na degradação dos cloroplastos durante o ataque por patógenos ainda é pouco conhecida.

Figura 5. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo proteínas de ligação a clorofila. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2$ fold change positivos e laranja indica valores negativos.

Figura 6. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo plastídeos identificados pelo enriquecimento funcional. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2$ fold change positivos e laranja indica valores negativos.

Na análise de enriquecimento de termos do transcriptoma de ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum*, as classes de genes que se mostraram induzidas poderiam estar associadas à autofagia; porém, estes genes podem estar envolvidos em outros processos moleculares. No entanto, a principal evidência de que o processo autofágico está acontecendo e agrupando todas estas

classes, é a presença de genes *AuTophagy* (ATG) mais induzidos em ‘MT’ (Figura 7). Numerosos genes ATG foram identificados em leveduras, muitos dos quais tem sido identificado em animais e plantas (Bassham et al., 2006; Meijer et al., 2007; Kourtis; Tavernarakis, 2009).

Essas proteínas ATG regulam a formação de autofagosomos revestidos com membrana, e a subsequente fusão destas vesículas com compartimentos lisossômicos ou vacuolares para a degradação (Klionsky; Ohsumi, 1999). Apesar de não haver enriquecimento de genes relacionados a autofagia, cinco genes *ATG* foram induzidos em ‘MT’, enquanto que em *siliens* foram induzidos apenas três genes. Os dois genes induzidos e diferencialmente expressos exclusivamente em ‘MT’ são *ATG3* e *ATG8* (Figura 7).

ATG3 é uma enzima conjugadora do tipo E2 que pode catalisar a conjugação de *ATG8*-PE no início do processo de autofagia (Ichimura et al., 2004). Em plantas de tabaco, foi observado que a proteína *ATG3* interage com desidrogenases do gliceraldeído-3-fosfato (GAPCs) para regular a autofagia, sendo que GAPCs regulam negativamente a autofagia. Quando estas plantas foram submetidas a um estresse oxidativo pela aplicação exógena de metil viologênio (MV) houve uma inibição da interação de *ATG3* com GAPCs, e ativação da autofagia dependente de *ATG3*. Além disso, o silenciamento de GAPCs aumenta a morte celular e a resistência das plantas, mediada pelo gene *N* (gene *R* de resistência ao *Tobacco Mosaic Virus*), contra os patógenos *Tobacco Mosaic Virus*, *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 e *P. syringae* pv *tabaci* (Han et al., 2015).

As proteínas da família *Atg8* em plantas parecem ser determinantes para o processo de autofagia (Pankiv et al., 2007; Thompson et al., 2005). A interação entre os receptores autofágicos e as proteínas da família *Atg8* através de motivos de interação da família *Atg8* (AIM) contribui, pelo menos em parte, para a seleção de autofagossomos específicos (Noda et al., 2010), possivelmente ligando estes lisossomos e vacúolos para permitir que seu conteúdo seja degradado e/ou formando sua maquinaria, através da fusão de membranas.

Figura 7. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo proteínas relacionadas a autofagia. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e laranja indica valores negativos.

Apesar de não haver enriquecimento da classe de genes relacionados ao ABA em nenhum dos dois genótipos com a inoculação, foram observados muito genes induzidos da via de síntese e degradação de ABA em ‘MT’, porém, a maioria dos receptores de ABA do tipo PYL foram mais induzidos em *sitiens* (Figura 8). Somente o gene do receptor PYL6 foi induzido igualmente em ambos com a infecção por *S. sclerotiorum*. Este receptor PYL6 interage com o fator de transcrição MYC2 e modifica a transcrição de proteínas repressoras, JAZ6 e JAZ8, da sinalização de ácido jasmônico (Aleman et al., 2016). Porém, nenhum gene da rota de sinalização de JA foi diferencialmente expresso em ‘MT’ e *sitiens* com a infecção por *S. sclerotiorum* em relação ao controle não inoculado.

Figura 8. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo síntese, catabolismo e sinalização de ABA. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e laranja indica valores negativos.

Foi possível observar também uma indução dos genes de síntese e de resposta ao SA, principalmente os genes de fenilalanina amônia liase nos dois genótipos (Figura 9). Porém, alguns genes de sinalização por SA foram reprimidos, sendo que houve uma maior repressão em ‘MT’ do que em *sitiens* inoculado. Sabe-se que o ABA antagoniza a sinalização de SA, e isso acontece via NPR1 (Jiang et al., 2010).

Já muitos genes da síntese de etileno foram mais reprimidos em ‘MT’ do que em *sitiens* (Figura 10), sugerindo que o mutante de ABA pode apresentar elevados níveis de etileno. Em plantas de tomateiro infectadas com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, o etileno regula a morte celular via ácido salicílico (O’Donnell et al., 2001). Assim, o elevado nível de etileno e ácido salicílico encontrados em *sitiens* pode induzir a morte celular facilitando o crescimento do *S. sclerotiorum*.

Figura 9- *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo síntese, catabolismo e sinalização de SA. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2$ fold change positivos e laranja indica valores negativos.

Figura 10. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo síntese, catabolismo e sinalização de etileno. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2$ fold change positivos e laranja indica valores negativos.

Análise da expressão diferencial de genes comparativa do transcriptoma de folhas de ‘MT’ e de *sitiens* inoculadas com *O. neolycopersici* em relação ao ‘MT’ não inoculado

O número de genes diferencialmente expressos no transcriptoma de folhas de ‘MT’ e *sitiens* inoculados com *O. neolycopersici* foi menor do que a quantidade de genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* (Figura 1 e Figura 11). Foram encontrados 2.103 genes diferencialmente expressos em *sitiens* e 911 em ‘MT’ (Figura 11), sendo que *sitiens*, que apresenta mais genes diferencialmente expressos, também apresentou maior resistência a *O. neolycopersici* do que ‘MT’.

Figura 11. Número de genes diferencialmente expressos em ‘MT’ e *sitiens* inoculados com *O. neolycopersici* em 168 HAI [$P < 0.05$] comparado com ‘MT’ não inoculado. O número indica o número de genes diferencialmente expressos após a inoculação

Genes reprimidos relacionados ao termo ‘resposta a ferimentos’ foram enriquecidos nos transcriptomas (Figura 12). Esses genes, geralmente respondem ao hormônio JA (Moura e Ryan, 2001; Casaretto et al., 2004), indicando uma possível repressão nas vias de JA, principalmente, em *sitiens*.

Figura 12. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo resposta a ferimentos. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e laranja indica valores negativos.

Uma classe enriquecida de genes reprimidos em *sitiens* foi a de epoxide hidrolases (Figura 13). Essas proteínas podem ser induzidas por JA, mas não por ABA (Blee et al., 1992; Stapleton et al., 1994; Kessler et al., 2004), indicando possivelmente uma repressão devido a repressão da sinalização de JA.

Figura 13. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo epoxide hidrolase. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e laranja indica valores negativos.

Como esperado, os genes da via de síntese e resposta ao SA foram induzidos em *sitiens*, assim como ocorreu neste mutante inoculado com *S. sclerotiorum* (Figura 14). É conhecido que o ABA suprime as respostas de SA em tomateiro (Audenaert et al., 2002) e em arroz (Jiang et al., 2010), corroborando com os resultados encontrados nesse transcriptoma. A aplicação ou elevados níveis de SA leva ao acúmulo de proteínas relacionadas a patogênese, de EROs e indução da resposta de hipersensibilidade, que provavelmente seja a forma de resistência encontrada neste mutante a *O. neolycopersici* (Surplus et al., 1998).

Figura 14. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo resposta genes de síntese e resposta ao ácido salicílico. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e laranja indica valores negativos.

As peroxidases existem como isoenzimas com diversos perfis de expressão. Participam de vários processos fisiológicos, como a lignificação, suberização, catabolismo de auxina, respostas a ferimentos e mecanismos de defesa contra a infecção por patógenos (Hiraga et al., 2001). As peroxidases do espaço apoplástico são consideradas como catalisadoras da geração de radicais oxil de vários compostos aromáticos (Takahama; Yoshitama 1998), e a produção geralmente resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kagan et al., 1990). Em geral, um grupo de peroxidases foram mais induzidas em 'MT' (Figura 15-contorno preto), um outro grupo foi menos reprimida em 'MT' do que em *sitiens* (Figura 15-contorno vermelho), sugerindo um possível papel na remoção de EROs a partir dessas enzimas em 'MT' o que não levaria a HR.

Figura 15. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo atividade peroxidase. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e laranja indica valores negativos.

Foi observado uma quantidade elevada de genes associados à resistência a patógenos induzidos em *sitiens* (Figura 16). Os genes de resistência à doença (R) são determinantes da especificidade da resposta imune da planta. Este simples, mas sofisticado sistema imune envolve uma interação genética alelo específica entre um gene R de hospedeiro e um gene de avirulência de patógeno (*avr*) (Flor, 1971). Quando essa interação ocorre, uma resposta de defesa é desencadeada. Esta resposta é caracterizada pelo rápido fluxo de cálcio, explosão oxidativa extracelular, transcrição e reprogramação dentro e ao redor do local de infecção e, na maioria dos casos, a morte celular programada localizada.

Figura 16. *Heatmap* dos transcritos diferencialmente expressos que compõem o termo genes de resistência. Na barra de cores o azul representa valores de $\log_2 \text{fold change}$ positivos e laranja indica valores negativos.

Proteômica de folhas de ‘MT’ e *sitiens* inoculadas com *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici*

Após evidenciar sobre um possível papel direto do ABA na modulação de genes relacionados à defesa, uma análise proteômica foi realizada com o objetivo de identificar possíveis proteínas reguladas por este hormônio de forma a complementar a análise de RNA-seq. Foram avaliadas plantas de ‘MT’ e *sitiens* inoculadas com *S. sclerotiorum* nos tempos de 24 e 48 HAI e com *O. neolycopersici* no tempo de 168 HAI. As análises de todos os tratamentos inoculados foram relativas ao controle ‘MT’ não inoculado em cada tempo avaliado. Serão discutidas somente as proteínas relacionadas à defesa ou ao controle hormonal, que se encontram apresentados nos gráficos a seguir. As demais proteínas diferencialmente acumuladas, relacionadas ao metabolismo primário, se encontram descritas em tabelas nos dados suplementares.

Em ‘MT’ e *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum* a 24 HAI, foi observada uma redução na abundância da proteína lipoxigenase (Figura 17). Esta enzima presumidamente catalisa a primeira etapa da via de biossíntese de ácido jasmônico em resposta a ferimentos e ataque a patógenos (Mueller, 1997; Feussner; Wasternack, 2002). Logo, a síntese de ácido jasmônico parece ser prejudicada com a infecção de ambos os patógenos; porém esta parece ser mais reprimida em *sitiens* do que em ‘MT’.

Proteínas 14-3-3 parecem desempenhar um papel na defesa contra patógenos (Roberts; Bowles, 1999; Denison et al., 2011) Estas proteínas foram induzidas em plantas de ‘MT’, mas não foram detectadas no mutante *sitiens*. A proteína PR STH-2 *like* foi também induzida em ‘MT’, porém não foi detectada em mutantes *sitiens* (Figura 17). Esta proteína, também conhecida como PR-10, é induzida em plantas infectadas por diversos patógenos (Constabel; Brisson, 1992; McGee et al., 2001; Colditz et al., 2004; Liu et al., 2005). Interessantemente, muitas proteínas desta família são reguladas por ABA (Colditz et al., 2004).

Outra proteína detectada induzida em folhas quando infectada por *S. sclerotiorum* a 24 HAI foi a ACC oxidase 1 (Figura 17). Essa proteína teve um aumento em abundância em ‘MT’ inoculado, sendo diferencialmente significativa do ‘MT’ controle, enquanto que em *sitiens* esse aumento apresentou-se em menor proporção, não apresentando diferença estatística do controle ‘MT’ (Figura 17). Porém, como foi visto anteriormente, a expressão de genes de síntese de etileno apresenta uma tendência de ser menos induzida ou mais reprimida em ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum*. A ACC oxidase tem sido descrita por desempenhar um importante papel no controle da biossíntese de ET, sendo que esta catalisa a última etapa de biossíntese de ET (Adams; Young,

1979; Wang et al., 2002). Esse hormônio pode estar relacionado tanto com o desenvolvimento da doença pela aceleração da senescência, quanto com a resistência ao patógeno (Thomma et al., 1999; Lorenzo et al., 2003). Como o ‘MT’ apresenta uma maior resistência a *S. sclerotiorum* do que o mutante *sitiens*, sugere-se que o aumento de ET esteja envolvido com a resistência a este patógeno. O mutante *ein-2* de *arabidopsis*, insensível ao etileno, foi mais suscetível a *S. sclerotiorum* do que o selvagem Col-0, sugerindo que o ET possui um papel na defesa contra este patógeno (Guo; Stotz, 2007). No entanto, o papel do ET na interação com *S. sclerotiorum* com o tomateiro permanece desconhecido, já que o fungo tem a capacidade de produzir ET e a aplicação exógena desse hormônio em altas concentrações induz o crescimento do micélio (Al-Masri et al., 2006).

Foi observado um acúmulo na proteína glutaredoxina tanto em ‘MT’ quanto em *sitiens*. Apesar da média de abundância da proteína ter sido maior em *sitiens* do que em ‘MT’, em ‘MT’ essa diferença foi significativa (Figura 17). Glutaredoxinas são capazes de modificar o status redox de proteínas e parecem estar envolvidas na patogênese, sendo requeridas para facilitar a infecção por *B. cinerea* (La Camera et al., 2011). Glutaredoxinas podem se ligar a fatores TGA2 interagindo com *NPR1*, receptor de AS, suprimindo a via de defesa induzida por JA e etileno (Ndamukong et al., 2007; Zander et al., 2012). Desta forma, as glutaredoxinas parecem ter um papel negativo ou elas são induzidas em *sitiens* como forma de aumentar a remoção de EROs através da glutathione.

Assim, podemos sugerir que proteínas de defesa foram induzidas em ‘MT’, porém não em *sitiens*, explicando o efeito de resistência que esse genótipo possui quando infectado com *S. sclerotiorum* e que, além dos hormônios ABA, AS e JA, o hormônio ET parece estar envolvido na defesa contra *S. sclerotiorum*.

Figura 17. Abundância relativa (tratamento/controle) de proteínas relacionadas à defesa em folhas de 'MT' (barras pretas) e *sitiens* (barras cinzas) inoculadas com *S. sclerotiorum* em 24 HAI. Valores de *fold change* negativo significam redução e positivo aumento na abundância da proteína em relação ao controle MT não inoculado. As médias são resultantes de três replicatas biológicas. O '*' indica significância estatística a $p < 0,05$ de acordo com o teste *t* de Student e 'nd' significa proteína não detectada. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento.

Em plantas infectadas com *S. sclerotiorum* a 48 HAI, a proteína glucan-endo-1,3-beta-glucosidase, também conhecida como β -1,3-glucanase, teve um aumento em abundância em 'MT' e *sitiens*, porém muito superior em *sitiens* do que em 'MT' (Figura 18). Essa proteína é uma proteína de defesa, degradando β -1,3/1,6-glucan da parede celular de fungos, liberando oligossacarídeos β -1,3- glucan elicitores, no qual induzem numerosas respostas de defesa (Côté; Hahn, 1994; Shibuya; Minami, 2001).

Apesar da proteína β -1,3-glucanase ter apresentado um maior acúmulo em *sitiens* do que em 'MT', as outras proteínas de defesa tiveram uma maior acúmulo em 'MT' (Figura 18). Além das proteínas PR STH-2-like e ACC oxidase 1 que foram induzidas a 24 HAI, as proteínas PR1 incluem um grupo dominante de PRs que são induzidas por patógenos ou por SA, e são comumente usadas como marcadores de resistência sistêmica adquirida (SAR), porém com função desconhecida (Niderman et al., 1995; Van Loon; Strien, 1999). Dentro desse grupo também se encontra a proteína PR 1A1 (ou PR1a) que teve um aumento em abundância em 'MT', porém não em *sitiens* (Figura 8). Essa proteína é induzida por infecção por patógenos e pela aplicação exógena de etileno em tomateiro (Tornerio et al., 1997) e a expressão do gene desta proteína em plantas infectadas com *S. sclerotiorum* em 48 HAI, verificado anteriormente neste trabalho, foi semelhante em 'MT' e *sitiens*, sugerindo uma regulação pós-transcricional.

Um inibidor de endoglucanase específica de xiloglucanos de fungos aumentou em abundância mais em ‘MT’ do que em *sitiens* (Figura 18). Essa proteína inibe endoglucanases de fungos, que são secretadas por estes patógenos para a degradação de xiloglucanos da parede celular vegetal (Qin et al., 2003).

Outra proteína identificada somente em ‘MT’ foi a scopoletina glicosiltransferase (Figura 18). O metabólito scopolina é derivado da glicosilação da scopoletina, uma fitoalexina envolvida na defesa contra patógenos necrotróficos, através da enzima scopoletina glicosiltransferase (Chong et al., 2002; Li; Wu, 2016). A scopolina mostrou um efeito inibitório no crescimento de *S. sclerotiorum in vitro* e plantas de girassol mais resistentes a *S. sclerotiorum* tiveram uma quantidade de scopoletina superior a plantas suscetíveis (Prats et al., 2006).

Uma endoquitinase ácida de 26 kDa, capaz de degradar a parede celular do fungo, também foi mais acumulada em ‘MT’ do que em *sitiens* (Figura 8). Essa endoquitinase já foi previamente caracterizada em tomateiro e foi descrita apresentando maior acúmulo em interações incompatíveis com *Cladosporium fulvum* (Danhash et al., 1993).

Por outro lado, em *sitiens* um inibidor de proteinase induzido por etileno aumentou em abundância cerca de 10 vezes mais que o controle ‘MT’ inoculado (Figura 18). Pouco se sabe sobre inibidores de proteinases envolvidos na defesa a patógenos. Porém, como as proteinases são responsivas ao etileno, tudo indica que esse inibidor seja uma forma de reprimir vias induzidas por esse hormônio.

Assim, sugere-se que o ABA participa na indução precoce de proteínas de defesa em ‘MT’ contra *S. sclerotiorum* apresentando uma resistência parcial, enquanto que na ausência de ABA essa indução é prejudicada, mesmo que tardiamente.

Figura 18. Abundância relativa (tratamento/controle) de proteínas relacionadas à defesa em folhas de 'MT' (barras pretas) e *sitiens* (barras cinzas) inoculadas com *S. sclerotiorum* em 48 HAI. Valores de *fold change* negativo significam redução e positivo aumento na abundância da proteína em relação ao controle 'MT' não inoculado. As médias são resultantes de três replicatas biológicas. O '*' indica significância estatística a $p < 0,05$ de acordo com o teste t de Student e 'nd' significa proteína não detectada. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento

Na análise de proteômica de 'MT' e *sitiens* inoculados com *O. neolycopersici* foi observado um aumento em abundância de três proteínas de defesa em 'MT' e *sitiens* (Figura 19). A proteína PR6 foliar, também conhecida como PR1B1, foi induzida 5 vezes mais no 'MT' do que em *sitiens* (Figura 19). O gene desta proteína foi superexpresso em tabaco e nenhuma mudança nos sintomas foi observada com a inoculação do vírus *tobacco mosaic virus* (TMV), implicando que esta proteína não tem função antiviral (Cutt et al., 1989). Talvez essa proteína seja efetiva para alguns patógenos apenas, não sendo efetiva para *O. neolycopersici*.

A proteína PR STH-2-like, assim como ocorreu em folhas infectadas com *S. sclerotiorum* acumulou somente em 'MT', não sendo detectada em *sitiens* (Figura 19). A proteína NP24, também conhecida como proteína *thaumatin-like*, foi acumulada apenas em 'MT', mas não foi detectada em *sitiens* (Figura 19). As duas isoformas desta proteína foram caracterizadas em frutos de tomateiro e pode estar envolvida com a resistência a alguns patógenos como *Phomo betae* e

Verticillium dahliae, enquanto que não foi verificado a inibição do crescimento fúngico de *Fusarium colomorum*, *Ascochyta pisi* e *B. cinerea* (Pressey, 1997).

Assim, a única proteína que apresentou abundância diferencial que pudesse explicar a resistência a *O. neolycopersici* é a endoquitinase básica de 30 kDa, também conhecida como CHI9. Essa quitinase acumulou em *sitiens* diferencialmente do controle ‘MT’ não inoculado, mas não em folhas de ‘MT’ infectadas com *O. neolycopersici* (Figura 19). Pouco se sabe sobre essa quitinase, porém ela é induzida por ferimentos, MeJa, etileno e giberelina (Wu; Bradford, 2003) e é capaz de inibir o crescimento de *Alternaria solani*, apresentando uma maior atividade quitinolítica do que as quitinases ácidas de 26 e 27 kDa (El-Hadary; Tayel, 2013).

Assim, a única proteína identificada que teve uma abundância diferencial em *sitiens* foi a CHI9, porém é provável que outras proteínas participem dessa resistência a *O. neolycopersici*, como as que foram identificadas via expressão diferencial de genes no RNA-Seq e não foram detectadas na análise de proteômica.

Figura 19. Abundância relativa (tratamento/controle) de proteínas relacionadas à defesa em folhas de ‘MT’ (barras pretas) e *sitiens* (barras cinzas) inoculadas com *Oidium* sp. em 168 HAI. Valores de *fold change* negativo significam redução e positivo aumento na abundância da proteína em relação ao controle ‘MT’ não inoculado. As médias são resultantes de três replicatas biológicas. O ‘*’ indica significância estatística a $p < 0,05$ de acordo com o teste *t* de Student e ‘nd’ significa proteína não detectada. Foram avaliadas 3 repetições em cada tratamento

4.3. Discussão

Os dados de RNA-seq nos mostraram, que além da participação do ABA nos genes de defesa, esse hormônio parece regular os hormônios conhecidamente de defesa clássicos, mesmo que estes não pareçam determinar a resistência aos patógenos utilizados neste trabalho. Assim, o ABA parece reprimir a via de sinalização do SA, que consequentemente reprime a via de sinalização de JA. O ponto em que o ABA parece reprimir a via de SA é na transcrição do receptor NPR1, pois em ‘MT’ todos os genes a jusante de NPR1 foram mais reprimidos do que em *sitiens*. Como já foi descrito, o ABA suprime a transcrição dos genes *NPR1* e *WRKY45* em arroz (Jiang et al., 2010). Já o antagonismo entre o SA e o JA é bem conhecido e o SA antagoniza a sinalização de JA a jusante de COI1, ao interferir com o fator de transcrição ORA59 regulado por JA (Van der Does et al., 2013). Outro hormônio que o ABA parece interagir é o etileno, sendo que nos dados da análise de proteômica o ABA desencadeou uma maior abundância da proteína ACC oxidase, que é responsável pela síntese de etileno, em nível pós-transcricional, pois não foi verificado indução nesses genes no transcriptoma de ‘MT’ (Figura 20).

Figura 20. Modelo de *crossstalk* hormonal em tomateiro cv. 'Micro-Tom' sob o desafio de patógenos. O elevado nível de ABA induz a repressão da sinalização de SA, enquanto que o ácido salicílico, em elevados níveis em *sitiens* induz a uma repressão na síntese e sinalização de JA, enquanto que o ABA parece estar induzindo a síntese de etileno por meio da ACC oxidase.

Além do *crossstalk* com outros hormônios, o ABA regula outros mecanismos moleculares de defesa. Esses diferentes mecanismos resultam em tipos distintos de morte celular programada. Em plantas, a autofagia e a HR são reconhecidos como dois meios principais pelos quais a morte celular programada ocorre (Liu et al., 2005). Uma resposta imune inata bem-sucedida a patógenos biotrófico, frequentemente inclui HR, que parece ser iniciada pela difusão de sinais produzidos

após o reconhecimento de patógenos por receptores imunes que direcionam a morte celular (Coll et al., 2011). Já a autofagia é um processo catabólico importante, no qual proteínas e organelas danificadas são ‘engolidas’ e sequestradas em vesículas de membrana dupla denominadas autofagosomos (Thompson; Vierstra, 2005). Evidências indicam que a autofagia é necessária para a regulação adequada de HR durante a resposta imune inata de plantas (Liu et al., 2005; Patel et al., 2008), inclusive na interação com *S. sclerotiorum* (Kabbage et al., 2013).

Em ‘MT’ inoculado com *S. sclerotiorum* foi observado enriquecimento da classe de genes de receptores SNAP, vacuolares, lipases induzidos e enriquecimento da classe de genes de plastídeos reprimidos e proteínas de ligação a clorofila, junto com a indução diferencial de dois genes de autofagia determinantes para o processo de autofagia. Assim, sugere-se a indução desse processo de autofagia como forma de controlar a excessiva morte celular, aumentando a resistência ao patógeno necrotrófico *S. sclerotiorum*. Corroborando com esses dados, a autofagia regula negativamente a morte celular durante a senescência e na resposta imune através da sinalização de NPR1 e este controle é dependente de SA e independente de JA (Yoshimoto et al., 2009).

A inoculação de arábida com uma linha mutante não patogênica de *S. sclerotiorum* (A2), deficiente em ácido oxálico, exibiu um fenótipo de morte celular com crescimento restrito do patógeno, acompanhado por marcadores associados a HR (Kabbage et al., 2013). Esta observação é importante, porque a planta pode reconhecer e responder ao mutante A2 (manifestada pela HR), apesar da ausência do ácido oxálico, mas também sugere que os fenótipos de morte celular desencadeados por *S. sclerotiorum*, tipo selvagem e mutante A2 podem diferir (Kabbage et al., 2013). Apesar de ter sido relatada a presença de autofagia em tomateiro em resposta a *S. sclerotiorum*, não há nenhum relato de que o ABA possa promover a autofagia (Kabbage et al., 2013). Em alguns casos, o próprio cloroplasto, que é um sítio de produção de EROs, pode ser direcionado para a degradação autofágica da organela inteira e/ou fragmentada, em um processo denominado como clorofagia, impedindo a ocorrência de HR na célula e em células adjacentes saudáveis (Kabbage et al., 2013). Na análise de proteômica, na interação de ‘MT’ com *S. sclerotiorum* foi observada indução de genes associados a patogênese, sugerindo que o ABA além de atuar na degradação de proteína e organelas danificadas pela autofagia, este pode induzir as proteínas de resistência na defesa em ‘MT’ contra *S. sclerotiorum*.

Assim, de acordo com o transcriptoma de ‘MT’ analisado neste trabalho foram encontrados genes marcadores de processos autofágicos induzidos em resposta a inoculação por *S. sclerotiorum*, podendo indicar uma provável participação de processos autofágicos na resistência a *S. sclerotiorum* nesse genótipo, restringindo ou atrasando o crescimento desse fungo. Isso porque,

um papel da autofagia como um mecanismo "anti-morte" é contribuir para a contenção da morte celular programada associado à imunidade (HR), possivelmente através da degradação de sinais celulares promotores da morte, como por exemplo o cloroplasto, sítio primário de produção de EROs (Kroemer; Levine, 2008).

Já na interação com *O. neolycopersici*, a redução nos níveis de ABA, resulta em elevados níveis de SA, que provavelmente induz a uma forte e rápida morte celular programada por HR. Essa HR pode ser desencadeada pelo reconhecimento de efetores por genes *R* do tipo NBS-LRR, que foram encontrados induzidos na interação *sitiens-O. neolycopersici*. Já baseado no perfil protéico, foi identificada uma endoquitinase básica de 30 kDa que pode estar associada a resistência a *O. neolycopersici*. Geralmente, a resistência a patógenos biotróficos é resultado da sinalização por um gene *R* quando reconhece o efector do patógeno. Assim, essa proteína pode ser de extrema importância na defesa a *O. neolycopersici*.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes dos genótipos ‘MT’ e *sitiens* foram semeadas em vasos de 250 mL contendo substrato PlantMax HT + vermiculita expandida (1:1) e mantidas em estufa até um dia anterior a inoculação. Plantas com aproximadamente 21 dias de germinação foram transferidas um dia antes da inoculação para câmara de crescimento, mantida a 23°C, 50% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 h luz e intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* foram mantidas em câmara úmida por 24 h antes e durante todo o experimento, enquanto que plantas inoculadas com *O. neolycopersici* não foram submetidas a câmara úmida. A inoculação de *S. sclerotiorum* foi realizada por meio da deposição do escleródio, germinado previamente em meio BDA, no folíolo terminal da terceira ou quarta folha verdadeira. Já a inoculação com *O. neolycopersici* foi realizada em discos foliares de 6 mm de diâmetro, contendo micélio e conidióforos que foram friccionados sobre o folíolo terminal sadio da terceira ou quarta folha verdadeira.

. As plantas de ‘MT’ e *sitiens* inoculadas e controles foram coletadas nos períodos de 0, 6, 9, 12, 24, 48 horas após a inoculação (HAI) com *S. sclerotiorum* e 0, 6, 9, 12, 24, 48 e 168 HAI com *O. neolycopersici*. Com base na análise prévia de expressão diferencial de genes relacionados à defesa realizada em todos os períodos, foi verificado que nos tempos de 24 HAI com *S. sclerotiorum* e 168 HAI com *O. neolycopersici* houve uma expressão diferencial desses genes, indicando uma possível alteração no transcriptoma nesses períodos. Assim, esses tempos foram utilizados para o sequenciamento do RNA. Vinte e quatro amostras foram utilizadas para a análise do perfil transcricional e proteômico, sendo cada tratamento composto por três repetições, sendo doze amostras do genótipo ‘MT’ e doze do genótipo *sitiens*. Dentro de cada genótipo, três amostras são correspondentes a plantas inoculadas com *S. sclerotiorum* após 24 HAI e três são correspondentes a plantas inoculadas com *O. neolycopersici* após 168 HAI, as outras seis amostras são controles não inoculados de cada tratamento inoculado. Cada patógeno teve seu controle, pois o fungo *S. sclerotiorum* necessita de elevada umidade para se desenvolver, portanto o controle foi feito com plantas em câmara úmida. Já o fungo *O. neolycopersici* necessita de ambiente mais seco, portanto o controle foi realizado sem câmara úmida.

Preparo de bibliotecas e sequenciamento do RNA

O RNA total foi extraído dos folíolos de tomateiros controles ou inoculado utilizando Trizol (Invitrogen). Assim, aproximadamente 100 mg de tecido vegetal macerado foi transferido para um tubo de centrifuga de 2 mL, e adicionado 1 mL de Trizol e vortexado. Após a homogeneização, foi feita uma incubação de 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 9.000 *g* por 15 min a 4°C. Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, sendo adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após 5 min em temperatura ambiente, foi realizada uma nova centrifugação a 9.000 *g* por 15 min a 4°C. A fase superior foi coletada para um novo microtubo, e foram adicionados 500 µL de isopropanol. Em seguida, foi feita uma incubação de 10 min e centrifugação a 9.000 *g* por 10 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 75% e centrifugado 9000 *g* por seis min a 4°C, e posteriormente ressuscitado em 20 µL de água DEPC e armazenados a -80 °C.

O sequenciamento foi realizado na *High Throughput Sequencing Facility*, na Universidade da Carolina do Norte, em Chapel Hill (EUA), em parceria com o Dr. Piotr Mieczkowski, Professor Associado e Diretor da Facility. As amostras de RNA foram avaliadas quanto a sua qualidade e integridade em RNA Chip no LabChip GX/GXII (Perkin Elmer, Reino Unido) de acordo com o protocolo do kit HT RNA LabChip (Caliper, EUA). Foram construídas bibliotecas de cDNA a partir de 1000 ng de RNA de cada amostra. Foi utilizado o kit KAPA *Stranded RNA-Seq Library Preparation* da KAPA Biosystems (cidade, país), conforme recomendações do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas em single read de 50 pb em uma lane da *flow cell* no sequenciador HiSeq 4000. Foi gerado aproximadamente 6,5 milhões de reads para cada amostra, totalizando 158 milhões de reads em 24 amostras.

Análise das sequências do RNA-Seq de ‘MT’ e do mutante *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici*

A qualidade das sequências foi avaliada usando a ferramenta FastQC (Patel; Jain, 2012). Os resultados das análises do FastQC foram visualizados em arquivos no formato HTML. Após a análise de qualidade, foi feita a remoção de 12 pb à esquerda das sequências das 24 bibliotecas com o programa PRINSEQ (Schmieder; Edwards, 2011). Após a análise e da remoção de sequências ruins foi feita a remoção dos adaptadores Illumina, utilizados para ancoragem dos primers de sequenciamento. As sequências dos adaptadores foram eliminadas com o CUTADAPT (Martin, 2011). Os *reads* trimados foram então mapeados contra os genomas dos

fragmentos do ribossomo de tomateiro para retirada dos *reads* que mapearam nestas sequências (contaminantes não poli-adenilados) com o programa sortmeRNA (Kopylova, 2012). Os *reads* filtrados de cada uma das bibliotecas foram mapeados contra o genoma de referência do tomateiro ITAG2.4 (The Tomato Genome Consortium, 2012) utilizando o programa TopHat2 (Kim et al., 2013). Após a etapa de alinhamento dos *reads*, o programa featureCounts (Liao; Smyth; Shi, 2014) foi utilizado para obtenção dos valores de *read counts*, que representam o número de *reads* que foram mapeados em um gene. *Reads* que apresentaram mais de uma opção de melhor alinhamento não foram considerados nas análises.

Genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando-se um modelo generalizado linear (glm, *Generalized Linear Model*) implementado no pacote edgeR do ambiente estatístico R (<http://www.r-project.org/>). O método de Benjamin & Hochberg foi aplicado para a correção dos *p*-values após a execução de múltiplos testes (Benjamini; Hochberg, 1995). Genes apresentando FDR (*False Discovery Rate*) inferior a 0,05 (5%) e *fold-change* igual a superior a 2 foram considerados diferencialmente expressos.

Por meio do pacote goseq (Young et al., 2010) foram realizadas análises de enriquecimento funcional para os transcritos diferencialmente expressos, com correção para viés de tamanho utilizando um arquivo contendo o identificador do gene e os termos GO associados a cada um deles, além da descrição da função de cada transcrito. Foram considerados os termos sobre-representados com valor-*p* ajustado para FDR igual ou inferior a 10 %.

Análise do perfil de protéico de ‘MT’ e do mutante *sitiens* inoculados com *S. sclerotiorum* e *O. neolycopersici*

Cerca de 100 mg de material fresco de tecidos não inoculados e inoculados foram transferidos para um tubo de centrífuga e adicionado tampão de extração [0,5 M Tris-HCl pH 7,5 contendo 0,05 M EDTA, 0,1 M KCl, 0,7 M sacarose, 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 2 % β -Mercaptoetanol e 1% PVPP (poly(polyvinylpirrolidone)) e vortexado. Em seguida, as amostras foram mantidas em agitação no gelo por 30 min. Foi adicionado 800 μ L fenol em cada tubo, vortexado e mantido sob agitação no gelo por 30 min. As amostras foram centrifugadas por 30 min a 10.000 *g* a 4° C (Eppendorf 5415D, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e adicionado 1,2 mL do tampão de extração juntamente com cerca de 50 mg de PVPP e vortexado novamente. As amostras foram mantidas sob agitação em gelo por 30 min e centrifugadas por 30 min a 10.000 *g* a 4° C. Essa etapa foi repetida por mais duas vezes, omitindo a adição de PVPP. O sobrenadante foi então coletado em

um novo tubo e adicionado solução de precipitação (0,1 M acetato de amônio em 100% metanol) e mantidas nessa solução por 12 h a 10 °C. As amostras foram então centrifugadas no tampão de precipitação por 30 min a 16.000 g a 4° C. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo, onde foi adicionado tampão de precipitação e mantido na geladeira por 2 h. As amostras foram centrifugadas novamente por 30 min a 16.000 g a 4 °C e este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. Em seguida, foi adicionada 1,2 mL de 100% acetona gelada e mantida por 2 h a 10 °C. As amostras foram então centrifugadas por mais 30 min a 16.000 g a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* permaneceram secando em um frasco fechado com sílica, na geladeira, por 12 h.

Aos *pellets* foi então adicionado tampão de solubilização (7 M uréia, 2 M tiouréia, 10 mM DTT- dithiothreitol). As amostras foram vortexadas, seguido de raspagem do *pellet* e mantidas no gelo, sob agitação, por cerca de 3 h e vortexadas por 1 min a cada hora. Após as 3 h sob agitação, as amostras foram vortexadas e centrifugadas por 30 min a 16.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em ultrafreezer -80°C.

A determinação de proteínas solúveis foi realizada de acordo com Bradford (1976). Em alíquotas de 5 µL de extrato protéico foi adicionado 2,5 mL do reagente de Bradford. Os tubos então foram homogeneizados e permaneceram por 15 min a temperatura ambiente até serem lidas em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences, Inglaterra) a 595 nm. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado com base em curva padrão, utilizando BSA (*bovine serum albumin*).

Para visualização da qualidade das proteínas extraídas, foi realizado uma eletroforese em gel SDS-PAGE com cerca de 6 µg do extrato protéico bruto. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com o 0,025% Comassie brilliant blue R-250, em 10% ácido acético e 40 % metanol, durante 2 h. Em seguida, os géis foram descorados em 7% ácido acético e 40 % metanol.

As análises de proteômica a seguir foram conduzidas no laboratório de espectrometria de massas, LNBio, CNPEM em colaboração com a Prof^a. Adriana Franco Paes Leme. Na etapa de redução foi adicionado as amostras, 0,3 µL de 0,5 M de DTT e incubado durante 25 min a 56 °C. Em seguida, 0,85 µL de 0,5 M de iodoacetamida (IAA) foi adicionada para alquilação, seguido de uma incubação a temperatura ambiente protegido da luz. Para realizar o *quench* da IAA livre, foi adicionado 0,3 µL de 0,5 M de DTT com incubação de 15 min a temperatura ambiente protegido da luz. Em seguida, as amostras foram diluídas cinco vezes em bicarbonato de sódio para reduzir a concentração de uréia para 1,6 M com posterior adição de 1,57 µL de 0,1 M CaCl₂. A digestão foi conduzida adicionando 0,2 µg de tripsina com posterior incubação durante 16 h a 37 °C. A

reação da enzima foi paralisada adicionando ácido fórmico na concentração final de 1 % com posterior centrifugação a 2.500 *g* por 10 min em temperatura ambiente e descarte do *pellet*.

A dessalinização foi realizada com *stage tips* C18 (EMPORE - 3M). As *stage tips* foram condicionadas com 100 μ L de 100 % metanol e equilibrada com 200 μ L de 0,1% ácido fórmico. As amostras foram carregadas na coluna por duas vezes e foi realizada a lavagem por 10 vezes com 100 μ L de 0,1 % ácido fórmico. A eluição dos peptídeos foi conduzida com a adição de 100 μ L de 80 % acetonitrila em 0,1 % ácido fórmico. As amostras foram secas em speed vac SC250EXP-220 (Thermo Scientific, cidade, EUA) com posterior ressuspensão em 22,5 μ L de 0,1 % ácido fórmico.

Os peptídeos foram analisados em um ETD acoplado a um espectrômetro de massas Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) conectado a um cromatógrafo líquido (LC-MS/MS) por um sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystems, cidade, EUA) através de uma fonte de ionização *nanoelectrospray* Proxeon. Peptídeos foram separados em um gradiente de acetonitrila 2–90% em 0,1% ácido fórmico usando uma pré-coluna EASY-Column (2 cm x *id* 100 μ m, 5 μ m tamanho da partícula) e uma coluna analítica EASY-Column (10 cm x *id* 75 μ m, 3 μ m tamanho da partícula) a uma taxa de fluxo de 300 nl/min por 20 min. Listas de picos (msf) foram geradas usando MASCOT (Matrix Science, Boston, MA, EUA) e as sequências foram comparadas contra o banco de dados para o tomateiro. Para quantificação de proteínas, os arquivos no formato .dat foram analisados no Scaffold Q+ (Proteome Software, Inc., Portland, OR, EUA) e os valores quantitativos (*normalized spectral counts*) foram obtidos com um FDR menor do que 1%. Diferença estatística na expressão diferencial de proteínas comum ao controle ‘MT’ não inoculado e tratamento foi determinada usando o teste *t* de Student. Somente proteínas com valores quantitativos com *p*-value < 0.05 foram consideradas nos resultados. Todas as proteínas diferencialmente expressas foram incluídas nas tabelas do material suplementar.

REFERÊNCIAS

- Achuo EA, Prinsen E, Höfte M (2006) Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology*, 55(2): 178-186.
- Adams D O, Yang S F (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1): 170-174.
- Aleman F, Yazaki J, Lee M, Takahashi Y, Kim AY, Li Z, Schroeder JI (2016) An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 Transcription Factor: A putative link of ABA and JA signaling. *Scientific Reports*, 6.
- Al-Masri MI, Ali-Shtayeh MS, Elad Y, Sharon A, Tudzynski P, Barakat R (2002) Effect of plant growth regulators on white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) on bean and cucumber. *Journal of Phytopathology*, 150(8-9): 481-487.
- Al-Masri MI, Elad Y, Sharon A, Barakat R (2006) Ethylene production by *Sclerotinia sclerotiorum* and influence of exogenously applied hormone and its inhibitor aminoethoxyvinylglycine on white mold. *Crop Protection*, 25(4): 356-361.
- Alvarez ME (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. In *Programmed Cell Death in Higher Plants*, 185-198. Springer Netherlands.
- Asselbergh B, Curvers K, França SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F, Höfte M (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in *siliens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology*, 144(4): 1863-1877.
- Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Höfte M (2008) Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 709–719
- Audenaert K, De Meyer GB, Höfte MM (2002) Absciscic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology*, 128(2): 491-501.
- Balsinde J (2002) Roles of various phospholipases A2 in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling. *Biochemical Journal*, 364(3): 695-702.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy*, 2(1): 2-11.
- Bate NJ, Orr J, Ni W, Meromi A, Nadler-Hassar T, Doerner PW, Elkind Y (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16): 7608-761.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Birkenbihl RP, Diezel C, Somssich IE (2012) Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiology*, 159(1): 266-285.
- Blee E (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, 7(7): 315-322.
- Blee E, Schubert F (1992) Occurrence of fatty acid epoxide hydrolases in soybean (*Glycine max*). Purification and characterization of the soluble form. *Biochemical Journal*, 282(Pt 3):711–4.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, 15(7): 713.

- Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Cai R, Zhao Y, Wang Y, Lin Y, Peng X, Li Q, Cheng B (2014) Overexpression of a maize WRKY58 gene enhances drought and salt tolerance in transgenic rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 119(3): 565-577.
- Casaretto JA, Zúñiga GE, Corcuera LJ (2004) Abscissic acid and jasmonic acid affect proteinase inhibitor activities in barley leaves. *Journal of Plant Physiology*, 161(4): 389-396.
- Chandra S, Heinsteins PF, Low PS (1996) Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiology*, 110(3): 979-986.
- Chapman KD (1998) Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Science*, 3(11): 419-426.
- Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *The Plant Cell*, 14(5): 1093-1107.
- Colditz F, Nyamsuren O, Niehaus K, Eubel H, Braun H P, Krajinski F (2004) Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Molecular Biology*, 55(1): 109-120.
- Coll NS, Epple P, Dangl JL (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differentiation*, 18:1247-56.
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu JL, Schulze-Lefert P (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, 425(6961): 973-977.
- Constabel C P, Brisson N (1992) The defense-related STH-2 gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentrations of *Phytophthora infestans* zoospores. *Planta*, 188(3): 289-295.
- Côté F, Hahn M G (1994) Oligosaccharins: structures and signal transduction. In *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants*, 26: 143-175.
- Craig A, Ewan R, Mesmar J, Gudipati V, Sadanandom A (2009) E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, 60(4): 1123-1132.
- Cutt J R, Harpster M H, Dixon D C, Carr J P, Dunsmuir P, Klessig D F (1989) Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology*, 173(1): 89-97.
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839): 826.
- Danhash N, Wagemakers C A, Van Kan J A, de Wit P J (1993) Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Molecular Biology*, 22(6): 1017-1029.
- De Torres-Zabala M, Bennett MH, Truman WH, Grant MR (2009) Antagonism between salicylic acid and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *The Plant Journal*, 59: 375-386.
- Denison F C, Paul A L, Zupanska A K, Ferl R J (2011) 14-3-3 proteins in plant physiology. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 22 (7): 720-727.
- Ding ZJ, Yan JY, Li GX, Wu ZC, Zhang SQ, Zheng SJ (2014) WRKY41 controls Arabidopsis seed dormancy via direct regulation of ABI3 transcript levels not downstream of ABA. *The Plant Journal*, 79(5): 810-823.
- Dreher K, Callis J (2007) Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annals of Botany*, 99(5): 787-822.

- El-Hadary M H, Tayel A A (2013) Differential expression of tomato chitinases upon *Alternaria solani* inoculation with special reference to a modified purification zymogram. *Egypt. J. Exp. Biol. Bot.*, 9(1): 9-17.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5(5): 199-206.
- Fan J, Hill L, Crooks C, Doerner P, Lamb C (2009) Absciscic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology*, 150: 1750–1761
- Fang J, Chai C, Qian Q, Li C, Tang J, Sun L, Zhang Y (2008) Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to pre-harvest sprouting and photo-oxidation in rice. *The Plant Journal*, 54(2): 177-189.
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1): 275-297.
- Flor HH. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1): 275-296.
- Froehlich JE, Itoh A, Howe GA (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology*, 125(1): 306-317.
- Gao QM, Venugopal S, Navarre D, Kachroo A (2011) Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. *Plant Physiology*, 155(1): 464-476.
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 43: 205-227.
- Guo X, Stotz HU (2007) Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1384-1395.
- Han S, Wang Y, Zheng X, Jia Q, Zhao J, Bai F, Liu Y (2015) Cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with ATG3 to negatively regulate autophagy and immunity in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 27(4): 1316-1331.
- Hara-Nishimura I, Shimada T, Hatano K, Takeuchi Y, Nishimura M (1998) Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *The Plant Cell*, 10(5): 825-836.
- Herman E, Schmidt M (2004) Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiology*, 136(3): 3440-3446.
- Higashi K, Ishiga Y, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y (2008) Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 279: 303–312.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5): 462-468.
- Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NH, Mattsson O, Petersen M (2009) Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell*, 137(4): 773-783.
- Ichimura Y, Imamura Y, Emoto K, Umeda M, Noda T, Ohsumi Y (2004) In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39): 40584-40592.
- Ishida H, Wada S (2009) Autophagy of whole and partial chloroplasts in individually darkened leaves: a unique system in plants? *Autophagy*, 5(5): 736-737.
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Mae T (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant physiology*, 148(1): 142-155.

- Jaskiewicz M, Conrath U, Peterhänsel C (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO reports*, 12(1): 50-55.
- Jiang CJ, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Yazawa K, Yoshida R, Takatsuji H (2010) Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice–*Magnaporthe grisea* interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(6): 791-798.
- Jiang Y, Liang G, Yu D (2012) Activated expression of WRKY57 confers drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 5(6): 1375-1388.
- Jiang Y, Yu D (2016) The WRKY57 transcription factor affects the expression of jasmonate ZIM-domain genes transcriptionally to compromise *Botrytis cinerea* resistance. *Plant Physiology*, 171(4): 2771-2782.
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T (2006) The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18: 3289–3302.
- Kabbage M, Williams B, Dickman MB (2013) Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens*, 9(4): e1003287.
- Kachroo A, Kachroo P (2009) Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 153-176.
- Kagan VE (1989) Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 570(1): 121-135.
- Kagan VE, Serbinova, EA, Packer L (1990) Generation and recycling of radicals from phenolic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280:33–39.
- Kessler A, Halitschke R, Baldwin IT (2004) Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science*, 305:665–8.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4): R36.
- Klionsky DJ, Ohsumi Y (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1): 1-32.
- Koga H, Dohi K, Mori M (2004) Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65: 3–9
- Kopylova E, Noé L, Touzet H (2012) SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24): 3211-3217.
- Kourtis N, Tavernarakis N (2009) Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death and Differentiation*, 16(1): 21.
- Kroemer G, Levine B (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12): 1004-1010.
- Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C, Kitahata N (2014) OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice post meiotic anther development. *Autophagy*, 10(5): 878-888.
- La Camera S, L'Haridon F, Astier J, Zander M, Abou-Mansour E, Page G, Lamotte O (2011) The glutaredoxin ATGRXS13 is required to facilitate *Botrytis cinerea* infection of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, 68(3): 507-519.
- Lacroix B, Citovsky V (2013) A mutation in negative regulator of basal resistance WRKY17 of *Arabidopsis* increases susceptibility to *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *F1000Research*, 2.
- Legendre JY, Supersaxo A (1995) Short-chain phospholipids enhance amphipathic peptide-mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217(1): 179-185.

- Li J, Wu J (2016) Scopolin, a glycoside form of the phytoalexin scopoletin, is likely involved in the resistance of *Nicotiana attenuata* against *Alternaria alternata*. *Journal of Plant Pathology*, 98 (3).
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2013) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7): 923-930.
- Liu L, Zhang Z, Dong J, Wang T (2016) Overexpression of MtWRKY76 increases both salt and drought tolerance in *Medicago truncatula*. *Environmental and Experimental Botany*, 123: 50-58.
- Liu Q, Liu Y, Tang Y, Chen J, Ding W (2017) Overexpression of NtWRKY50 increases resistance to *Ralstonia solanacearum* and alters salicylic acid and jasmonic acid production in tobacco. *Frontiers in Plant Science*, 8:1710.
- Liu S, Kracher B, Ziegler J, Birkenbihl RP, Somssich IE (2015) Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards *Botrytis cinerea*. *Elife*, 4, e07295.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K., Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121(4): 567-577.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15(1): 165-178.
- Low PS, Merida JR (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiologia Plantarum*, 96(3): 533-542.
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 17(1):10.
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell*, 8(2): 203-212.
- Mauch-Mani, B.; Mauch, F. (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4): 409-414.
- McGee J D, Hamer J E, Hodges T K (2001) Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(7): 877-886.
- McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7(4): 212.
- Meijer WH, van der Klei IJ, Veenhuis M, Kiel JA (2007) ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy*, 3(2): 106-116.
- Milosevic N, Slusarenko AJ (1996) Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(3); 143-158.
- Mohr PG, Cahill DM (2003) Absciscic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biology*, 30: 461-469
- Moura DS, Ryan CA (2001) Wound-inducible proteinase inhibitors in pepper. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 126(1): 289-298.
- Mueller M J (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 100(3): 653-663.
- Mur LA, Naylor G, Warner SA, Sugars JM, White RF, Draper J (1996) Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *The Plant Journal*, 9(4): 559-571.

- Ndamukong I, Abdallat A A, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C (2007) SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *The Plant Journal*, 50(1): 128-139.
- Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Mosinger E (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*). *Plant Physiology*, 108(1): 17-27.
- Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F (2010) Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS letters*, 584(7): 1379-1385.
- Noutoshi Y, Kuromori T, Wada T, Hirayama T, Kamiya A, Imura Y, Yasuda M, Nakashita H, Shirasu Ken, Shinozaki K (2006) Loss of *necrotic spotted lesions 1* associates with cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 62(1-2), 29-42.
- Nováková M, Šásek V, Dobrev PI, Valentová O, Burketová L (2014) Plant hormones in defense response of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum*—Reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. *Plant Physiology and Biochemistry* 80:308-317.
- O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ (2001) Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *The Plant Journal*, 25: 315–323.
- Pajerowska-Mukhtar K, Dong X (2009) A kiss of death—proteasome-mediated membrane fusion and programmed cell death in plant defense against bacterial infection. *Genes & Development*, 23(21): 2449-2454.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33): 24131-24145.
- Patel RK, Jain M (2012) NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PloS One*, 7(2) e30619.
- Patel S, Dinesh-Kumar, SP (2008) Arabidopsis *ATG6* is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*, 4(1): 20-27.
- Peng X, Hu Y, Tang X, Zhou P, Deng X, Wang H, Guo Z (2012) Constitutive expression of rice WRKY30 gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Planta*, 236(5): 1485-1498.
- Percepied L, Balagué C, Riou C, Claudel-Renard C, Rivière N, Grezes-Besset B, Roby D (2010) Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7): 846-860.
- Porta H, Rocha-Sosa M (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130(1): 15-21.
- Prats E, Bazzalo M E, León A, Jorrín J V (2006) Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. *Euphytica*, 147(3): 451-460.
- Pressey R (1997) Two isoforms of NP24: a thaumatin-like protein in tomato fruit. *Phytochemistry*, 44(7): 1241-1245.
- Qin Q, Bergmann C W, Rose J K, Saladie M, Kolli V S, Albersheim P, York W S (2003) Characterization of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. *The Plant Journal*, 34(3): 327-338.
- Roberts M R, Bowles D J (1999) Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiology*, 119(4): 1243-1250.
- Roy S, Pouénat ML, Caumont C, Cariven C, Prévost MC, Esquerré-Tugayé MT (1995) Phospholipase activity and phospholipid patterns in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Science*, 107(1): 17-25.

- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5): 247-258.
- Sawitzki B, Lehmann M, Vogt K, Risch K, Brock J, Kupiec-Weglinski JW, Volk HD (2002) Bag-1 up-regulation in anti-CD4 mAb treated allo-activated T cells confers resistance to apoptosis. *European Journal of Immunology*, 32(3): 800-809.
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864.
- Seifi HS, Curvers K, Vleeschauwer D, Delaere I, Aziz A, Höfte M (2013) 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*, 199(2): 490-504.
- Shen HM, Mizushima N (2014) At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends in biochemical sciences*, 39(2): 61-71.
- Shibuya N, Minami E (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5): 223-233.
- Sivakumaran A, Akinyemi A, Mandon J, Cristescu SM, Hall MA, Harren FJ, Mur LA (2016) ABA suppresses *Botrytis cinerea* elicited NO production in tomato to influence H₂O₂ generation and increase host susceptibility. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 555-590.
- Smet I, Zhang H, Inze D, Beeckman T (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science*, 11(9): 434-439.
- Spanu PD, Panstruga R (2017) Biotrophic Plant-Microbe Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 192.
- Stapleton A, Beetham JK, Pinot F, Garbarino JE, Rockhold DR, Friedman M, Belknap WR (1994) Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from potato. *The Plant Journal*, 6(2): 251-258.
- Sun XC, Gao YF, Li HR, Yang SZ, Liu YS (2015). Over-expression of SlWRKY39 leads to enhanced resistance to multiple stress factors in tomato. *Journal of Plant Biology*, 58(1), 52-60.
- Surpin M, Zheng H, Morita MT, Saito C, Avila E, Blakeslee JJ, Tasaka M (2003) The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. *The Plant Cell*, 15(12): 2885-2899.
- Surplus SL, Jordan BR, Murphy AM, Carr JP, Thomas B, Mackerness SH (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant, Cell & Environment*, 21(7): 685-694.
- Takahama U, Yoshitama K (1998) Hydroxycinnamic acid esters enhance peroxidase-dependent oxidation of 3, 4-dihydroxyphenylalanine. Differences in the enhancement among the esters. *Journal of Plant Research*, 111(1): 97-100.
- Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Milian JA, Reed JC (1995) Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 80(2): 279-284.
- Taylor IB, Linfoth RST, Al-Naieb RJ, Bowman WR, Marples BA (1988) The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant, Cell & Environment*, 11(8): 739-745.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Tierens KFM-J, Broekaert WF (1999) Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 121: 1093–1101
- Thompson AR, Vierstra RD (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 165–173.

- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD (2005) Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant physiology*, 138(4): 2097-2110.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11(6): 1187-1194.
- Tornero P, Gadea J, Conejero V, Vera P (1997) Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(5): 624-634.
- Tuteja N (2007). Absciscic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 2(3): 135-138.
- Van der Does D, Leon-Reyes A, Koornneef A, Van Verk MC, Rodenburg N, Pauwels L, Goossens A, Körbes AP, Memelink J, Ritsema T, Van Wees SCM, Pieterse CMJ, Van Wees SC (2013) Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *The Plant Cell*, 25(2): 744-761.
- Van Loon L C, Van Strien E A (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2): 85-97.
- Verma DPS, Hong Z (2001) Plant callose synthase complexes. *Plant Molecular Biology*, 47(6): 693-701.
- von Mollard GF, Stevens TH (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Molecular Biology of the Cell*, 10(6): 1719-1732.
- Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology*, 149(2): 885-893.
- Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 14(1): S131-S151.
- Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC (2007) Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 143(1): 291-299.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 781–803
- Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, Ohsumi Y, Shirasu, K. (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(9): 2914-2927.
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11(2): R14.
- Zander M, Chen S, Imkampe J, Thurow C, Gatz C (2012) Repression of the *Arabidopsis thaliana* jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by TGA-interacting glutaredoxins depends on their C-terminal ALWL motif. *Molecular Plant*, 5(4): 831-840.
- Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T (2006) *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, 48: 592–605.
- Zhu J, Gong Z, Zhang C, Song CP, Damsz B, Inan G, Bressan RA (2002) OSM1/SYP61: A syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *The Plant Cell*, 14(12): 3009-3028.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Proteínas diferencialmente expressas em folhas de tomateiro ‘MT’ inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em 24 HAI.

Nº	Número de acesso	Identificação	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>
1	CUX90931.1 [3]	Cluster of carbonic anhydrase	-0,205	0,039
2	K4BW79.1	2-methylene-furan-3-one reductase	-0,6	0,020
3	NP_001233812.2 [2]	Cluster of lipoxygenase	-0,85	0,019
4	NP_001234807.1	Beta-tubulin	-0,85	0,020
5	NP_001234347.1	Copperchaperone	-0,5708	0,029
6	XP_010322950.1	Pyruvate, phosphatedikinase, chloroplastic	-1	<0,00010
7	NP_001234524.1	Uncharacterizedprotein LOC543930	-1,33	0,0083
8	NP_001316317.1	50Sribossomalprotein L27	-1	<0,00010
9	XP_010313195.1	PREDICTED: 60S ribossomal protein L18-2-like	-1	<0,00010
10	XP_010320189.1	PREDICTED: 28 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic	-1	<0,00010
11	NP_001234272.1(+1)	14-3-3 protein9	1,66	0,030
12	NP_001234637.1 (+1)	14-3-3 protein7	1	0,00013
13	NP_001233951.2 [3]	Cytosolic NADP-malicenzyme	1	0,031
14	XP_004251517.2	PREDICTED: aconitatehydratase, cytoplasmic	4	0,0028
15	NP_001275580.1	Pathogenesis-related protein STH-2-like	9,09	0,017

16	ACB69759.1	Hydroxypyruvate reductase, partial	3,54	0,017
17	NP_001234024.2 (+1)	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	9,10	0,017
18	NP_001234092.1	Sorbitol related enzyme	1,66	0,033
19	XP_010313308.1	PREDICTED: 50S ribosomal protein L9, chloroplastic	1	0,00013
20	NP_001310489.1	Glutaredoxin	1,33	0,0080
21	AAL99550.1 (+2)	Beta-fructofuranosidase TAI 20-19, partial	1,33	0,037

Tabela S2. Proteínas diferencialmente expressas em folhas de tomateiro ‘MT’ inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em 48 HAI.

Nº	Número de acesso	Identificação	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>
1	AJO25120.1 [4]	Cluster of ribulose1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	-0,307	0,010
2	XP_010316580.1	PREDICTED: aminomethyltransferase, mitochondrial	-0,477	0,045
3	NP_001310598.1 (+1)	Glutamine synthetase	-0,650	0,010
4	P27522.1	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic/LHCI type III	-0,5	0,0071
5	AJO25118.1(+2)	ATP synthase CF1 epsilon subunit, chloroplastic	-0,473	0,030
6	O65819.1	HistoneH2B.3	-0,333	0,0099
7	NP_001296970.1	Protochlorophyllidreductase	-1,66	0,013
8	NP_001308625.1	SWIB_MDM2 domain protein precursor	-0,801	0,047
9	NP_01234587.1	Ran binding protein-1	-1	0,00011
10	NP_001310974.1	50S ribosomal protein L13, chloroplastic	-1	0,00011
11	NP_001266156.1	Argonaute 4 ^a	-1	0,00011
12	NP_001315477.1 (+1)	40Sribossomalprotein AS isozyme 1	-1	0,00011
13	ALA48969.1 (+1)	S-phase kinase-associated protein 1	-1	0,00011
14	NP_001234805.1(+2)	Glucan endo-1,3-beta-glucosidaseB precursor	1,46	0,0021
15	NP_001234528.1	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 3	0,8	0,014
16	NP_001275580.1	Pathogenesis-related protein STH-2-like	1	0,029
17	NP_001234012.2	Adenosylhomocysteinase	0,602	0,019
18	NP_001234358.1	PR1 protein precursor	6,06	0,0095

19	NP_001234249.2	Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor	3,66	<0,00010
20	XP_010323179.1	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform X1	5,06	0,044
21	NP_001308301.1	Fructose-1,6-biphosphate aldolase	1,5	0,032
22	NP_001234024.2 [6]	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	2,33	0,041
23	NP_001315561.1	Scopoletin glucosyltransferase	2	<0,00010
24	XP_010318492.1	PREDICTED: threonine synthase, chloroplastic	3,03	0,044
25	NP_001266267.1	Phosphate carrier protein, mitochondrial-like	2,03	0,042
26	NP_001234404.1 (+1)	Acidic 26 kDa endochitinase precursor	2,33	0,019
27	NP_001307321.1	Miraculin precursor	1	<0,00010
28	NP_001234128.2 (+1)	Pathogenesis-related protein 1A1 precursor	2,33	0,0026
29	NP_001278837.1	RNA-binding protein 8A-like	2,03	0,042

Tabela S3. Proteínas diferencialmente expressas em folhas de tomateiro ‘MT’ inoculadas com *Oidium* *sp.* em 168 HAI.

Nº	Número de acesso	Identificação	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>
1	NP_001234690.2	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloroplastic	-0,769	0,012
2	NP_001234080.1(+1)	Enolase	-0,801	0,0040
3	NP_001233857.2	Pectinesterase/pectinesteraseinhibitor U1 precursor	-0,5	0,035
4	NP_001233789.2(+1)	Iron superoxide dismutase isoform 2	-1,66	0,013
5	NP_001234224.2	Dehydroascorbate reductase	-0,5	0,0027
6	AJO25129.1(+2)	Photosystem II cytochrome b559 alpha subunit (chloroplast)	-1,33	0,017
7	NP_001266231.2	Glycine-rich RNA-binding protein-like	-1,33	0,017
8	NP_001234032.2(+1)	Chlorophyll a-b binding protein 6A, chloroplastic	-1,33	0,017
9	AJY79052.1 (+1)	Cytochrome b6 (chloroplast)	-1,33	0,017
10	AJO25125.1 (+2)	Cytochrome f (chloroplast)	0,886	0,034
11	NP_001234756.2	Oxoglutarate/malatetranslocator	4,04	0,011
12	NP_001234314.1 (+1)	Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor	10,11	0,017
13	NP_001275580.1	Pathogenesis-related protein STH-2-like	2,66	0,027
14	BAS69580.1 [5]	Protein NP24, partial	1,66	0,0033
15	AJO25092.1 (+2)	Ribosomal protein S16	2,03	0,039
16	XP_010325922.1	PREDICTED: cell division protein FtsZ homolog 2-1, chloroplastic-like	1	<0,00010
17	NP_001234620.2	Beta-mannosidase precursor	1	<0,00010
18	AMN10034.1(+1)	Non-specific lipid-transfer protein 2-like protein	2,02	0,039

19	NP_001234057.2	Glycine-rich protein isoform 1 precursor	2,02	0,039
----	----------------	--	------	-------

Tabela S4. Proteínas diferencialmente expressas em folhas do mutante de tomateiro *sitiens* inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em 24 HAI.

Nº	Número de acesso	Identificação	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>
1	AJO25120.1[5]	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast)	-0,2778	0,045
2	NP_001295872.1	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	-0,238	0,033
3	Q9THX6.1	Thylakoid luminal 29 kDa protein, chloroplastic	-0,437	0,032
4	AJQ21448.1	N2-acetylornithine deacetylase	-0,858	0,026
5	NP_001233812.2	Cluster of lipoxygenase	-2,33	0,0047
6	NP_001234696.2	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit	-0,835	0,033
7	NP_001234524.1	Uncharacterized protein LOC543930	-1,33	0,0086
8	NP_001234396.2	Fructokinase 3	-0,835	0,045
9	P27322.1[5]	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	1,631	0,0038
10	NP_001295218.1[5]	Cluster of uncharacterized protein LOC101249904	2	0,00075
11	NP_001234016.1	GTP-binding nuclear protein Ran1	1,66	0,044
12	XP_010323179.1	PREDICTED: NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,515	0,036
13	NP_001234418.1	Cluster of phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase2, chloroplastic	4,03	0,019

Tabela S5. Proteínas diferencialmente expressas em folhas do mutante de tomateiro *sitiens* inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em 48 HAI.

Nº	Número de acesso	Identificação	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>
1	AJO25120.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Chloroplast)	-0,436	0,0026
2	NP_001295872.1[7]	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small chain 1	-0,545	0,011
3	NP_001310598.1[3]	Cluster of glutamine synthetase	0,88	0,0036
4	P27522.1	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	-0,769	0,010
5	NP_001296324.1[4]	Chlorophyll a-b binding protein CP24, 10 A, chloroplastic	-0,75	0,025
6	XP_010323671.1	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH2, chloroplastic	-0,75	0,0067
7	NP_0011308141.1	Photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic-like	-0,777	0,0053
8	NP_001296992.1	Carbonic anhydrase 2 2	-0,751	0,017
9	NP_001238796.1	Alcohol dehydrogenase class III	-1,66	0,017
10	NP_001296970.1	Photochlorophyllide reductase	-1,66	0,014
11	XP_010322981.1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101262527	-1,66	0,039
12	NP_001315983.1	2-Cys peroxiredoxin 2	-0,801	0,036
13	ACB69759.1	Hydroxypyruvate reductase, partial	-1,33	0,018
14	NP_001293099.1	Cluster of stromal ascorbate peroxidase 7	-1,66	0,014
15	NP_001308625.1	SWIB_MDM2 domain protein precursor	-1,33	0,0041
16	XP_004249046.2	PREDICTED: ferredoxin	-1	0,0061
17	NP_001233834.1	Chloroplast-specific ribosomal protein	-1	0,0061
18	AES12482.1 (+2)	Putative histone 2 ^a protein, partial	-1,66	0,014

19	XP_004251321.2	PREDICTED: histone H2A isoform X2	-1,33	0,0041
20	XP_010323053.1	PREDICTED: probable histone H2A variant 1	-1,33	0,0041
21	NP_001234805.1 (+2)	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase B precursor	3,504	0,045
22	NP_001233951.2	Cluster of cytosolic NADP-malic enzyme	1,5	0,0070
23	NP_001234488.1(+1)	Peptidyl-prolylcis-transisomerase	1,879	0,0092
24	NP_001234615.1	Ethylene-responsive proteinase inhibitor1 precursor	10,09	0,0031
25	NP_001233850.2(+4)	Glutamatedehydrogenase	3,545	0,0062
26	NP_001234249.2	Xyloglucan-specificfungalendoglucanaseinhibitorprotein precursor	2,33	0,037
27	NP_001234418.1(+1)	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase2, chloroplastic	9,101	0,0066

Tabela S6. Proteínas diferencialmente expressas em folhas do mutante de tomateiro *sitiens* inoculadas com *Oidium* sp. em 168 HAI.

Nº	Número de acesso	Identificação	<i>Fold Change</i>	<i>P-value</i>
1	AJO25120.1[9]	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylate/oxygenase large subunit (chloroplast)	-0,242	0,0026
2	AJY79048.1 (+1)	Photosystem II CP47 Chlorophyll apoprotein (chloroplast)	-0,934	0,034
3	NP_001234080.1	Enolase	-0,875	0,0064
4	AJO25107.1(+2)	Photosystem II protein D2	-0,716	0,041
5	XP_010313887.1(+1)	PREDICTED:Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP37, chloroplastic isoform X1	-1	<0,00010
6	AJO25111.1	Photosystem I P700 apoprotein A2	-1,33	0,016
7	XP_010322825.1	PREDICTED: subtilisin-like protease	-1	0,0041
8	XP_010316057.1[2]	PREDICTED: serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	0,737	0,0090
9	NP_001234528.1	Photosystem II oxygen-evolving complex protein 3	1,57	0,016
10	NP_001234488.1(+1)	Peptidyl-prolylcis-transisomerase	0,729	0,034
11	NP_001234403.1(+1)	Basic 30 kDaendochitinase precursor	3	0,025
12	NP_001234402.2	Ripeng regulated protein DDTFR10	2,53	0,050

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que o ABA pode atuar na regulação da defesa aos patógenos necrotrófico *S. sclerotiorum* e ao biotrófico *O. neolycopersici* em tomateiro cv. ‘Micro-Tom’. As respostas observadas à infecção por ambos os patógenos foram contrastantes, sendo que o mutante *sitiens*, com reduzidos níveis de ABA, apresentou maior suscetibilidade a *S. sclerotiorum* e maior resistência a *O. neolycopersici*, quando comparado com o selvagem ‘MT’. Porém, a participação do ABA na regulação da defesa é parcial, pois elevados níveis de ABA resultantes da aplicação exógena de 100 μ M ABA em ‘MT’ (MT+ABA) e o uso do mutante *sp12*, com elevados níveis de ABA devido a superexpressão de um gene *NCED*, não modificou a resposta de defesa quando comparado com ‘MT’. Também foi verificado que nas interações de ‘MT’ com ambos os patógenos ocorrem um aumento dos níveis de ABA e a expressão de genes de sinalização por ABA é induzida. Esse aumento dos níveis de ABA ocorre, principalmente, devido a repressão dos genes de degradação de ABA, e não propriamente da indução de gene(s) envolvidos na biossíntese.

O aumento nos níveis de ABA parece permitir um fluxo contínuo da via de biossíntese de ABA em ‘MT’, enquanto que a mutação encontrada em *sitiens* interrompe a via de ABA, não produzindo ou produzindo quantidades menores desse hormônio. A interrupção da via de biossíntese de ABA em *sitiens* resulta em uma menor repressão da enzima violaxantina de-epoxidase (VDE), responsável pela conversão de violaxantina a zeaxantina, e que interage diretamente com o ciclo ascorbato-glutationa no cloroplasto. O aumento da atividade de VDE em *sitiens* induz a maior oxidação do ascorbato pela enzima, reduzindo a disponibilidade do ascorbato reduzido para a remoção de H_2O_2 apoplástico. Além disso, foi observado em *sitiens* a repressão de um gene de oxidase do ascorbato. Essa enzima se encontra no apoplasto e está diretamente ligada a mudança do estado redox e a remoção de EROs. *sitiens* também apresenta níveis elevados de H_2O_2 , principalmente no apoplasto, que parece induzir a morte celular programada, um importante mecanismo de defesa a patógenos. Assim, em ‘MT’ o conteúdo de ascorbato reduzido é diminuído e o conteúdo de ascorbato oxidado é aumentado, o que nos leva a sugerir que esse ascorbato poderia estar sendo transportado para o apoplasto para a remoção de H_2O_2 por meio de peroxidases e oxidases do ascorbato.

Já a glutathione não parece ser regulada diretamente pelo ciclo do ascorbato, pois os níveis de glutathione reduzida não se encontram correlacionados. Ou seja, os níveis reduzidos de ascorbato reduzido não necessariamente implicam em níveis reduzidos de glutathione reduzida. Assim, os níveis de glutathione parecem ser regulados na tradução das enzimas de biossíntese de

glutathione. Os menores níveis de glutathione reduzida foram encontrados em interações suscetíveis, sugerindo que houve uma oxidação desse antioxidante na tentativa de remoção de EROs.

Dessa forma, sugere-se que o ABA participa da regulação da defesa por meio da sua via biossintética, regulando os níveis de ascorbato que estão diretamente ligados a remoção EROs, e que por sua vez, desencadeiam a morte celular programada.

Já a morte celular programada, que regula a defesa de plantas a patógenos, pode ocorrer de formas distintas. As formas mais conhecidas são a resposta de hipersensibilidade e a autofagia. A resposta de hipersensibilidade desencadeia a morte celular rápida induzida por elevados conteúdos de EROs. Já a autofagia é uma morte celular mais lenta, que consiste na tentativa de reciclagem de moléculas danificadas. Assim, foi observado que ABA regula também o tipo de morte celular programada. Na interação com *S. sclerotiorum*, ABA induziu em 'MT' a autofagia como forma de contenção e retardamento da morte celular, aumentando a resistência a esse patógeno necrotrófico.

Já em *sitiens* inoculado com *O. neolycopersici*, ABA induziu vários genes de resistência R, do tipo NBS-LRR. Esses genes estão diretamente envolvidos no reconhecimento de efetores de patógenos e desencadeiam a resposta de hipersensibilidade. Esse tipo de morte rápida restringe o crescimento do *O. neolycopersici*, que por ser biotrófico necessita de células vivas para seu crescimento.

Portanto, ABA exerce um papel de regulação da defesa a patógenos de forma direta por meio do controle do modo de morte celular programada, e de forma indireta, por meio da sua via de biossíntese na regulação dos níveis de ascorbato, de EROs e de morte celular programada.