Alice Nagai

Interação planta-patógeno: análises químicas em *Solanum pimpinellifolium* L. e *Solanum lycopersicum* 'VFNT' infectadas pelo tomato mottle mosaic virus

Plant-pathogen interaction: chemical analysis in *Solanum pimpinellifolium* L. and *Solanum lycopersicum* 'VFNT' infected with tomato mottle mosaic virus

São Paulo

2017

Alice Nagai

Interação planta-patógeno: análises químicas em *Solanum pimpinellifolium* L. e *Solanum lycopersicum* 'VFNT' infectadas pelo tomato mottle mosaic virus

Plant-pathogen interaction: chemical analysis in *Solanum pimpinellifolium* L. and *Solanum lycopersicum* 'VFNT' infected with tomato mottle mosaic virus

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Botânica.

Orientação: Déborah Yara Alves Cursino dos Santos.

VERSÃO CORRIGIDA

O original encontra-se disponível na biblioteca do Instituto de Biociência da USP

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Nagai, Alice

Interação planta-patógeno: análises químicas em *Solanum pimpinellifolium* L. e *Solanum lycopersicum* 'VFNT' infectadas pelo tomato mottle mosaic virus

223 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Interação planta-patógeno. 2. Tomate. 3. Sinalizadores. 4. Antioxidantes não enzimáticos 5. Metabolômica. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof.^a Dr.^a Déborah Yara A. C. dos Santos
Orientadora

Dedicatória

*Ao meu noivo Luís e à minha família,
por todo o amor que nos une.*

“Our whole universe was in a hot dense state
Then nearly fourteen billion years ago expansion started
Wait
The Earth began to cool
The autotrophs began to drool
Neanderthals developed tools
We built a wall (we built the pyramids)
Math, science, history, unraveling the mysteries
That all started with the big bang!”

The Big Bang Theory Theme Song (Barenaked Ladies)

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me proporcionado uma vida maravilhosa. Tenho uma família que sempre me deu amor, carinho, atenção e que foi uma base excelente que contribuiu muito para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Não poderia deixar de agradecer a minha orientadora Profa Dra Déborah Y. A. C. dos Santos por realmente fazer jus ao título de professora orientadora. Assim como na realização do mestrado, ela sempre esteve presente para sanar minhas dúvidas. Em momentos de aflição, as conversas com ela são como uma luz que me acalma.

Agradeço imensamente à minha família, por apoiar e incentivar a minha decisão acadêmica tanto no âmbito financeiro, quanto no pessoal. Sei que meu pai e meus irmãos Eduardo e Camila sempre comemoram as conquistas comigo e dividem os momentos de estresse. Agradeço também ao Rodrigo Masuda e à Yukiko Soyama por ajudar na etapa de separação de sementes. Agradeço a toda minha família que me apoiou nesse projeto.

Também agradeço a uma pessoa extremamente especial que cuida do meu coração: meu noivo Luís, que sempre incentiva minha busca pelo aprendizado, mesmo que isso signifique ficarmos distantes por algum tempo, sempre me coloca para cima e valoriza o que eu faço, cuida de mim fazendo comidas deliciosas e sendo o meu companheiro para todas as horas.

A realização desse trabalho foi possível graças à doação das sementes pelo professor Dr. Lázaro Peres, o qual nos recepcionou com muita atenção.

Um agradecimento especial para uma amiga que me acompanhou praticamente em todo o doutorado, dividindo momentos de angústia, estresse, decepção, mas que ficarão apenas como histórias e aprendizado, pois as horas de lazer, descontração, conversas fiadas, muito aprendizado e conhecimento que serão mais marcantes na memória. Obrigada por tudo, Pri!

Ao pessoal do Instituto Biológico, em especial à Lígia Duarte que é uma pessoa que sempre me ajudou na parte de Virologia Vegetal com muito bom humor, calma e paciência, ao Alexandre que também sempre esteve pronto para ajudar nessa área, à Leilane que sempre se mostrou muito prestativa, à M. Amélia, ao Marcelo Eiras, à Aline, ao Daniel Silva e a todos que me ajudaram de alguma forma no meu experimento e proporcionaram bons momentos nas horas do café. Também agradeço ao pesquisador Ricardo Harakava pelo sequenciamento realizado.

Agradeço aos professores Salatino, Maria Luiza, Cláudia e Marcelo do laboratório de Fitoquímica, pelas conversas agradáveis na copa, conselhos, sugestões e aprendizado.

Os dias no laboratório foram muito agradáveis por causa da boa convivência com os amigos Priscila, Paula, Cristiane, Cinthia, Miguel, Lucas, Carmen, Wilton, Fernanda Rezende, Fernanda Anselmo, Kátia, Janayne, Jana Algas, Vanessa Algas, Dalila, Anary, Paulo. E também de alguns amigos que foram para outros lugares, mas deixaram saudades, como Bruna, Sarah, Adne, Carol e Janaína.

Agradeço pelo laboratório de fitoquímica da USP ter sido agraciado com uma funcionária muito consciente em se tratando das questões ambientais e que realiza diversas tarefas com muita eficácia. Sempre me lembrarei do jeito singular da técnica Mourisa Ferreira.

Agradeço também à especialista Aline e ao auxiliar Leandro.

A todos os professores do Departamento de Botânica a quem pedi alguma colaboração e foram muito solícitos, como Luciano Freschi que auxiliou na análise de óxido nítrico e Eny Floh, nas análises de poliaminas e ácido salicílico. A outros professores que prontamente disponibilizaram seus equipamentos, como Marcos Buckeridge, Marie-Anne e Fungyi Chow.

Um agradecimento muito especial ao professor Roberto Shimizu por ter auxiliado em uma parte fundamental do trabalho que é a estatística. Sempre que tinha alguma dúvida, ele foi muito solícito e explicava tudo com clareza e paciência. O pesquisador Giuliano Locosselli também foi muito prestativo na ajuda com a estatística.

Agradeço aos especialistas Rosário, Amanda Macedo e Viviane.

A ajuda na coleta foi de extrema importância, então agradeço imensamente à Priscila, Paula, Kátia, Fernanda Rezende, Carmen, Maria Goreti, professora Déborah, Camila, Wilton, Miguel, Lucas, Cris e Cinthia. Também agradeço a oferta de ajuda de outras pessoas do laboratório.

Ao aluno Rafael Zuccarelli, pela ajuda no ensaio de óxido nítrico.

À Fernanda Rezende, mais uma vez, por me ensinar a realizar o protocolo de ácido ascórbico e glutathione.

Mais uma vez, agradeço à Leilane do Instituto Biológico por ter levado a amostra para microscopia eletrônica de transmissão. Também agradeço ao pesquisador Elliot Kitajima, do laboratório de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ – USP por ter feito a fotomicrografia maravilhosa do isolado viral.

Ao técnico Homelhan pela ajuda com a multiplicação de sementes, com o enchimento de vasos e transplante. Além de ter ajudado muito no trabalho de mestrado com o cultivo de *Physalis*.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido durante a realização do trabalho.

Índice

Introdução geral

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Espécies botânicas	25
1.2. Espécie viral – <i>Tomato mottle mosaic virus</i> (ToMMV)	29
2. OBJETIVO GERAL	30
3. MATERIAL & MÉTODOS	30
3.1. Material botânico	30
3.2. Material virológico	30
3.3. Montagem do experimento	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

Capítulo 1: Identificação e caracterização molecular do isolado viral

RESUMO	38
ABSTRACT	39
1. INTRODUÇÃO	40
1.1. Contextualização do problema	42
1.2. Tobamovirus	43
2. OBJETIVO	45
3. MATERIAL & MÉTODOS	45
3.1. Extração de RNA total a partir de material foliar	45
3.2. Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	46
3.3. Gel de agarose	47
3.4. Sequenciamento e análise das sequências	47
3.5. Purificação do vírus, microscopia eletrônica de transmissão e extração do RNA viral	47
3.6. Sequenciamento completo e análises da sequência	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Sequenciamento da região codificante da capa proteica e parte da proteína de movimento	49
4.2. Purificação do vírus	51
4.3. Sequenciamento completo do genoma viral	53
5. CONCLUSÃO	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

Capítulo 2: Sinalizadores e antioxidantes não enzimáticos na resposta de defesa das plantas

RESUMO	64
ABSTRACT	65
1. INTRODUÇÃO	66
2. OBJETIVOS	72
3. MATERIAL E MÉTODOS	72
3.1. Obtenção das amostras	72
3.2. Concentração viral (Plate-Trapped Antibody-Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay - PTA-ELISA)	73
3.3. Óxido nítrico (NO)	73
3.4. Poliaminas	74
3.5. Ácido salicílico	75
3.6. Ácido ascórbico	76
3.7. Glutathiona	76
3.8. Análises estatísticas	77
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1. Resultados obtidos para a espécie <i>S. pimpinellifolium</i>	78
Concentração viral (PTA-ELISA)	80
Óxido nítrico (NO)	81
Poliaminas	83
Ácido salicílico	88
Ácido ascórbico e glutathiona	91
4.2. Resultados obtidos para a espécie <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT'	95
Concentração viral (PTA-ELISA)	96

Óxido nítrico.....	96
Poliaminas	99
Ácido salicílico	101
Ácido ascórbico e glutatona.....	105
5. CONCLUSÃO.....	108
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
Capítulo 3: Análise comparativa do metaboloma de plantas sadias, mecanicamente injuriadas e desafiadas por vírus	
RESUMO	118
ABSTRACT.....	119
1.INTRODUÇÃO.....	120
2.OBJETIVOS.....	122
3. MATERIAL & MÉTODOS	123
3.1. Obtenção das amostras	123
3.2. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	123
3.3. Análise por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)	124
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	126
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
4.1. METABÓLITOS ANALISADOS POR CLAE.....	127
4.2. METABÓLITOS ANALISADOS POR CG-EM.....	140
5. CONCLUSÕES.....	150
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
Considerações finais.....	158
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170
Apêndice I.....	172
Apêndice II.....	179

Lista de Figuras

Introdução geral

Figura 1. Características da planta e do patógeno na interação um com o outro. Traduzido de McDonald, 2004.	17
Figura 2. Interação compatível. a. e b. Patógenos virulentos, que não codificam o eliciador, não disparam rápidas respostas de defesa em plantas que possuam ou não o receptor. c. Patógeno avirulento, que codifica o eliciador, mas que também não dispara as respostas. Traduzido de McDonald, 2004.	18
Figura 3. Interação incompatível entre patógeno avirulento e planta com alelo de resistência.....	18
Figura 4. Modelo zig-zag de resposta de defesa da planta, mostrando a amplitude das respostas de defesa em vários estágios de infecção.....	21
Figura 5. Árvore obtida a partir de dados de AFLP e o algoritmo de agrupamento Neighbor-joining para classificação e análise filogenética de <i>Solanum</i> , seção <i>Lycopersicon</i>	27
Figura 6. Fruto do tipo baga de <i>S. pimpinellifolium</i> apresentando 1 cm de diâmetro	27
Figura 7. Comparação do tamanho dos frutos de <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' (esquerda) e de <i>S. pimpinellifolium</i> (direita)	29

Capítulo 1

Figura 1.1. Representação das diferentes morfologias das partículas de vírus que infectam plantas	42
Figura 1.2. Eletromicrografia com contraste negativo de partículas de tobacco mosaic virus (TMV) fixada com acetato de uranila	43
Figura 1.3. Organização do genoma de tobacco mosaic virus (TMV)	44
Figura 1.4. a. Produto amplificado a partir da RT-PCR com iniciadores específicos para capa proteica e parte da proteína de movimento do tobamovírus-CB; b.marcador de peso molecular (100 pb – DNA ladder), c. Controle positivo; d. Controle negativo	49
Figura 1.5. Representação esquemática de parte do genoma de tobamovírus correspondente as ORFs 3 e 2 que codificam para proteína de movimento (PM) e capa proteica (CP), respectivamente, bem como as respectivas sequências de nucleotídeos do vírus isolado	50
Figura 1.6. Espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) de amostra purificada com a diluição de 1:50 (v/v)	52
Figura 1.7. Micrografia eletrônica de preparação purificada do isolado de tobamovírus-CB em contraste negativo	52
Figura 1.8. Sequência completa do genoma do isolado tobamovírus-CB apresentando destaques para os códons de início e de parada das 4 ORFs	55
Figura 1.9. Árvore filogenética obtida sob o critério de máxima verossimilhança com o programa MEGA7.0 após determinação do modelo de substituição de nucleotídeos (HKY), utilizando a sequência genômica correspondente à capa proteica de todas as espécies aceitas de Tobamovirus que possuem o genoma sequenciado	59
Figura 1.10. Árvore filogenética obtida sob o critério de máxima verossimilhança (PAUP, v. 4.0b10), após determinação do modelo de substituição de nucleotídeos (GTR + I + G, I=0,4521, G=1,0379), com sequências do genoma completo dos tobamovirus tomato mosaic virus (ToMV), tomato mottle mosaic virus (ToMMV) e tobacco mosaic virus (TMV), representadas pelos seus respectivos números de acesso no GenBank	60

Capítulo 2

Figura 2.1. Representação dos três metabólitos derivados de ácido salicílico mais comumente encontrados. a. ácido salicílico 2-O-β-D-glicose (SAG), b. salicilato de metila (MeSA), c. salicilato de metila 2-O-β-D-glicose (MeSAG)	67
Figura 2.2. Poliaminas mais comumente encontradas em plantas	69
Figura 2.3. Representações esquemáticas a. da molécula de ácido ascórbico evidenciando os dois grupos hidroxila ionizáveis. b. da molécula de glutathione reduzida	70
Figura 2.4. Representação esquemática do ciclo ascorbato-glutathione	71
Figura 2.5. Sintomas causados pelo ToMMV em <i>Solanum pimpinellifolium</i> . a. Comparação da morfologia de folha sadia (esquerda) e infectada (direita). b. Necrose do folíolo apontada pela seta branca. c. Diminuição do tamanho da planta infectada (esquerda) comparado com a planta sadia (direita). d. Vista superior de afilamento dos folíolos de planta infectada	79
Figura 2.6. Leituras de absorbância a 405 nm das amostras de <i>S. pimpinellifolium</i> infectadas com o ToMMV em diferentes DAI referentes ao 1º experimento com esse patossistema	81

Figura 2.7. Leituras expressas em unidades arbitrárias de fluorescência relativas ao teor de óxido nítrico em <i>S. pimpinellifolium</i> em diferentes tratamentos e em diferentes DAI. a. Comparação entre os grupos Controle-Tampão. b. Comparação entre os grupos Tampão-Infectadas	82
Figura 2.8. Principais poliaminas encontradas em <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' e em <i>S. pimpinellifolium</i> . PUT = putrescina; CAD = cadaverina; DAH = diaminoheptano (padrão); SPD = espermidina; SPM = espermina	83
Figura 2.9. Concentração de poliaminas livres (µg poliamina/g planta) em extrato de folhas de <i>S. pimpinellifolium</i> não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de a. putrescina, b. espermidina e c. espermina entre os grupos Controle e Tampão. Comparação da concentração de d. putrescina, e. espermidina e f. espermina entre os grupos Tampão e Infectadas	85
Figura 2.10. Concentração de ácido salicílico livre (SA), conjugado (SAG) e total (SA total) em µg/g planta em extrato de folhas de <i>S. pimpinellifolium</i> não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - Controle), friccionadas com tampão (barra cinza - Tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de SA entre os grupos a. Controle e Tampão e d. Tampão e Infectadas; de SAG entre os grupos b. Controle e Tampão e e. Tampão e Infectadas e de SA total entre os grupos c. Controle e Tampão e f. Tampão e Infectadas	90
Figura 2.11. Concentração ácido ascórbico (ng ácido ascórbico /g massa fresca) em extrato de folhas de <i>S. pimpinellifolium</i> não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de a. ácido ascórbico reduzido, b. ácido ascórbico oxidado e c. ácido ascórbico total entre os grupos Controle e Tampão. Comparação da concentração de d. ácido ascórbico reduzido, e. ácido ascórbico oxidado e f. ácido ascórbico total entre os grupos Tampão e Infectadas	92
Figura 2.12. Concentração glutatona (µg glutatona/g planta) em extrato de folhas de <i>S. pimpinellifolium</i> não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração glutatona oxidada entre os grupos a. Controle e Tampão e entre os grupos b. Tampão e Infectadas	94
Figura 2.13. Leituras de absorvância a 405 nm das amostras de <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' infectadas com o ToMMV em diferentes DAI	96
Figura 2.14. Leituras expressas em unidades arbitrárias de fluorescência relativas ao teor de óxido nítrico em <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' em diferentes tratamentos. a. Comparação entre os grupos Controle-Tampão. b. Comparação entre os grupos Tampão-Infectadas	99
Figura 2.15. Concentração de poliaminas livres (µg poliamina/g planta) em extrato de folhas de <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de a. putrescina, b. espermidina e c. espermina entre os grupos Controle e Tampão. Comparação da concentração de d. putrescina, e. espermidina e f. espermina entre os grupos Tampão e Infectadas	101
Figura 2.16. Concentração de ácido salicílico livre (SA), conjugado (SAG) e total (SA total) em µg/g planta em extrato de folhas de <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - Controle), friccionadas com tampão (barra cinza - Tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de SA entre os grupos a. Controle e Tampão e d. Tampão e Infectadas; de SAG entre os grupos b. Controle e Tampão e e. Tampão e Infectadas e de SA total entre os grupos c. Controle e Tampão e f. Tampão e Infectadas	104
Figura 2.17. Concentração ácido ascórbico (ng ácido ascórbico /g massa fresca) em extrato de folhas de <i>S. lycopersicum</i> . 'VFNT' não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de a. ácido ascórbico reduzido, b. ácido ascórbico oxidado e c. ácido ascórbico total entre os grupos Controle e Tampão. Comparação da concentração de d. ácido ascórbico reduzido, e. ácido ascórbico oxidado e f. ácido ascórbico total entre os grupos Tampão e Infectadas	106
Figura 2.18. Concentração glutatona (µg glutatona/g planta) em extrato de folhas de <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca -	

Infectadas). Comparação da concentração glutatona oxidada entre os grupos a. Controle e Tampão e entre os grupos b. Tampão e Infectadas	107
Capítulo 3	
Figura 3.1. Cromatogramas dos extratos hidrometanólicos de folhas de a. <i>S. pimpinellifolium</i> e b. <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT'	128
Figura 3.2. Cromatogramas dos extratos hidrometanólicos de folhas de a. <i>S. pimpinellifolium</i> e b. <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT'	130
Figura 3.3. Gráficos do tipo heatmap evidenciando variações significativas nos diferentes dias após a inoculação (1, 7, 14, 21 e 28) entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infectadas (TI) na análise das substâncias em CLAE-EM-EM	133
Figura 3.4. Gráficos do tipo heatmap evidenciando variações significativas entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infectadas (TI) na análise das substâncias em CLAE-EM-EM nos diferentes dias após a inoculação (1, 7, 14, 21 e 28)	135
Figura 3.5. Possíveis rotas biossintéticas a partir do ácido cinâmico	138
Figura 3.6. Comparação da concentração de ácido clorogênico (ug/ g planta) no 14° DAI nas espécies a. <i>S. pimpinellifolium</i> e b. <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT'	140
Figura 3.7. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos metanólicos (fase polar) de folhas. a. <i>S. pimpinellifolium</i> e b. <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT'	141
Figura 3.8. Gráficos do tipo heatmap evidenciando variações significativas nos diferentes dias após a inoculação (1, 7, 14, 21 e 28) nas substâncias analisadas por CG-EM entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infectadas (TI). a. Heatmap obtido para <i>S. pimpinellifolium</i> . b. Heatmap obtido para <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT'	145
Figura 3.9. Gráficos do tipo heatmap evidenciando variações significativas entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infectadas (TI) nos diferentes dias após a inoculação (1, 7, 14, 21 e 28) nas substâncias analisadas por CG-EM. a. Heatmap obtido para <i>S. pimpinellifolium</i> . b. Heatmap obtido para <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT'	147
Considerações Finais	
Figura 1. Análise de componentes principais (PCA) com todas as análises feitas para a espécie <i>S. pimpinellifolium</i> com os tratamentos (Controle – C; Tampão – T) em todos os dias do experimento	160
Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) com todas as análises feitas para a espécie <i>S. pimpinellifolium</i> com os tratamentos (Controle – C; Tampão – T) em todos os dias do experimento	162
Figura 3. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 1º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de NO e em azul, para a diminuição na concentração de poliaminas	163
Figura 4. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 7º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de NO, SA, AsA e GSSG e em azul, para a diminuição na concentração de poliaminas. Adaptado de Somsick & Hahlbrock, 1998; Kawakami et al., 2004; Fröhlich & Durner, 2011; Yamasaki & Cohen, 2006; Wimalasekera et al., 2011; Bielen et al., 2013. AsA = ácido	164
Figura 5. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 14º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de AsA, GSSG, SAG e metabólitos secundários. Destaque em azul para a diminuição na concentração de glicose	165
Figura 6. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 14º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de AsA, GSSG, SAG e metabólitos secundários	166
Figura 7. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 28º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de AsA, GSSG, SAG, poliaminas e metabólitos secundários	167
Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) com todas as análises feitas para a espécie <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' com todos os tratamentos (Controle – C; Tampão – T; Infectadas – I) em todos os dias do experimento.	169

Lista de Tabelas

Introdução geral

Tabela 1. Ocorrência das famílias botânicas e de vírus de plantas na busca por estudos que abordam a temática "interação planta-vírus" na ferramenta "Google acadêmico"	25
--	----

Capítulo 1

Tabela 1.1. Porcentagens de identidade em nucleotídeos (NT) e aminoácidos (AA) de sequência da região codificadora da capa proteica e de parte da proteína de movimento do isolado brasileiro de tobamovírus-CB, comparado a sequências homólogas de tomate mottle mosaic virus, tomate mosaic virus e tobacco mosaic virus disponíveis no GenBank	51
---	----

Tabela 1.2. Porcentagens de identidade em nucleotídeos (NT) e aminoácidos (AA) de sequência completa do genoma do isolado do tobamovírus-CB, comparado a sequências homólogas de tomate mottle mosaic virus, tomate mosaic virus e tobacco mosaic virus disponíveis no GenBank	56
---	----

Tabela 1.3. Espécies de vírus e número de acesso das sequências no GenBank usadas na análise filogenética	58
--	----

Capítulo 3

Tabela 3.1. Substâncias analisadas por CLAE-EM-EM com seus respectivos tempos de retenção, comprimento máximo de absorção em UV-vis e o nome da molécula proposta	131
--	-----

Tabela 3.2. Substâncias analisadas por CG-EM com seus respectivos tempos de retenção, nome da molécula proposta, match de acordo com a biblioteca da NIST02 e índice de retenção linear (IRL)	142
--	-----

Considerações Finais

Tabela 1. Valores de variância explicada e cumulativa para os componentes que explicam a maior parte das variações para a PCA construída para espécie <i>S. pimpinellifolium</i> com todos os tratamentos	161
--	-----

Tabela 2. Valores de variância explicada e cumulativa para os componentes que explicam a maior parte das variações para a PCA construída para espécie <i>S. pimpinellifolium</i> apenas com os tratamentos Controle e Tampão.	162
---	-----

Tabela 3. Valores de variância explicada e cumulativa para os componentes que explicam a maior parte das variações para a PCA construída para espécie <i>S. lycopersicum</i> 'VFNT' com todos os tratamentos	169
---	-----

Introdução geral

RESUMO

As plantas se defendem do ataque de patógenos através de um sistema imune composto por duas fases. A primeira delas é mediada por receptores localizados na membrana celular ou intracelularmente, os quais são conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (do inglês, *pattern recognition receptors* – PRR). Esses receptores reconhecem moléculas derivadas de microrganismos, as quais são conservadas evolutivamente e são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Esse reconhecimento dispara uma resposta de defesa conhecida como PTI (do inglês, *PAMP-triggered immunity* – PTI). Alguns patógenos foram aptos a sintetizar moléculas capazes de suprimir a PTI e essas moléculas são denominadas de efetores. A resposta que ocorre devido à ação dos efetores é chamada de susceptibilidade disparada por efetores (do inglês, *effector-triggered susceptibility* – ETS). Entretanto, plantas resistentes podem reconhecer os efetores através de proteínas de resistência localizadas intracelularmente, ativando a imunidade disparada por efetores (do inglês, *effector-triggered immunity* – ETI). De modo geral, as respostas advindas da PTI e da ETI são similares, mas a segunda é ativada mais rapidamente e é mediada por um único gene de resistência *R*. Por essa razão, a ETI é conhecida como uma resposta à doença qualitativa e as plantas não desenvolvem sintomas, caracterizando a interação incompatível. Por outro lado, a PTI é mediada por diversos genes e as respostas de defesa são tardias, possibilitando a disseminação do patógeno pelas células da planta e a ocorrência da doença, o que caracteriza a interação compatível. Nas respostas de defesa, moléculas como o óxido nítrico, as poliaminas e o ácido salicílico participam do processo de sinalização. O sistema antioxidante da planta é ativado de modo a mitigar os efeitos das espécies reativas de oxigênio e o metabolismo da planta é alterado. Dessa maneira, o estudo das respostas de defesa contra patógenos, pode ser uma ferramenta útil para estabelecer controles efetivos para as doenças de plantas.

Palavras-chave: respostas de defesa, vírus, interação compatível e incompatível

General Introduction

ABSTRACT

Plants defend themselves from pathogen attack through an active immunity system composed by two phases. The first is mediated by cell surface and intracellular pattern recognition receptors (PRR), which recognizes conserved molecules derived from microbes known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). This recognition triggers a defense response called PAMP-triggered immunity (PTI). Throughout evolution, pathogens were able to synthesize molecules capable of suppressing PTI. These molecules are named effectors and they are responsible for effector-triggered susceptibility (ETS). However, resistant plants can recognize effectors by intracellular resistance (R) proteins, initiating effector-triggered immunity (ETI). In general, responses derived from PTI and ETI are the same, but the latter is activated faster and is mediated by a single *R* gene. For this reason, ETI-response is also known as qualitative disease response (QDR) and plants do not develop disease symptoms, characterizing the incompatible interaction. On the other hand, PTI is mediated by several genes and the defense response is delayed, enabling the pathogen to spread out and to cause disease. This interaction is known as compatible. In defense responses, molecules like nitric oxide, polyamines and salicylic acid can participate in signaling process. The antioxidant system can be activated to quench the ROS effects and the plant metabolism is altered. In this sense, studying defense responses against pathogens can help to develop tools to establish effective control methods for plant disease.

Keywords: defense response, plant virus, compatible and incompatible interactions

1. INTRODUÇÃO

Desde a conquista do ambiente terrestre, a evolução das plantas foi modelada por interações moleculares com microrganismos epifíticos, simbióticos e patogênicos (Chisholm et al., 2006). Atualmente, as plantas ainda estão constantemente expostas aos microrganismos, podendo sofrer o ataque dos patógenos, os quais podem ser divididos em duas categorias de acordo com seu estilo de vida. Os biotróficos se alimentam do tecido da hospedeira viva, enquanto que os necrotróficos causam a morte da hospedeira pela secreção de toxinas ou enzimas e se alimentam dos restos do tecido. Os vírus, por excelência, enquadram-se na categoria dos biotróficos (Thomma et al., 2001; Glazebrook, 2005).

Na interação planta-patógeno, a planta pode ser considerada como não hospedeira (imune) ou hospedeira a um determinado patógeno. Nas plantas não hospedeiras, não ocorre a replicação viral, podendo ocorrer apenas a perda da capa proteica, no processo conhecido como descapsidação. Já nas plantas hospedeiras, o vírus pode se multiplicar no local inicial de infecção, sendo restrito a esse local e as plantas são classificadas como resistentes, ou o vírus pode se replicar e se movimentar pela planta que é reconhecida como suscetível. Nesse último caso, se as plantas reagem com sintomas, elas são classificadas como sensíveis; caso contrário, são tidas como tolerantes e a infecção é latente (Hull, 2002).

Em se tratando do patógeno, ele pode ser classificado como avirulento ou virulento. No primeiro caso, a capacidade de sintetizar o eliciador está presente, enquanto que no segundo, ele possui um alelo de virulência, o qual não é capaz de codificar o eliciador (McDonald, 2004; Glazebrook, 2005). Elicidor pode ser definido como um composto químico ou biológico, proveniente de diversas fontes, que pode induzir mudanças fisiológicas dos organismos que foram expostos a esses compostos. Em plantas, os eliciadores se referem aos compostos químicos oriundos de diversas fontes que disparam respostas fisiológicas e morfológicas, além de causar acúmulo de fitoalexinas (Zhao et al., 2005).

A característica de ser hospedeira ou não de um determinado patógeno depende de dois fatores principais: 1 - presença de um alelo de resistência responsável por codificar um produto desse gene de resistência *R*; 2 – presença de um produto do gene de avirulência do patógeno, que servirá como eliciador nas respostas de defesa (Glazebrook, 2005) (**Figura 1**).

Figura 1. Características da planta e do patógeno na interação um com o outro. Traduzido de McDonald, 2004.

Dessas diferentes características da planta e do patógeno, são possíveis dois tipos de interação: compatível e incompatível. Esses termos levam em conta o sucesso do patógeno em infectar a célula da planta ou de acarretar a doença. No primeiro tipo, o patógeno é bem sucedido e a doença se instala na planta, enquanto que no segundo, as defesas da planta são rapidamente ativadas e impedem a replicação e/ou propagação do patógeno e, conseqüentemente, evitam a doença, não ocorre o aparecimento de sintomas e o vírus não pode ser detectado (Codeiro & Grossi de Sá, 1999; Resende et al., 2003; Gaur et al., 2014).

É importante frisar que a ausência de sintomas nas plantas não é indicativa de que o patógeno não conseguiu infectar a célula. É possível que ocorra a replicação apenas no local original da infecção, como já foi mencionado acima no caso das plantas resistentes. Também podem ocorrer microssintomas ou sintomas internos, os quais são visíveis por microscopia de luz, como por exemplos corpos de inclusão induzidos por Potyvirus (Hull, 2002; Gaur et al., 2014).

A interação compatível ocorre quando não há o reconhecimento do eliciador pelo receptor da planta. Isso faz com que não exista um “estímulo” para ativação das suas respostas de defesa. Dessa maneira, esse tipo de interação ocorre entre patógenos que não codificam o eliciador, patógenos virulentos, e plantas com ou sem o receptor, ou ocorre entre patógenos avirulentos, os quais possuem o eliciador, e plantas que não possuem o alelo de resistência que codifica o receptor (McDonald, 2004) (**Figura 2**).

Figura 2. Interação compatível. **a.** e **b.** Patógenos virulentos, que não codificam o eliciador, não disparam rápidas respostas de defesa em plantas que possuam ou não o receptor. **c.** Patógeno avirulento, que codifica o eliciador, mas que também não dispara as respostas. Traduzido de McDonald, 2004.

Já na interação incompatível, é preciso que o patógeno possua o alelo de avirulência e codifique o eliciador e a planta possua o alelo de resistência, que sintetiza o receptor. Esse reconhecimento eliciador-receptor ativar as respostas de defesa da planta de maneira rápida, impedindo que a doença se instale (Cordeiro & Grossi de Sá, 1999; McDonald, 2004) (**Figura 3**).

Figura 3. Interação incompatível entre patógeno avirulento e planta com alelo de resistência.

Para se defender dos ataques dos micro-organismos patogênicos, as plantas possuem um sistema imune inato, o qual é denominado por alguns autores como modelo zig-zag. Primeiramente, há o reconhecimento de moléculas dos patógenos conservadas evolutivamente, as quais são denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs), por receptores de reconhecimento padrão (do inglês, *pattern recognition receptor* - PRR) localizados na superfície extracelular. Com o reconhecimento das PAMPs pelos PRR há a ativação de resposta de defesa mediada por proteínas que passam por processo reversível de fosforilação ou desfosforilação. Essas proteínas

são conhecidas como proteínas quinases e desempenham papel importante na sinalização de respostas adaptativas para vários tipos de estresse. Já foram reportados dois tipos de proteínas quinase. Uma delas é denominada de proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *mitogen-activated protein kinase* – MAPK) e a outra, proteína quinase dependente de cálcio (do inglês, *calcium-dependent protein kinase* – CDPK) (Chisholm et al., 2006; Horváth et al., 2007)

O reconhecimento das PAMPs pelos PRR ativa a resposta de defesa por MAPK, havendo reprogramação transcricional mediada por fatores de transcrição específicos e essa resposta é denominada de imunidade disparada por PAMP (do inglês, *PAMP-triggered immunity* – PTI) (Chisholm et al., 2006). Além das moléculas provenientes dos patógenos, as plantas podem responder a moléculas endógenas, como fragmentos da parede celular ou da cutícula, que são liberadas após a invasão do patógeno e são denominadas de padrões moleculares associados a perigo (do inglês, *danger-associated molecular patterns* – DAMPs) (Thomma et al., 2001; Dodds & Rathjen, 2010)

Nas infecções virais, uma resposta que é preliminarmente ativada é o silenciamento gênico que regula o acúmulo de moléculas de RNAs de origem endógena ou exógena (Chisholm et al., 2006). O silenciamento gênico pode ser classificado como resposta do tipo PTI. Como explicado anteriormente, as PAMPs são moléculas dos patógenos que foram conservadas durante a evolução. A alta taxa de mutação viral faz com que a definição de PAMP seja dificilmente aplicada para proteínas virais. Entretanto, os genomas virais e suas formas replicativas, como moléculas de RNA de fita dupla (do inglês, *double strand RNA* – dsRNA) são bastante conservados e podem ser percebidos pelas plantas como sinais exógenos, podendo agir como PAMPs de origem viral, disparando a ativação do silenciamento como resposta do tipo PTI (Nicaise, 2014; Conti et al., 2017).

O silenciamento gênico foi primeiramente descrito em plantas e subsequentemente em invertebrados (Ding & Voinnet, 2007) e envolve duas etapas com a participação coordenada de dois maquinários com atividade de ribonuclease. No primeiro, as enzimas Dicer ou Drosha, presentes na hospedeira, processam tanto dsRNA quanto transcritos primários de micro RNAs (miRNA), provenientes dos vírus, em pequenas moléculas de RNA de interferência (do inglês, *small interfering RNA* – siRNA). No segundo passo, as moléculas de siRNA são direcionadas para o complexo

de silenciamento induzido por RNA (do inglês, *RNA-induced silencing complex* - RISC), desenroladas e separadas de uma maneira específica durante a montagem do complexo RISC. As fitas simples de siRNA localizarão o mRNA alvo por meio do pareamento das bases de acordo com o modelo proposto por Watson-Crick. Por fim, o silenciamento gênico ocorrerá pela degradação nucleolítica do mRNA alvo por meio da ação de uma enzima do tipo Argonauta, chamada Slicer (Hammond, 2005).

Assim como explicado anteriormente, os vírus podem contrabalancear esse tipo de defesa da planta por meio de fatores de virulência, que nesse caso são conhecidos como supressores virais do silenciamento de RNA (do inglês, *viral suppressors RNA silencing* - VSR) (Ding & Voinnet, 2007).

A capacidade de contrapor a PTI por interferir no reconhecimento das PAMPs pelos PRR ou por meio da liberação de efetores no citoplasma da célula hospedeira, os quais, provavelmente, alteram a cascata de sinalização ou a manifestação das respostas de defesa, desencadeia um processo nas plantas que é conhecido como susceptibilidade disparada por efetores (do inglês, *effector-triggered susceptibility* – ETS). Em contrapartida, em algumas plantas foi selecionado um mecanismo mais especializado para detecção dos efetores liberados pelos microrganismos que é descrito como a segunda etapa do sistema imune, conhecido como imunidade disparada por efetores (do inglês, *effector-triggered immunity* – ETI). Esse mecanismo também é conhecido como interação gene a gene, pois há um reconhecimento específico do produto dos genes de avirulência (*Avr*) dos patógenos pelo produto dos genes de resistência (*R*) das plantas (Chishom et al., 2006; Jones & Dangl, 2006).

A interação gene a gene pode ser caracterizada por dois fenótipos principais. O primeiro deles é que ocorre na maioria das respostas de resistência mediada por genes *R* é a resposta de hipersensibilidade (do inglês, *hypersensitive response* – HR), na qual há morte celular programada das células que circundam o local de infecção inicial, acarretando no fenótipo de necrose local do tecido da hospedeira. A HR pode limitar a propagação do patógeno e um dos requisitos para sua ocorrência é a produção rápida de espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($OH^\cdot$) e ânion superóxido ($O_2^\cdot$). As EROs possuem diversos papéis na defesa, sendo tóxicas aos patógenos ou até mesmo atuando como mensageiros secundários para ativação de enzimas responsáveis pela síntese de outras substâncias que atuarão na defesa da planta. Além das EROs, as poliaminas

também podem estar envolvidas na HR, como foi demonstrado no patossistema *Arabidopsis thaliana*/cucumber mosaic virus, no qual a aplicação exógena de espermina e termoespermina induziu a expressão de genes relacionados com a HR (Resende et al., 2003; Soosaar et al., 2005; Sagor et al., 2012).

O segundo fenótipo observado na interação gene a gene é a resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance* - SAR), a qual ocorre em tecidos distantes ao local inicial de infecção e pode durar por semanas. A SAR confere imunidade ao patógeno que desencadeou a resposta de resistência ou àqueles proximamente relacionados. Há diversos estudos que apontam a participação do ácido salicílico (SA) nessa resposta (Resende et al., 2003; Soosaar et al., 2005).

A SAR está inclusa no processo de defesa conhecido como *priming*. Nesse tipo de defesa, há sensibilização de uma célula ou de um organismo, o que leva ao aumento na defesa por ativar as respostas de defesa mais rapidamente e de maneira robusta (Conrath et al., 2015).

A PTI e a ETI utilizam mecanismos similares para limitar o crescimento e disseminação do patógeno. Há, no entanto, diferenças na amplitude das respostas de defesa, com a ETI alcançando um limite maior capaz de disparar a HR (Chisholm et al., 2006; Hammond-Kosack & Jones, 2015) (**Figura 4**).

Figura 4. Modelo zig-zag de resposta de defesa da planta, mostrando a amplitude das respostas de defesa em vários estágios de infecção. Retirado de Hammond-Kosack & Jones. In: Buchanan et al., 2015. P/MAMPS = pathogen/microbe-associated molecular patterns (padrões moleculares associados a patógenos/micróbios).

Na ETI, a percepção de uma molécula efetora pela proteína R acarreta em fenótipos completamente resistentes ao patógeno. Esse processo é conhecido como

resistência qualitativa à doença. Por outro lado, na PTI, a percepção de uma única PAMP contribui de maneira ineficiente para as respostas de defesa e, ao invés de se observar resistência completa ao patógeno, há redução e não ausência da doença. Esse fato é geralmente conhecido como resistência quantitativa à doença (Chisholm et al., 2006; Jones & Dangl, 2006; Roux et al., 2014)

A PTI é eficiente para patógenos generalistas e esse fenômeno é conhecido como resistência de uma planta não hospedeira, enquanto que a ETI é efetiva contra patógenos especialistas. Assim como os patógenos conseguiram contrabalancear a PTI, há efetores que também podem interferir com a ETI (Dodds & Rathjen, 2010; Roux et al., 2014) causando a ETS. Entretanto, caso outra proteína R seja capaz de reconhecer esses novos efetores, há novamente a ativação da ETI (**Figura 4**).

Além do sistema imune da planta, há também barreiras constitutivas como a parede celular e a cutícula, além de substâncias que participam de outros processos fisiológicos e que também estão envolvidas na resposta de defesa das plantas.

Alguns fitormônios como ácidos jasmônico (JA) e salicílico (SA), os quais têm uma forte interação juntamente com o etileno, estão envolvidos na resposta de defesa das plantas. Porém, sabe-se que o JA e o SA possuem efeito antagônico nessa resposta. O JA está envolvido nas respostas de defesa de patógenos necrotróficos, enquanto que o SA participa na defesa de patógenos biotróficos, pois uma vez que esse último fitormônio está envolvido na HR, a morte celular priva o patógeno dos nutrientes, resultando na resistência da planta (Glazebrook, 2005; Huot et al., 2012)

Como já mencionado anteriormente, as poliaminas podem estar relacionadas com a HR (Sagor et al., 2012), além da provável participação na síntese do NO (Tun et al., 2006), que também é uma molécula que participa do sistema imune da planta (Delledonne, 2005). Também participam da resposta de defesa os metabólitos secundários (López-Gresa et al., 2012; Hammond-Kosack & Jones, 2015), além das substâncias que participam do sistema antioxidante não enzimático, como a glutatona (Noctor et al., 2012) e o ácido ascórbico (Khan et al., 2011).

Essas substâncias podem ativar respostas imunes inatas de amplo espectro que podem ser expressas no local onde houve a invasão do patógeno, assim como sistemicamente em tecidos que não foram infectados, como é o caso do SA. Esse fitormônio, além de estar envolvido com a SAR, pode ainda ativar a síntese de proteínas relacionadas com a patogênese (*pathogenesis-related* - PR) que contribuem

para a resistência da planta (Maleck & Lawton, 1998; Glazebrook, 2005). A participação dessas substâncias na resposta de defesa da planta será mais detalhada nos **Capítulos 2 e 3** desta tese.

A seguir, será abordada a importância do estudo das interações planta-patógeno com a apresentação dos resultados de uma busca realizada com essa temática.

Importância do estudo das interações planta-patógeno com ênfase nos vírus

O estudo da interação planta-patógeno é de extrema importância, uma vez que o conhecimento adquirido nessa área de estudo tem possibilitado aos melhoristas vegetais desenvolverem cultivares resistentes a doenças há mais de 100 anos com a utilização de genes de resistência, constituindo uma alternativa ao uso de pesticidas ou outros tipos de controle químico que são danosos ao ambiente (Bekeko & Muluaem, 2016).

Embora a utilização de cultivares resistentes apresente vantagens, como mínimo dano à planta hospedeira, não uso de pesticidas e eficiente redução do crescimento do patógeno, o surgimento de novas estirpes de patógenos pode quebrar essa resistência em um curto período, pois as mudanças evolutivas às quais os vírus são submetidos são, algumas vezes, muito rápidas (Hull, 2002; Arie et al., 2007; Dodds & Rathjen, 2010; Boualem et al., 2016). Essa quebra na resistência pode levar ao comprometimento da segurança de alimentos básicos como arroz, trigo e mandioca, elevando seus preços ou até mesmo acarretando em consequências mais graves, como sua total escassez que leva muitas pessoas a passarem fome (Soosaar et al., 2005; Dodds & Rathjen, 2010).

Diversos estudos científicos têm sido realizados com a temática de interação planta-vírus. Utilizando a ferramenta de busca “Google Acadêmico”, com as palavras “plant-virus interactions”, 744 resultados retornaram até maio de 2017. Refinando esses resultados considerando somente artigos científicos, teses e capítulos de livros que abordassem a interação planta-vírus com até dois patossistemas, o número de registros ficou em 379, sendo esses sintetizados na **Tabela 1**.

As famílias botânicas com maior quantidade de estudos que envolvem a interação planta-vírus são Solanaceae, com 157 ocorrências e Brassicaceae com 35,

possivelmente por englobarem espécies modelos, seguidos de Poaceae, com 32 e Fabaceae com 31 ocorrências, possivelmente pela importância econômica. Dentro de Solanaceae, as espécies mais estudadas foram as do gênero *Nicotiana*, com 74 trabalhos. Em Brassicaceae, a maioria dos trabalhos envolve a espécie modelo de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., contando com 33 trabalhos dos 35 disponíveis. Em Poaceae, os estudos envolvendo milho e arroz são semelhantes quanto ao número de ocorrências e em Fabaceae, não há uma espécie que prevaleça em termos de ocorrência de estudos.

Dentre as famílias de vírus, destacam-se *Potyviridae*, *Geminiviridae* e *Virgaviridae*, que incluem vírus de grande importância econômica. Na família *Potyviridae*, das 95 espécies encontradas, 92 pertenciam a *Potyvirus*, maior gênero dentro dessa família, com 160 espécies (ICTV, 2016). A família *Geminiviridae* apresentou 50 ocorrências, com a predominância do gênero mais abundante da família, que é *Begomovirus* com 49 trabalhos. Na família *Virgaviridae*, o gênero que apareceu o maior número de vezes foi *Tobamovirus*, com 36 ocorrências.

Em se tratando da família botânica com maior número de estudos, foi observada a ocorrência de apenas três gêneros: *Capsicum*, com 28 trabalhos, *Solanum*, com 56 e *Nicotiana* com 73. Quando é feito o cruzamento de trabalhos envolvendo Solanaceae e a família *Virgaviridae*, são computados 43 trabalhos.

Em relação à interação *Solanum lycopersicum* L. com vírus da família *Virgaviridae* foram contabilizados apenas três trabalhos. Logicamente, essa revisão não conta com todos os trabalhos referentes à influência dos vírus no metabolismo das plantas, mas ela reflete parte desses estudos. Interessante ressaltar que são raros os estudos realizados com espécies selvagens de tomate, que vêm sendo muito utilizadas como fontes para procura de genes de resistência contra patógenos. Assim, verificou-se que nenhum desses estudos foi realizado com *S. pimpinellifolium* L. e apenas um com *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner. Reforça-se, portanto, a importância de maior número de estudos que abordem os patossistemas *Solanum lycopersicum* 'VFNT'/*S. pimpinellifolium* – ToMMV.

Nos próximos itens desse capítulo serão detalhadas algumas características das plantas escolhidas para o estudo da interação planta-patógeno e informações bem resumidas sobre o isolado viral. As características detalhadas do patógeno serão mais bem exploradas no **Capítulo 1** desta tese.

Tabela 1. Ocorrência das famílias botânicas e de vírus de plantas na busca por estudos que abordam a temática "plant-virus interactions" na ferramenta "Google acadêmico".

Nome		Nº	Nome		Nº ocorrências
		ocorrências			
Família botânica	Alliaceae	1			
	Amaranthaceae	10			
	Apiaceae	1		<i>Alphaflexiviridae</i>	12
	Araceae	1		<i>Baculoviridae</i>	1
	Asparagaceae	1		<i>Benyviridae</i>	7
	Asteraceae	10		<i>Betaflexiviridae</i>	4
	Betulaceae	2		<i>Bromoviridae</i>	36
	Brassicaceae	35		<i>Bunyaviridae</i>	3
	Caricaceae	5		<i>Caulimoviridae</i>	11
	Cucurbitaceae	12		<i>Closteroviridae</i>	9
	Euphorbiaceae	2		<i>Geminiviridae</i>	50
	Fabaceae	31	Família viral	<i>Luteoviridae</i>	5
	Malvaceae	10		<i>Nanoviridae</i>	4
	Moraceae	1		<i>Não atribuída</i>	4
	Musaceae	18		<i>Ophioviridae</i>	2
	Oleaceae	2		<i>Partiviridae</i>	1
	Poaceae	32		<i>Potyviridae</i>	95
	Rosaceae	15		<i>Reoviridae</i>	5
	Rutaceae	4		<i>Secoviridae</i>	14
	Salicaceae	1		<i>Tombusviridae</i>	24
	Solanaceae	157		<i>Tymoviridae</i>	1
	Veronicaceae	1		<i>Virgaviridae</i>	44
	Vitaceae	9			
	Zingiberaceae	1			

1.1. Espécies botânicas

Solanum pimpinellifolium e *S. lycopersicum* 'VFNT' são duas espécies pertencentes a Solanaceae, uma família cosmopolita que possui cerca de 150 gêneros e 3000 espécies no mundo (Souza & Lorenzi, 2008). *Solanum* é um dos gêneros mais importantes dessa família, com cerca de 1500 a 2000 espécies e com hábitos que variam de pequenas plantas herbáceas a árvores de médio porte. São encontradas espécies em todo o mundo, com a maior riqueza neotropical, particularmente nos Andes e em regiões de vale (Darwin et al., 2003).

Carolus Linnaeus classificou os tomates dentro do gênero *Solanum* em 1753. Entretanto, em 1754, Philip Miller os segregou em um novo gênero chamado *Lycopersicon* Mill., juntamente com outras espécies, e denominou o tomate como *Lycopersicon esculentum* Mill. Provavelmente, com essa nomenclatura, ele tenha

ênfatizado que o tomate é comestível, uma vez que 'esculentum' no latim significa comestível e, na época, as pessoas acreditavam que o tomate era venenoso. Ainda hoje alguns melhoristas vegetais utilizam a nomenclatura proposta por Miller, mas os estudos recentes morfológicos e moleculares propõem a classificação dos tomates no gênero *Solanum* (Darwin et al., 2003; Kimura & Sinha, 2008).

Dentro desse gênero, encontra-se a seção *Lycopersicon* (Mill.) que inclui o tomate e espécies relacionadas. Apesar da filogenia dessa seção não apresentar consenso entre os autores, um trabalho que utilizou a análise de polimorfismo dos fragmentos amplificados (do inglês, AFLP –*amplified fragment length polymorphism*) e a sequência de dois genes nucleares CT066 e CT179 mostrou claramente a formação do grupo *Lycopersicon* formado por *S. pimpinellifolium* L., *S. lycopersicum* L., *S. galapagense* S. Darwin & Peralta e *S. cheesmaniae* L. Riley (**Figura 5**) (Zuriaga et al., 2009).

S. pimpinellifolium e *S. lycopersicum* 'VFNT' são plantas anuais e, assim como todas as outras espécies de tomate, são pubescentes e os tipos e a densidade dos tricomas são características valiosas na distinção das espécies. O caule é delgado e herbáceo, embora possa haver crescimento secundário na base. Possuem hábitos variáveis de ereto, semiprostrado a prostrado. As folhas são alternas, imparipinadas a bipinadas. As inflorescências são do tipo monocasial com flores tipicamente amarelas. Os frutos são do tipo baga com dois ou, raramente, mais lóculos, os quais são variáveis no tamanho, na forma, cor e pubescência (Peralta & Spooner, 2005).

S. pimpinellifolium L. é uma espécie conhecida popularmente como tomatinho ou tomate-groselha no Brasil. Caracteriza-se por ser uma erva daninha perene e nativa da América do Sul Ocidental, mais especificamente no sul do Equador, norte do Peru e o extremo oeste de vales de rios na costa do Pacífico, usualmente em altitudes menores que 1000 m. Seu fruto vermelho de aproximadamente 1 cm (**Figura 6**) pode ser consumido pelo homem, embora isso não aconteça comumente em seus locais de origem (Rick et al., 1977; Spooner et al., 2005; Moyle, 2008). Essa espécie é considerada autocompatível e alógama facultativa (Giordano et al., 2003). Assim como as outras espécies selvagens de tomate, é diploide ($2n = 24$) e pode ser cruzada com o tomate comercial (Peralta & Spooner, 2005).

Figura 5. Árvore obtida a partir de dados de AFLP e o algoritmo de agrupamento Neighbor-joining para classificação e análise filogenética de *Solanum*, seção *Lycopersicon*. Destacado em vermelho, encontra-se a seção *Lycopersicon*. Retirado de Zuriaga et al., 2009.

Figura 6. Fruto do tipo baga de *S. pimpinellifolium* apresentando 1 cm de diâmetro.

S. pimpinellifolium é considerado, por alguns autores, como o ancestral do tomate comercial (*S. lycopersicum* L.), sendo capaz de hibridizar espontaneamente com essa espécie, cujo genoma é divergente da espécie selvagem em 0,6%. Em muitos aspectos, *S. pimpinellifolium* pode ser considerado como uma miniatura de *S. lycopersicum* (Rick & Fobes, 1975; Moyle, 2008). *S. pimpinellifolium* foi utilizada em

cruzamentos para melhorar a coloração e a qualidade do fruto do tomate cultivado, além de ser fonte de genes de resistência contra os patógenos *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, *Fusarium oxysporium* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hans. e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e contra insetos e nematoides (Spooner et al., 2005; Moyle, 2008; Rao et al., 2012).

Solanum lycopersicum 'VFNT' é uma cultivar que possui os alelos *Ve*, *I*, *Mi* e *Tm-2²* que conferem resistência aos fungos *Verticillium* sp. e *Fusarium* sp., ao nematoide *Meloidogyne* sp. e ao vírus *Tobacco mosaic virus* (Pino-Nunes et al., 2009). O gene *Tm-2^a* foi introgridido na cultivar VFNT a partir da espécie *S. peruvianum* pelo grupo do professor Leonard J. Alexander em 1963 (Ganal & Tanksley, 1996; Tanksley et al., 1998)

S. lycopersicum 'VFNT' também é conhecida como VFNT Cherry e o número de acesso no *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC) é LA1221. É uma cultivar autógama e autocompatível. No site do TGRC, constam tanto o táxon *Solanum* quanto o *Lycopersicum*, que diz respeito à espécie que originou a cultivar. Para o primeiro, a espécie é *S. lycopersicum*, enquanto para o segundo, a espécie é *Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme* (TGRC, <http://tgrc.ucdavis.edu/>). Nesta tese, será adotada a nomenclatura proposta por Linnaeus e confirmada pelos estudos morfológicos e moleculares. Dessa forma, a var. *cerasiforme* será tratada como *S. lycopersicum* subsp. *cerasiforme* e serão dadas algumas informações sobre a espécie que deu origem à cultivar VFNT.

S. lycopersicum subsp. *cerasiforme* é originária do Peru, mais especificamente no sopé da *Ceja de La Montaña*, na região oriental dos Andes e em áreas do Equador e Bolívia. Também pode ocorrer na Colômbia. Essa subespécie era raramente cultivada pela população local e não era considerada de origem indígena. Na natureza, é encontrado apenas um indivíduo ou um grupo de poucos indivíduos em determinados locais (Rick & Holle, 1990).

O fruto dessa espécie é um pouco maior em relação ao de *S. pimpinellifolium* (Kimura & Sinha, 2008). Foi verificado que a presença do gene *Tm-2²* aumentou o rendimento total do fruto, o qual ficou com coloração mais avermelhada e apresentou maior rendimento de sólidos solúveis (Tanksley et al., 1998). Na **Figura 7** é possível comparar o tamanho do fruto de *S. pimpinellifolium* com o da cultivar VFNT de *S. lycopersicum*.

Figura 7. Comparação do tamanho dos frutos de *S. lycopersicum* 'VFNT' (esquerda) e de *S. pimpinellifolium* (direita). Escala apresentada em cm.

Sabe-se que *S. lycopersicum* e outras solanáceas podem sofrer o ataque do tomato mottle mosaic virus (ToMMV), mas ainda não há trabalhos que descrevam o tipo de interação entre *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* 'VFNT' com esse vírus.

1.2. Espécie viral – *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV)

A espécie *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) pertence ao gênero *Tobamovirus*, família *Virgaviridae* (do latim, virga = haste), a qual foi nomeada devido às partículas virais possuírem morfologia alongado-rígida.

Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) foi primeiramente proposto como nova espécie por Li e colaboradores (2013) a partir de plantas de tomate cultivadas em estufa no município de Tamazula, no estado de Jalisco no México em 2009. As plântulas apresentavam necrose nas folhas inoculadas que se iniciava rapidamente ou mosaico e distorção foliar nas plantas maduras. O material genético do vírus foi sequenciado e os autores propuseram como uma nova espécie do gênero *Tobamovirus*, a qual já foi aceita pelo comitê internacional de taxonomia de vírus (International Committee on Taxonomy of Virus - ICTV).

Após a ocorrência no México, o ToMMV já foi descrito em duas localidades nos Estados Unidos, sendo uma delas a Flórida (Webster et al., 2014) e outra em Nova Iorque (Padmanabhan et al., 2015). Também foi registrada sua ocorrência na China (Li et al., 2013), na Itália (Pirovano et al., 2015) em Israel (Turina et al., 2016) e na Espanha (Ambrós et al., 2017).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta de defesa de uma espécie selvagem de tomate (*Solanum pimpinellifolium*) e de uma cultivar de tomate (*Solanum lycopersicum* 'VFNT') frente à infecção artificial por tomato mottle mosaic virus (ToMMV, gênero *Tobamovirus*) e à injúria mecânica, por meio da análise de alguns sinalizadores como ácido salicílico, poliaminas, óxido nítrico; do sistema antioxidante não enzimático composto por ácido ascórbico e glutatona; e de análise metabolômica.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Material botânico

As sementes de *Solanum pimpinellifolium* L. e de *S. lycopersicum* 'VFNT' foram gentilmente cedidas pelo professor doutor Lázaro Eustáquio Pereira Peres, do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Essas sementes foram semeadas e cultivadas no Jardim do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia – USP para sua multiplicação e obtenção de quantidade suficiente para realizar um pré-ensaio e para o experimento. As folhas das plantas cultivadas foram aproveitadas para padronização de protocolos.

Para a realização do pré-ensaio e do experimento, as sementes foram superficialmente esterilizadas com etanol 70% por 3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio 5% por 15 min, lavadas com água destilada (Ryu et al., 2004; Catoni et al., 2009), semeadas em substrato autoclavado a 120 °C por 20 min e colocadas ao abrigo de luz por quatro dias para germinarem. Após 28 dias, foram transplantadas para vasos de 2 L utilizando-se substrato autoclavado misturado com vermiculita na proporção de 2:1.

3.2. Material virológico

O material utilizado para inoculação das plantas de *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* 'VFNT' foi um isolado de *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) pertencente à viroteca do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico de São Paulo.

3.3. Montagem do experimento

Para realização dos experimentos, aproximadamente 2000 sementes de *Solanum pimpinellifolium* e de *Solanum lycopersicum* 'VFNT' foram semeadas. Os experimentos foram realizados em períodos diferentes.

Após 28 dias, 300 plântulas de cada espécie foram transplantadas diretamente para vasos e mantidos em casa-de-vegetação. Os vasos foram divididos em três grupos com 100 plantas cada, sendo um controle, no qual as plantas não foram submetidas a nenhum tratamento (C); outro controle, no qual as plantas foram apenas friccionadas com o tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0 + sulfito de sódio a 0,5% – tampão de inoculação (T); e o tratamento, no qual as plantas foram inoculadas com uma solução de inóculo viral (I). O inóculo foi preparado na proporção de 1:3 (m/v) em presença do tampão de inoculação (**ver Capítulo 1 para maiores detalhes**). Em cada grupo, as 100 plantas foram divididas em cinco subgrupos correspondentes às coletas nos diferentes dias após a inoculação (DAI). Em cada subgrupo com 20 plantas, as amostras de folhas foram coletadas de 2 indivíduos, agrupadas e pesadas, totalizando um n=10 para as análises, com exceção da análise de óxido nítrico cujo n foi igual a 6.

A inoculação do vírus ocorreu 50 dias após a semeadura (DAS), assim como a fricção com o tampão de inoculação. Tanto as folhas inoculadas com o vírus quanto as friccionadas com o tampão de inoculação foram previamente polvilhadas com o abrasivo carborundum de modo a facilitar a entrada do vírus nas células da planta. As folhas foram coletadas em 1, 7, 14, 21 e 28 DAI para a realização das análises de óxido nítrico, ácido ascórbico, glutathione, poliaminas, ácido salicílico, compostos fenólicos por CLAE, metabólitos primários e secundários por CG-EM, bem como para quantificação viral por PTA-ELISA.

A reação para análise de óxido nítrico foi realizada com folhas frescas no dia da coleta. Para análise de compostos fenólicos, as folhas coletadas foram secas em estufa de circulação forçada a 40 °C por 4 dias. Para quantificação viral por PTA-ELISA, as folhas frescas foram pesadas e armazenadas em freezer a -80 °C. Para as demais análises, as folhas foram coletadas, pesadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e transportadas em gelo seco até estocagem em freezer a -80 °C. Os detalhes para cada uma das análises serão apresentados nos respectivos capítulos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrós, S., Martínez, F., Ivars, P., Hernández, C., Iglesia, F. De & Elena, S. F. (2017) 'Molecular and biological characterization of an isolate of *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) infecting tomato and other experimental hosts in a greenhouse in Valencia , Spain', *European Journal of Plant Pathology*, pp. 1–8. doi: 10.1007/s10658-017-1180-2.
- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M. & Teraoka, T. (2007) 'Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions', *Plant Biotechnology*, 24(1), pp. 135–147. doi: 10.5511/plantbiotechnology.24.135.
- Bekeko, Z. & Muluaem, T. (2016) 'Genetics of plant – pathogen interactions and resistance', *Journal of Genetic and Environmental Resources Conversation*, 4(2), pp. 123–134.
- Boualem, A., Dogimont, C. & Bendahmane, A. (2016) 'The battle for survival between viruses and their host plants', *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V., 17, pp. 32–38. doi: 10.1016/j.coviro.2015.12.001.
- Catoni, M., Miozzi, L., Fiorilli, V., Lanfranco, L. & Accotto, G. P. (2009) 'Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by *Tomato spotted wilt virus* reveals organ-specific transcriptional responses.', *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22(12), pp. 1504–13. doi: 10.1094/MPMI-22-12-1504.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B. J. (2006) 'Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response.', *Cell*, 124(4), pp. 803–14. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.008.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G. & Jaskiewicz, M. R. (2015) 'Priming for enhanced defense.', *Annual review of phytopathology*, 53(JUNE), pp. 97–119. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120132.
- Conti, G., Rodriguez, M. C., Venturuzzi, A. L. & Asurmendi, S. (2017) 'Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins', *Annals of Botany*, 119, pp. 737–747. doi: 10.1093/aob/mcw216.
- Cordeiro, M. & Grossi de Sá, M. (1999) 'Biotecnologia e resistência a patógenos', *Biotecnologia Ciência e desenvolvimento*, 2(10), pp. 34–39.

Darwin, S. C., Knapp, S. & Peralta, I. E. (2003) 'Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands : native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae)', *Systematics and Biodiversity*. pp. 29–53. doi: 10.1017/S1477200003001026.

Delledonne, M. (2005) 'NO news is good news for plants', *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), pp. 390–396. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.002.

Ding, S. & Voinnet, O. (2007) 'Review Antiviral Immunity Directed by Small RNAs', *Cell*, 130(10), pp. 413–426. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.039.

Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. (2010) 'Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions.', *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 11(8), pp. 539–548. doi: 10.1038/nrg2812.

Ganal, M. W. & Tanksley, S. D. (1996) 'Recombination around the *Tm^{2a}* and *Mi* resistance genes in different crosses of *Lycopersicon peruvianum*', *Theoretical and Applied Genetics*, 92(1), pp. 101–108. doi: 10.1007/s001220050099.

Gaur, R. K., Hohn, T., Sharma, P. Plant Virus–Host Interaction: Molecular Approaches and Viral Evolution. Waltham: Academic Press. 2014.401p.

Giordano, L. B., Aragão, F. A. S. & Boiteux, L. S. (2003) 'Melhoramento genético do tomateiro.' *Informe Agropecuário*, 24(219), pp. 43-57.

Glazebrook, J. (2005) 'Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens', *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp. 205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.

Hammond, S. M. (2005) 'Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway.', *FEBS letters*, 579(26), pp. 5822–9. doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.079.

Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. 'Response to plant pathogens'. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. editors. Biochemistry & Molecular biology of plants. West Sussex, 2015. p.959-1050.

Horváth, E., Szalai, G. & Janda, T. (2007) 'Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling', *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), pp. 290–300. doi: 10.1007/s00344-007-9017-4.

Hull, R. Matthews' plant virology. 4th ed. San Diego: Academic Press, 2002.1001p.

Huot, O. B., Nachappa, P. & Tamborindeguy, C. (2012) 'The evolutionary strategies of plant defenses have a dynamic impact on the adaptations and interactions of vectors and pathogens.', *Insect science*, 20(3), pp. 297–306. doi: 10.1111/1744-7917.12010.

ICTV, 2016. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (accessed 26.06.17).

Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2006) 'The plant immune system.', *Nature*, 444(7117), pp. 323–9. doi: 10.1038/nature05286.

Khan, T. A., Mazid, M. & Mohammad, F. (2011) 'Role of ascorbic acid against pathogenesis in plants, *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(3), pp. 222–234.

Kimura, S. & Sinha, N. (2008) 'Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop', *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(11), pp. 1–9. doi: 10.1101/pdb.emo105.

Li, R., Gao, S., Fei, Z. & Ling, K.-S. (2013) 'Complete genome sequence of a new tobamovirus naturally infecting tomatoes in Mexico', *Genome Announcements*, 1(5), pp. e00794-13. doi: 10.1007/s.

López-Gresa, M. P., Lisón, P., Kyong, H., Hae, Y., Verpoorte, R., Rodrigo, I., Conejero, V. & María, J. (2012) 'Metabolic fingerprinting of *Tomato Mosaic Virus* infected *Solanum lycopersicum*', *Journal of Plant Physiology*. Elsevier GmbH., 169(16), pp. 1586–1596. doi: 10.1016/j.jplph.2012.05.021.

Maleck, K. & Lawton, K. (1998) 'Plant strategies for resistance to pathogens', *Current Opinion in Biotechnology*, 9(2), pp. 208–213. doi: 10.1016/S0958-1669(98)80117-1.

McDonald, B. A. (2004) 'Population Genetics of Plant Pathogens', *Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-A-2004-0524-01.

Moyle, L. C. (2008) 'Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*).', *Evolution; international journal of organic evolution*, 62(12), pp. 2995–3013. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00487.x.

Nicaise, V. (2014) 'Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges', *Frontiers in Plant Science*, 5(November), pp. 1–18. doi: 10.3389/fpls.2014.00660.

Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. & Foyer, C. H. (2012) 'Glutathione in plants: An integrated

overview', *Plant, Cell and Environment*, 35(2), pp. 454–484. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x.

Padmanabhan, C., Zheng, Y., Li, R., Martin, G. B., Fei, Z. & Ling, K.-S. (2015) 'Complete Genome Sequence of a Tomato-Infecting *Tomato mottle mosaic virus* in New York.', *Genome announcements*, 3(6), pp. 151–152. doi: 10.1128/genomeA.01523-15.

Peralta, I. E. & Spooner, D. M. (2005) 'Morphological Characterization and Relationships of Wild Tomatoes (*Solanum* L. sect. *Lycopersicon*)', *Monographs In Systematic Botany*, 104, pp. 227–257.

Pino-Nunes, L. E., Figueira, A. V. de O., Neto, A. T., Zsogon, A., Piotto, F. A., Silva, J. A., Bernardi, W. F. & Peres, L. E. P. (2009) 'Induced Mutagenesis and Natural Genetic Variation in Tomato', *Acta Horticulturae*, 821, pp. 63–72.

Pirovano, W., Miozzi, L., Boetzer, M. & Pantaleo, V. (2015) 'Bioinformatics approaches for viral metagenomics in plants using short RNAs : model case of study and application to a *Cicer arietinum* population', *Frontiers in Microbiology*, 5, pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2014.00790.

Rao, E. S., Kadirvel, P., Symonds, R. C., Geethanjali, S. & Ebert, A. W. (2012) 'Using SSR markers to map genetic diversity and population structure of *Solanum pimpinellifolium* for development of a core collection', *Plant Genetic Resources*, 10(1), pp. 38–48. doi: 10.1017/S1479262111000955.

Resende, M. L. V., Salgado, S. M. L. & Chaves, Z. M. (2003) 'Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos', *Fitopatologia Brasileira*, 28(2), pp. 123–130. doi: 10.1590/S0100-41582003000200001.

Rick, C. M. & Fobes, J. F. (1975) 'Allozyme Variation in the Cultivated Tomato and Closely Related Species tomato variation in the cultivated X . Allozyme and closely related species', *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102(6), pp. 376–384.

Rick, C. M., Fobes, J. F. & Holle, M. (1977) 'Genetic Variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*: Evidence of Evolutionary Change in Mating Systems', *Plant Systematics and Evolution*, 127, pp. 139–170.

Rick, C. M. & Holle, M. (1990) 'Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance', *Economic Botany*, 44(3 Supplement), pp. 69–78. doi: 10.1007/BF02860476.

Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D. & Raffaele, S. (2014) 'Resistance to phytopathogens e tutti quanti: Placing plant quantitative disease resistance on the map', *Molecular Plant Pathology*, 15(5), pp. 427–432. doi: 10.1111/mpp.12138.

Ryu, C.-M., Murphy, J. F., Mysore, K. S. & Kloepper, J. W. (2004) 'Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway.', *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 39(3), pp. 381–92. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02142.x.

Sagor, G. H. M., Takahashi, H., Niitsu, M., Takahashi, Y., Berberich, T. & Kusano, T. (2012) 'Exogenous thermospermine has an activity to induce a subset of the defense genes and restrict *Cucumber mosaic virus* multiplication in *Arabidopsis thaliana*.', *Plant cell reports*, 31(7), pp. 1227–32. doi: 10.1007/s00299-012-1243-y.

Soosaar, J. L. M., Burch-Smith, T. M. & Dinesh-Kumar, S. P. (2005) 'Mechanisms of plant resistance to viruses.', *Nature reviews. Microbiology*, 3(10), pp. 789–98. doi: 10.1038/nrmicro1239.

Souza, V. C.; Lorenzi, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

Spooner, D. M., Peralta, I. E. & Knapp, S. (2005) 'Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]', *Taxon*, 54(February), pp. 43–61.

Tanksley, S. D., Bernachi, D., Beck-bunn, T., Emmatty, D., Eshed, Y., Inai, S., Lopez, J., Petiard, V., Sayama, H., Uhlig, J. & Zamir, D. (1998) 'Yield and quality evaluations on a pair of processing tomato lines nearly isogenic for the Tm² a gene for resistance to the tobacco mosaic virus', *Euphytica*, 99, pp. 77–83.

Thomma, B. P. H. J., Penninckx, I. A. M. A., Broekaert, W. F. & Cammue, B. P. A. (2001) 'The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*', *Current Opinion in Immunology*, 13(1), pp. 63–68. doi: 10.1016/S0952-7915(00)00183-7.

Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Segal Floh, E. I. & Scherer, G. F. E. (2006) 'Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings', *Plant and Cell Physiology*, 47(3), pp. 346–354. doi: 10.1093/pcp/pci252.

Turina, M., Geraats, B. P. J. & Ciuffo, M. (2016) 'First report of *Tomato mottle mosaic virus* in tomato crops in Israel', *New Disease Reports*, 33(1), p. 1. doi: 10.5197/j.2044-0588.2016.033.001.

Webster, C. G., Roskopf, E. N., Pierce, F., Lucas, L., Mellinger, H. C., Care, G. C., Adkins, S. & Pierce, F. (2014) 'First Report of *Tomato mottle mosaic virus* Infecting Tomato in the United States', 15(4), pp. 151–152. doi: 10.1094/PHP-BR-14-0023.In.

Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. (2005) 'Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites.', *Biotechnology advances*, 23(4), pp. 283–333. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003.

Zuriaga, E., Blanca, J. M., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdán, W. G., Morales, R., Nuez, F., Laura, M. B. Æ., Alicia, C. Æ., Rafael, Æ., Fernando, M. Æ. & Blas-Cerda, W. G. (2009) 'Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*', *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(1), pp. 39–51. doi: 10.1007/s10722-008-9340-z.

Capítulo 1: Identificação e caracterização molecular do isolado viral

RESUMO

Plantas infectadas por vírus apresentam sintomas característicos, como clorose, necrose, mosaico e enrugamento das folhas, quebra na coloração das flores, inibição do crescimento e deformação de toda a planta ou de partes dela, levando, muitas vezes à sua morte. Estes sintomas são evidências de uma infecção viral, porém não devem ser utilizados isoladamente como parâmetro para classificar famílias, gêneros e, principalmente, espécies de vírus. Nos primeiros relatos de espécies de vírus, os fitovirologistas utilizavam espécies de plantas hospedeiras diferenciais que respondiam às inoculações mecânicas desenvolvendo sintomas locais, sistêmicos ou ausência de sintomas. Este procedimento até hoje é de fundamental importância, porém, atualmente, outras ferramentas são necessárias para confirmar a identidade de um fitovírus, como testes de transmissão por artrópodes vetores (insetos, ácaros ou nematoides), observações de partículas e inclusões celulares ao microscópio eletrônico de transmissão, testes imuno enzimáticos (sorologia) e moleculares. Dentre estes testes, a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento do genoma viral são, atualmente, imprescindíveis para a correta identificação de um fitovírus. É importante destacar que as informações genômicas dos vírus (sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos) estão disponibilizadas em um banco mundial “GenBank”, o que permite a realização de estudos comparativos entre isolados de uma mesma espécie de vírus em várias culturas e em diferentes continentes. O objetivo desse capítulo foi caracterizar, molecularmente, um isolado do gênero *Tobamovirus* armazenado há 24 anos em tecido foliar de tomateiro desidratado em cloreto de cálcio a -20 °C. Primeiramente, o isolado de tobamovírus foi reativado por inoculação mecânica em tomateiros. Após a manifestação dos sintomas de mosaico e afilamento das folhas, foi realizada a extração do RNA total, visando o sequenciamento parcial do vírus abrangendo a porção que codifica a capa proteica e parte da proteína de movimento viral. Para o sequenciamento do genoma completo foi realizada a extração do RNA a partir de preparação purificada do isolado de tobamovírus. Pela comparação das sequências depositadas no “GenBank” constatou-se tratar de um isolado de *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), uma nova espécie do gênero *Tobamovirus* recentemente relatada causando danos à produção de solanáceas em diferentes continentes.

Palavras-chave: *Solanum*, vírus de planta, *Virgaviridae*.

Chapter 1: Identification and characterization of the viral isolate

ABSTRACT

Virus-infected plants display characteristic symptoms, like chlorosis, necrosis, leaf mosaic, crinkling, flower-breaking, stunting and distortion of the whole plant or some parts, all of which may cause the death of the plant. Symptoms are evidences of viral infections; however, they should not be used as the only parameters to classify families, genera and, mainly, virus species. In hindsight, plant pathologists used specific plants, which respond to experimental inoculations with local, systemic or no symptoms to designate virus species. This procedure is fundamental, nevertheless, nowadays, other tools are used to confirm plant viruses identities, like circle of vectors (insects, mites or nematodes), observation of particles and cellular inclusions in the electron-microscopic, immunoassay (serology) and molecular tests. Among them, the polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of viral genome are, nowadays, essential to the correct identification of a plant virus. Genomic information of virus (nucleotide sequences and deduced amino acids) are available in the worldwide bank "GenBank", allowing comparative studies between isolates of the same species in many crops and in different continents. This chapter aims to characterize, molecularly, an isolate from the *Tobamovirus* genus stored for 24 years in tomato foliar tissue dehydrated in calcium chloride at -20 °C. First, the isolate was reactivated through mechanical inoculation in tomato plants. After mosaic and leaf sharpening were observed, total RNA was extracted and a partially sequence of virus genome, comprising the specific region coding coat protein and part of the movement protein was conducted. To sequence total virus genome, RNA was extracted through purified preparation of the isolate. Comparing sequences from GenBank, it was possible to conclude that the viral isolate is the recently described specie known as *Tomato mottle mosaic virus*, which causes losses in solanaceous production in different continents.

Keywords: *Solanum*, plant virus, *Virgaviridae*.

1. INTRODUÇÃO

Plantas suscetíveis aos vírus podem apresentar uma gama de sintomas indicativos de infecção que podem ser inadequados para a correta identificação, uma vez que várias espécies de vírus podem induzir sintomas semelhantes em uma mesma espécie de planta hospedeira, como isolados de *Cucumber mosaic virus* (CMV, gênero *Cucumovirus*) que podem causar, em solanáceas, sintomas que podem ser confundidos com os sintomas causados por isolados de *Potato virus Y* (PVY, gênero *Potyvirus*) (Hull, 2002).

Dessa forma, desde os primórdios da fitovirologia, e ainda hoje, pesquisadores buscam por hospedeiras indicadoras que desenvolvam sintomas claros, característicos e consistentes que possam diferenciar espécies e até mesmo estirpes de uma mesma espécie de vírus. Diversas hospedeiras que se enquadram nessas características e que são muito utilizadas em diagnósticos rotineiros pertencem aos gêneros *Nicotiana*, *Chenopodium*, *Solanum*, *Cucumis*, *Phaseolus*, *Vinca* e *Brassica*. No entanto, um dos problemas da observação de sintomas nas hospedeiras é a indução de latência, quando a planta não desenvolve sintomas visíveis (Hull, 2002).

Assim, são necessários outros métodos que auxiliem a detecção e identificação dos vírus, como a microscopia eletrônica de transmissão (MET), técnicas sorológicas (imunoabsorção com enzima ligada ao anticorpo “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA”) e moleculares (reação em cadeia da polimerase “*Polymerase Chain Reaction* – PCR”). Na MET, as partículas virais são observadas em extratos foliares obtidos por maceração em tampão fosfato e adsorção em telas de cobre ou níquel e contração negativa com acetato de uranila, por exemplo. Como as partículas virais diferem morfollogicamente entre as espécies (**Figura 1.1**), essa informação é de grande importância como guia para a tomada de decisão dos posteriores testes sorológicos e moleculares. Porém, em alguns casos, os vírus que estejam em baixa concentração na planta hospedeira podem não ser observados.

Os métodos sorológicos se baseiam na ligação do antígeno viral com anticorpos desenvolvidos em animais em resposta a esses antígenos. Dentre as técnicas sorológicas, a mais amplamente utilizada é o ELISA como ferramenta de diagnóstico rotineiro como pesquisa. Os testes moleculares fornecem informações genéticas disponíveis a respeito do vírus e são muito acurados e sensíveis. Quando pelo menos uma parte do genoma do vírus é conhecida, podem ser desenhados

oligonucleotídeos (iniciadores) que se ligam ao genoma e possibilitam a ocorrência de uma reação da polimerase em cadeia (do inglês, *polymerase chain reaction* – PCR). Uma vez que a maioria dos vírus de plantas possui RNA como material genético, é necessário a realização da transcrição reversa que produzirá uma fita de DNA complementar (cDNA). Após a reação e amplificação de determinada parte do genoma viral, é necessária a realização de eletroforese em gel de agarose para visualizar e determinar o tamanho do material amplificado. Para isso, juntamente com as amostras amplificadas, são aplicados marcadores moleculares (Koenig & Lesemann, 2001; Jeong et al., 2014). Esse fragmento pode ser eluído do gel, purificado, sequenciado e comparado com sequências homólogas disponíveis em bancos de dados mundiais.

No entanto, quando nenhuma parte do genoma é conhecida, podem ser desenhados *primers* de acordo com espécies que sejam filogeneticamente próximas a de interesse (Koenig & Lesemann, 2001; Jeong et al., 2014). Nesse caso, as informações obtidas a respeito dos sintomas causados pelo vírus, a observação da morfologia da partícula viral e o resultado obtido pelo teste sorológico devem ser reunidas para que se possa desenhar um *primer* adequado. Esses resultados são importantes para que se possa descobrir, pelo menos, a família a qual pertence o vírus, pois um algoritmo de predição de *primers*, capaz de construir múltiplos *primers* compatíveis com diversas sequências de genomas de vírus demonstrou que não há sequências conservadas universais para esses patógenos, sendo possível, porém a construção de iniciadores específicos para cada família de vírus (Gardner et al., 2008). Assim, a observação das partículas virais através da microscopia eletrônica de transmissão poderia indicar a família a qual pertence o vírus e então, poderiam ser desenhados iniciadores para a realização da RT-PCR.

Com o advento do sequenciamento de nova geração, é possível realizar o sequenciamento completo do genoma de vírus de plantas em um curto período de tempo, auxiliando na identificação de novas espécies (Koenig & Lesemann, 2001).

De acordo com os critérios taxonômicos estabelecidos pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), os resultados obtidos a partir da associação das técnicas biológicas, MET, ELISA e PCR são de fundamental importância para a correta identificação ou descrição de uma espécie de vírus. Assim, atualmente, diante das características biológicas, morfológicas, da capa proteica e

genômicas, os vírus são classificados em famílias, gêneros e espécies (ICTV – <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

Figura 1.1. Representação das diferentes morfologias das partículas de vírus que infectam plantas. Retirado de 10th report of ICTV (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/introduction/w/introduction-to-the-ictv-online-report/424/virus-taxa-infecting-plants).

Espécies agrícolas largamente cultivadas, como o tomate, que segundo estimativas do Conselho Mundial de Tomate para Processamento (WPTC, da sigla em Inglês) teve uma produção mundial de mais de 39,3 milhões de toneladas, são comumente afetadas por uma vasta gama de espécies de vírus (Anuário Brasileiro do Tomate, 2016: <http://www.editoragazeta.com.br/flip/anuario-tomate-2016>).

1.1. Contextualização do problema

Amostras de tomate apresentando sintomas característicos de infecção por vírus foram coletadas na região de Capão Bonito, SP, em 1992. Após testes para identificação do agente causal, a presença do tomato mosaic virus (ToMV, gênero *Tobamovirus*) foi proposta (Caner et al., 1992).

Em 2013, visando ao estudo do efeito do ToMV nos sinalizadores de defesa de duas espécies de *Solanum*, esse isolado pertencente à viroteca do Instituto Biológico

de São Paulo, mantido desidratado em Cloreto de Cálcio a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi utilizado nos experimentos. A importância de espécies de Solanaceae nos estudos de interação planta-vírus e sua relação com espécies do gênero *Tobamovirus* já foram detalhadas na **Introdução Geral**.

Embora os testes sorológicos (ELISA-indireto) realizados com antissoro policlonal contra o ToMV tenham sido positivos, e visto que atualmente existem técnicas mais sofisticadas para confirmação de uma espécie de vírus, a identificação molecular desse isolado foi retomada. A partir do sequenciamento de parte do genoma viral, constatou-se que o tobamovírus proveniente de Capão Bonito, inicialmente identificado como um isolado de ToMV (Caner et al., 1992), apresentava menos de 90% de identidade em nucleotídeos da capa proteica com sequências homólogas desse vírus, indicando que poderia se tratar de outra espécie do gênero *Tobamovirus*.

1.2. *Tobamovirus*

Os tobamovírus pertencem à família *Virgaviridae* (do latim, virga = haste), a qual foi nomeada devido às partículas virais possuírem morfologia alongado-rígida (**Figura 1.2**). Essa família é constituída por outros seis gêneros: *Furovirus*, *Goravirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus* e *Tobravirus* (ICTV, 2016). Há quatro características que definem os membros dessa família: 1 – proteínas de replicação do tipo alfa, as quais formam uma família proteica específica; 2 – genomas com fita de RNA simples de senso positivo com uma estrutura do tipo 3'-t-RNA sem cadeia poliA; 3 – vírions (partícula viral madura) com formato de haste (morfologia alongada-rígida) de 20 a 25 nm de diâmetro e com um canal central; 4 – capa proteica de 19 a 24 kDa (King et al., 2012).

Figura 1.2. Eletromicrografia com contraste negativo de partículas de Tobacco mosaic virus (TMV) fixada com acetato de uranila. A barra representa 100 nm. Retirada de King et al., 2012.

As espécies de tobamovírus são transmitidas mecanicamente, através de sementes e por enxertia, não sendo conhecidos vetores. Uma vez que uma cultura está infectada por esse vírus, é muito difícil prevenir sua propagação durante o cultivo (King et al., 2012).

O genoma dos tobamovirus consiste de aproximadamente 6.3 a 6.6 kb que traduz quatro proteínas a partir de quatro diferentes “*Open reading frames*” (ORFs) (Figura 1.3).

Figura 1.23. Organização do genoma de tobacco mosaic virus (TMV). CP = coat protein (capa proteica); MP = movement protein (proteína de movimento); RT = readthrough (leitura do tipo contínua); sgRNA = RNA subgenômico. Retirado de King et al., 2012.

Duas dessas proteínas são traduzidas diretamente do RNA genômico e estão envolvidas na replicação (ORF 1 e 2). Uma delas possui cerca de 123 a 132 kDa e contém os domínios metiltransferase (Mtr) e helicase (Hel). A outra proteína, codificada diretamente do RNA genômico, possui cerca de 181 a 189 kDa e contém o domínio da polimerase, que é sintetizado por leitura contínua (do inglês, readthrough - RT) da terminação do códon fraco da ORF de 123 a 132 kDa (King et al., 2012). Essa leitura ocorre devido à falha na etapa de reconhecimento do códon de parada ou na liberação da cadeia polipeptídica do último tRNA, seguido da dissociação dos ribossomos do mRNA. Desse modo, os ribossomos continuam a tradução além do códon de terminação em direção à terminação 3' do mRNA. É importante ressaltar que esta leitura não é um mero erro de tradução, mas sim um evento no qual várias importantes proteínas são traduzidas (Ryoji et al., 1983).

As outras duas ORFs são traduzidas do sgRNA e codificam a proteína de movimento (PM) que apresenta 28 a 21 kDa e a capa proteica (CP) com 17 a 18 kDa. Em algumas espécies, a ORF que codifica a PM se sobrepõe à proteína de 181 a 189 kDa e a da CP, enquanto que em outras espécies, não há sobreposição de ORF ou apenas uma sobreposição é constatada. A sobreposição das ORFs da proteína de movimento e a proteína com 181K a 189K já foi representada, de forma didática, por King et al. (2012).

Os critérios que demarcam as espécies de tobamovirus de acordo com King et al. (2012), baseiam-se em: i) diferença da sequência total de nucleotídeos que, se for menor do que 10%, pode ser considerada como estirpe de uma espécie; ii) círculo de hospedeiras; iii) relações antigênicas entre as CPs.

2. OBJETIVO

Caracterização molecular do isolado de tobamovírus de Capão Bonito - SP, mantido armazenado sob desidratação em cloreto de cálcio (CaCl₂) desde 1992 (Coleção de vírus do Laboratório de Fitovirologia do Instituto Biológico), cuja identificação, baseada nas observações da morfologia das partículas ao MET, círculo de hospedeiras e relação sorológica indicavam se tratar de um isolado do *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Caner et al., 1992).

3. MATERIAL & MÉTODOS

Para a caracterização molecular foram executas duas etapas distintas: (i) Sequenciamento parcial do genoma viral a partir da extração do RNA total de *S. pimpinellifolium* inoculada experimentalmente com o isolado armazenado e RT-PCR com iniciadores específicos que codificam os segmentos da capa proteica e parte da proteína de movimento do gênero *Tobamovirus* e (ii) Sequenciamento completo do genoma viral a partir de preparações purificadas do isolado do tobamovírus de Capão Bonito (tobamovírus-CB) utilizando plataforma Illumina HiSeq 2500. Para tanto, seguiu-se o seguinte cronograma.

3.1. Extração de RNA total a partir de material foliar

O RNA total foi extraído a partir de folhas infectadas de *S. pimpinellifolium* utilizando o reagente Trizol® seguindo recomendações do fabricante. Primeiramente,

100 mg da amostra fresca foi pulverizada em nitrogênio líquido. Após a pulverização, foi acrescentado à amostra 1 mL de Trizol. Esta mistura foi incubada por 5 min a temperatura ambiente e, em seguida, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio que foi mantido sob incubação por 3 min a temperatura ambiente. Esta solução foi agitada e centrifugada a 12.000 rpm, por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foi acrescentado 0,5 mL de álcool isopropílico e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Mais uma vez, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. A seguir, a amostra foi lavada com 1 mL de etanol 70%, agitada em *vortex* e centrifugada a 7.500 rpm por 5 min a 4 °C. A fase aquosa foi descartada e o precipitado, após ter sido evaporado todo o etanol, foi ressuscitado em 0,04 mL de água com o auxílio de *vortex*.

3.2. Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A RT-PCR consistiu de três fases: 1) Desnaturação; 2) cDNA; 3) PCR. Para realizar a 1ª fase, foram utilizados 7µL da amostra de RNA extraído de acordo com o **item 3.1** de material foliar infectado por tobamovírus-CB (amostra), material foliar sadio (controle negativo) e material foliar infectado por tobamovírus (controle +), as quais foram submetidas à temperatura de 95 °C por 5 min em termociclador (PeltierThermalCycle – PTC 200). Na 2ª fase, foram adicionados aos mesmos tubos utilizados na 1ª etapa 13 µL de um mix contendo 3 µL de H₂O livre de RNase, 5 µL de tampão RT, 2 µL de dNTP (10mM), 2 µL do *primer* PAS1 e 1µL da enzima transcriptase reversa. Então, as amostras foram submetidas à temperatura de 42 °C por 1 h em termociclador. Após esse período, foi realizada a 3ª fase, a qual utilizou 2,5 µL do cDNA e 22,5 µL de outro mix contendo 8,5 µL de água MilliQ, 0,75 µL de MgCl₂, 5 µL de tampão PCR, 4 µL de dNTP (1,25 mM), 2 µL do *primer* antisenso PAS1 (5' CGATTTAAGTGGAGGGAAAAACAC 3'), 2 µL do *primer* senso PS1 (5' TCAGAAGAAGTTGTTGATGAGTTCA 3') e 0,25 µL da Taq polimerase. Então, as amostras foram submetidas a 7 ciclos em termociclador: 1 – 94 °C/3min; 2 – 94 °C/45s; 3 – 55 °C/60s; 4 – 72 °C/1min30s; 5 – repetição dos quatro primeiros ciclos por 35vezes; 6 – 72 °C/10min; 7 – 4 °C/∞. Convém destacar que os *primers* PAS1 e PS1 foram desenhados com base em regiões com alto grau de similaridade correspondentes a CP e PM de algumas espécies de tobamovirus (Alexandre et al., 2000).

3.3. Gel de agarose

Após realizada a RT-PCR, foi feito gel de agarose a 2% em TAE 1x acrescido de 1,5µL de brometo de etídio. Então, 25µL da amostra de cDNA amplificado acrescido de 5µL de tampão carreador foram aplicados no poço A do gel de agarose. No poço B foram aplicados 10 µL de marcador de peso molecular de 100 pb. No poço C e D, foram aplicados os controles positivo e negativo, respectivamente. Após essa etapa, a banda correspondente ao produto da PCR foi eluída do gel utilizando-se o kit Eppendorf Perfect Prep Gel Cleanup e submetida a sequenciamento direto pelo pesquisador Ricardo Harakava, do Laboratório de Bioquímica do Instituto Biológico.

3.4. Sequenciamento e análise das sequências

O produto da PCR foi sequenciado diretamente utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores PAS1 e PS1, o reagente Big Dyeterminator (Applied Biosystems) e o sequenciador automático ABI377 (AppliedBiosystems).

A sequência obtida foi submetida ao “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST – [WWW. ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) para comparação com as disponíveis no GenBank.

3.5. Purificação do vírus, microscopia eletrônica de transmissão e extração do RNA viral

Visando ao sequenciamento completo do tobamovírus-CB, optou-se por extrair o RNA viral a partir de preparação purificada do vírus. Para tanto, foi utilizado o método adaptado de Randles et al. (1976). Foram triturados 100 g de folhas frescas em 500 mL de tampão fosfato (TF) 0,1 M, pH 7,0. O extrato foi coado com gaze e mantido a -20 °C por 16 h. Após o descongelamento, o material foi centrifugado a 5860 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o volume foi medido para acréscimo de 2,5% de polietilenoglicol (PEG) e de 0,1 M de NaCl. A solução foi mantida sob agitação constante a 4 °C por 16 h e, após esse período, foi centrifugada a 5860 g por 10 min. O precipitado foi ressuspensionado em TF 0,01 M pH 7,0 (1/10 do volume do filtrado inicial) e, então, foi centrifugado a 5860 g por 10 min, o sobrenadante foi coletado e submetido à centrifugação a 80.000 g por 120 min. O precipitado foi ressuspensionado novamente em TF 0,01 M pH 7,0 (1/250 do volume do filtrado inicial) e centrifugado a

40.692 g por 30 min em gradiente de densidade linear de sacarose (0 a 50 %). A banda opalescente foi coletada e centrifugada a 80.000 g por 120 min e o precipitado foi ressuspenso em TF 0,01 M pH 7,0 (1/250 do volume do filtrado inicial). Todas as etapas foram realizadas em gelo.

Uma alíquota da preparação purificada, diluída na proporção de 1:50, foi analisada em espectrofotômetro (Shimadzu, Mod. UV-160 A) para a comprovação de sua pureza. O espectro de absorvância de UV tomado foi entre os comprimentos de 200 a 300 nm, pois uma preparação viral purificada deve absorver o máximo de UV a 260 nm e o mínimo a 245 nm. Este intervalo de absorção de UV foi utilizado pois, permite comprovar a presença somente dos componentes estruturais dos vírus na preparação analisada (ácido nucleico a 260 nm e proteínas a 280 nm).

Para a constatação da qualidade e preservação da integridade das partículas virais na preparação purificada recorreu-se à observação ao MET. Para isso, uma gota da amostra purificada foi depositada sobre uma microtela de suporte de cobre, permanecendo por 5 min. Após esse período, a telinha foi lavada com água destilada e foi aplicado o contrastante acetato de uranila 2%. Após 5 min, a telinha foi seca e observada ao microscópio eletrônico de transmissão.

O RNA viral foi extraído a partir de preparação purificada do tobamovírus-CB, seguindo o mesmo protocolo descrito no **item 3.1**. A qualidade do RNA viral foi verificada por meio de gel de agarose (**ver item 3.3**).

3.6. Sequenciamento completo e análises da sequência

O sequenciamento do genoma completo do vírus, assim como a montagem do genoma foram realizados no Centro de Genômica Funcional da ESALQ – USP. A preparação da biblioteca de cDNA foi feita utilizando o protocolo “TruSeq Stranded mRNA Sample Prep LS”, com modificações. Para isso, 0,1 a 4 µg do RNA viral foi purificado e foi realizada a fragmentação do mRNA. Após isso, a primeira e a segunda fitas do cDNA foram sintetizadas. Os adaptadores foram ligados e a amplificação por PCR foi realizada. Então, a biblioteca foi validada, normalizada e agrupada.

O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500 e as sequências contendo partes de RNA foram montadas após a subtração dos sRNA da planta hospedeira, utilizando os programas Tadpole (do pacote BBTools), usando o parâmetro k=15 e Trinity (versão 2.4.0). A identificação do vírus foi realizada

utilizando-se como referências sequências completas disponíveis nos bancos de dados.

O alinhamento da sequência obtida foi realizado com o auxílio do programa Clustal W e as comparações com as sequências existentes no GenBank foram obtidas por meio do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Após alinhamento da sequência obtida com outras de espécies de Tobamovirus disponíveis no GenBank e aceitas como definitivas pelo ICTV, análises de identidades em nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, além de análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se o programa PAUP v.4.0b10, sob o critério de máxima parcimônia (MP) e com o programa MEGA 7.0, sob o critério de máxima verossimilhança (MV), após estimar a substituição de nucleotídeos e a distribuição gama com o programa Modeltest v. 3.06 (Posada & Crandall, 1998). Análises de MV (PAUP v.4.0b10) com sequências do genoma completo do tobamovírus-CB, de ToMMV, de ToMV e de TMV disponíveis no GenBank, utilizando-se sequência de isolado de *Rehmannia mosaic virus* como grupo externo também foram realizadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sequenciamento da região codificante da capa proteica e parte da proteína de movimento

A revelação do gel de agarose, no qual foi aplicado o produto amplificado por RT-PCR com os iniciadores PAS 1 e PS 1 do tobamovírus-CB (**Figura 1.4**), indicou a presença de uma banda de tamanho esperado de cerca de 800 pb (poço a) na mesma altura do controle positivo (poço c).

Figura 1.4. a. Produto amplificado a partir da RT-PCR com iniciadores específicos para capa proteica e parte da proteína de movimento do tobamovírus-CB; b. marcador de peso molecular (100 pb – DNA ladder); c. Controle positivo; d. Controle negativo.

Após a eluição da banda obtida em gel de agarose, procedeu-se o sequenciamento do RNA viral cujo produto referente à sequência de nucleotídeos contendo 480 pb foi depositada no GenBank sob o número de acesso KT222999 e está representada na **Figura 1.5**.

Figura 1.5. Representação esquemática de parte do genoma de tobamovírus correspondente as ORFs 3 e 4 que codificam para proteína de movimento (PM) e capa protéica (CP), respectivamente, bem como as respectivas sequências de nucleotídeos do vírus isolado.

A busca no programa BLASTn utilizando apenas sequências correspondentes à capa proteica e parte da proteína de movimento do tobamovirus-CB resultou em 99% de similaridade tanto com espécies identificadas como ToMV (AF411922) quanto com as de ToMMV disponíveis no GenBank (**Tabela 1.1**). Nessa tabela constam a porcentagem de identidade em nucleotídeos e em aminoácidos.

Algumas sequências parciais (CP e/ou PM) identificadas como sendo ToMV do Brasil e Irã, disponíveis no GenBank, apresentaram identidade próximas a 99% quando comparadas a sequências de ToMMV, indicando que essas devam ser isolados de ToMMV.

Diante desses resultados, o sequenciamento completo do genoma com amostra purificada foi realizado, como mostrados nos itens a seguir, a fim de confirmação da identidade do vírus.

Tabela 1.1. Porcentagens de identidade em nucleotídeos (NT) e aminoácidos (AA) de sequência da região codificadora da capa proteica e de parte da proteína de movimento do isolado brasileiro de tobamovírus-CB, comparado a sequências homólogas de tomato mottle mosaic virus, tomato mosaic virus e tobacco mosaic virus disponíveis no GenBank.

Isolados	NT	AA
Número de acesso/Local de ocorrência		
tomato mottle mosaic virus (ToMMV)		
KR824951 (ToMMV – China)	99,2	100,0
KR824950 (ToMMV – China)	98,9	100,0
KP861748 (ToMMV – Israel)	99,4	99,4
KP861747 (ToMMV – Israel)	98,9	98,7
KP202857 (ToMMV – Estados Unidos)	99,6	100,0
KM000123 (ToMMV – Estados Unidos)	99,6	100,0
KT810183 (ToMMV – Estados Unidos)	99,6	99,4
tomato mosaic virus (ToMV)		
AF411922 (ToMV – Brasil)	99,6	98,7
AJ417701 (ToMV – China)	84,7	90,6
KR537870 (ToMV – Estados Unidos)	85,3	91,2
KJ207374 (ToMV – Taiwan)	85,1	89,9
NC002692 (ToMV – Australia)	85,5	91,2
tobacco mosaic virus (TMV)		
NC001367 (TMV)	76,5	83,0
AF395129 (TMV – China)	76,3	83,6
AF165190 (TMV – China)	76,5	83,0
FR878069 (TMV – Estados Unidos)	78,2	82,4

4.2. Purificação do vírus

A amostra purificada foi diluída 50 vezes e submetida à leitura de absorbância entre 200 a 300 nm em espectrofotômetro de UV-vis. O pico de absorção a 210 nm corresponde ao solvente. A preparação purificada apresentou curva típica de nucleoproteína (**Figura 1.6**) com uma razão A_{260}/A_{280} de 1,18. Importante destacar que esses valores para o ToMV e TMV, vírus que se relacionam sorologicamente com o tobamovírus-CB, são de 1,17 e 1,19, respectivamente (Hollings & Huttinga, 1976). A concentração viral foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$C = (A_{260} \times d)/E$, onde d = diluição da amostra; E = coeficiente de extinção. A absorbância da amostra em 260 nm foi igual a 0,952, a diluição usada foi de 1:50 (v/v) e o coeficiente de extinção utilizado foi igual a 3,0, referente ao do tobacco mosaic virus (TMV), assim como para outras espécies do gênero *Tobamovirus* (Martins et al., 2008). Dessa forma, foi possível calcular que, a partir de 100 g de folhas frescas, a amostra viral purificada possuía a concentração de 16 mg/mL.

Figura 1.6. Espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) de amostra purificada com a diluição de 1:50 (v/v).

A qualidade da preparação purificada foi avaliada por meio de observação de uma alíquota ao MET. Verificou-se a presença de muitas partículas com formato alongado-rígido, com tamanho de 300 nm aproximadamente, comprovando a integridade e características pertinentes ao gênero *Tobamovirus* (**Figura 1.7**).

Figura 1.7. Micrografia eletrônica de preparação purificada do isolado de tobamovírus-CB em contraste negativo. Foto: E. W. Kitajima.

4.3. Sequenciamento completo do genoma viral

A sequência completa do genoma do tobamovírus-CB possui 6428 nucleotídeos (**Figura 1.8**), com 4 ORFs, assim como os demais membros do gênero *Tobamovirus* (King et al., 2012). O códon de início das ORFs 1 e 2 está destacado em amarelo. A ORF 1 que codifica os domínios da metiltransferase e da helicase, apresenta o códon de parada destacado em rosa e apresenta 3351 nucleotídeos. A ORF 2 que codifica o domínio da polimerase, através de leitura contínua (*readthrough*), possui o códon de parada destacado em verde e apresenta 4851 nucleotídeos. Os códons de início e parada da ORF 3, que codifica a proteína de movimento, estão destacados em azul turquesa e apresenta 807 nucleotídeos e os da ORF 4 encontram-se destacados em vermelho e possui 480 nucleotídeos.

```
AACAACAACATTACATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAAC
ATTACATTTTACAATCTACAACCTACAATGCGATACACACAAACAGCTACATCTTCC
GCTTTGCTTGACACTGTCCGGGGTAACAACACCCTGGTCAATGATCTTGCAAAG
CGTCGTCTTTATGACACAGCGGTGATGAATTTAACGCTAGGGACCGCAGGCC
AAAGTTAACTTTTCTAAAGTAGTAAGTGAGGAACAGACACTTATTGCTACCCGGG
CATATCCTGAATTCCAGATCACGTTCTATAACACTCAGAACGCAGTTCACTCGCT
TGCGGGTGGTCTGCGATCATTAGAGCTGGAATATCTGATGATGCAAATCCCGTA
CGGCTCACTGACGTATGATATAGGAGGGAATTTTGCATCACATCTGTTCAAAGG
GCGAGCATACGTTCACTGCTGTATGCCGAATCTGGATGTCCGCGATATTATGCG
GCACGAAGGCCAAAAGGATAGCGTCGAGCTATACCTCGCTAGGCTAGAGAGGG
GCAACAAGTTTGTCCCGAACTTCCAAAAGGAAGCCTTTGACAGATACGCTGAAA
CGCCAGATGAAGTAGTTTGTACGATACCTTCCAAACCTGTAAGCACTCGCAAG
AGATGTACACAGGGAGAGTGTATGCTATTGCTCTGCATAGCATATACGACATAC
CAGCCGATGAGTTCGGCGCGGCATTACTTAGAAAGAATGTACATGTGTGCTATG
CCGCTTTCCACTTCTCCGAGAATTTACTTCTCGAAGATTCACACGTCAATCTCGA
TGAAATCAACGCATGTTTTTCAGAGAGACGGCGATAGGTTAACTTTCTCCTTTGCT
TCTGAGAGTACTCTTAATTATACGCATAGTTTTTCCAATATTTTAAAGTATGTGTG
CAAACTTACTTCCCAGCCTCTAATAGAGAGGTTTACATGAAGGAGTTTTTAGTA
ACTAGAGTAAATACCTGGTTTTGTAAATTCTCTAGAATAGATACTTTCCTATTGTA
CAAAGGTGTAGCGCACAAAGGTGTAGATAGTGAGCAATTTTACAAGGCAATGGA
AGACGCATGGCATTACAAAAAGACCCTCGCGATGTGCAACAGTGAGAGGATTCT
TTTAGAAGATTCCTCATCCGTCAACTACTGGTTTCCAAAAATGCGGGATATGGTG
ATCGTTCCGCTTTTTTGACATTTGTCTTGAAACCAGTAAAAGGTCACGCAAAGAGG
TCTTAGTGTCCAAGGATTTTGTTTACACAGTGTTAAATCATATCCGTACATACCAG
GCAAAAGCCCTGACATACGCTAATGTTTTATCCTTCGTGCAATCAATTCGTTTCA
GGGTGATCATTAAATGGAGTCACCGCTAGGTCTGAGTGGGATGTTGATAAATCAT
TATTACAATCCTTATCCATGACGTTTTTCTTACATACAAAGCTTTCTGTCTTAAA
GACGACTTATTGATAAGCAAGTTTAGCCTTGGTCCCAAACCATTGTCTCAACATG
TGTGGGAGGAGATATCATTAGCTTTTGGCAATGCCTTTCCAACAATTAAGGAAAG
ATTGATCAACCGTAAACTGATCCGAATCACGGAGAATGCGTTAGAAATCAGGGT
GCCTGATTTATACGTAACCTTCCATGATAGGTTGGTTTCCGAGTACAAGCTCTCA
```

GTCTGAGATGCCGGCGCTTGATATCAGGAAGAAAATGGAAGAGACCGAAGTTAT
GTACAATGCACTGTCAGAACTATCCGTTCTTAAAAATTCGGACAAGTTCGATGTT
GATGTTTTTTCCAGATGTGCCAATCTTTAGAAGTAGATCCTATGACTGCAGCGA
AGGTTATTGTGGCCGTGATGAGCAACGAGAGTGGTCTTACTCTCACGTTTGAGC
AGCCTACAGAAGCCAATGTTGCACTGGCACTTCAAGACTCTGAAAAAGCTTCGG
AAGGCGCGTTGGTAGTTACCTCGCGTGATGTGGAGGAACCCCTCTATGAAAGGTT
CAATGGCCCGTGGTGAGTTACAATTGGCCGGATTAGCAGGTGACATTCCAGAAT
CTTCGTTTACAAGGAGCGAGGAGATTGAGTCTTTAGAGCAGTTTCATATGGCAA
CAGCCAGTTCTCTGATTCAAAGCAGATGTGTTGATCGTGTACACAGGCACCA
TTAAAGTACAACAGATGAAAAACTTTATTGATAGTCTGGTAGCCTCGCTCTCTGC
TGCTGTTTTCGAACTTGGTGAAGATCCTCAAAGATACTGCTGCTATTGACCTTGAA
ACTCGTCAGAAGTTCGGAGTTCTGGACGTTACCTCAAAGAAATGGCTGATTA
CCATCCGCAAAGAACCATGCATGGGGTGTTGTGCGAAACACATGCTAGGAAATAC
CATGTGCGCCTTGCTGGAGTATGATGAGTTTGGAGTGATCACGTGCGACGATTGG
AGAAGGGTGGCCGTAAGTTCTGAATCAGTAGTATACTCTGATATGGCCAAGCTC
AAAACTTTGAGGAAGTTGCTCTTGGATGGAGAACCACCGGTTAGCTCTGCTAAG
GTTATACTGGTAGACGGCGTTCCGGGATGCGGGAAGACGAAGGAAATTCTATC
GAAGGTAACTTTGATGAAGACCTGATTCTCGTACCCGGTCGTCAAGCTGCTGA
GATGATCAGAAGAAGAGCGAACTCGTCGGGAGTAATAGTAGCCACAAAGGATAA
TGTTAGAACCGTCGATTCATTTATCATGAATTACGGGAAGGGAGGTCGCTGCCA
GTTCAAAGGCTTTTTTATTGATGAAGGATTGATGCTGCACACTGGTTGCGTGAAT
TTCTTGGTAACAATGTCTCTGTGCGATATTGCGTATGTATACGGAGACACCCAAC
AAATTCCATATATCAACAGAGTAACCGGATTTCCGTACCCTGCTCATTTTTTCAA
GCTGGAGGTGGACGAGGTGGAGACACGCAGAACTACGCTGCGTTGTCCGGCC
GATGTCACCCATTTCTTAAATCAGAGGTACGAAGGATATGTGATGTGCACTTCTG
CAGAAAAGAAATCGGTATCTCAAGAGATGGTTAGTGGGGCTGCCACAATCAATC
CAGTATCCAAACCACTCAGTGGAAAGGTCTTGACCTTTACACAATCTGATAAGGA
AGCACTGTTATCAAGAGGATATTCGGACGTCCATACTGTGCATGAAGTTCAAGG
TGAGACATATGCGGATGTGTGCTTAGTCAGACTGACTCCGACACCTGTATCCAT
CATTGCAAGGGACAGTCCCCATGTGCTTGTGCGATTGTGCGGGCACACAAAATC
GTTCAAGTACTACACCGTTGTCATGGATCCTTTGGTTAGTATAATTAGAGAATTA
GAACAGGTTAGTAGTTATCTCCTAGATATGTACAAGGTCGAGGCAAGTACTCAAT
AGCAATTACAGGTAGACTCAGTGTTTAAAGGTTCCAACCTTTTTGTTGCGGCACC
AAAGACCGGTGACATCTCTGATATGCAATTTTACTACGATAAGTGTCTTCCTGGG
AACAGTACGATGTTGAATAACTTCGATGCTGTTACCATGAAGTTGACTGACATTT
CTCTTAATGTCAAAGATTGCATATTGGACATGTCTAAGTCTGTGCGCAGCACCGAA
GGATGAGAAAGCGACTTTGATACCAATGGTACGAACGGCTGCAGAAATGCCAC
GCCAGACTGGACTATTGGAAAACCTTAGTTGCTATGATCAAAGGAACTTTAATTC
ACCTGAGTTGTCCGGAGTAGTTGATATTGAGAACACAGCCTCTTTAGTGGTAGA
TAAATTTTTTGATAGTTATTTGCTTAAAGAAAAAAGAAAACCAAACAAAAATTTTC
TTTGTTTAGTAGGGAGTCTCTCAATAGGTGGTTAGCCAAACAAGAACAAGTCACT
ATTGGGCAATTGTCTGATTTTGACTTTGTGGATCTGCCTGCAGTTGATCAGTATA
GACATATGATTAAAGCACAGCCGAAACAGAAGTTGGATACTTCCATTCAAACGG
AATATCCGGCTCTGCAGACGATTGTGTATCATTCTAAGAAGATCAATGCAATTTT
TGGACCGCTCTTCAGCGAACTGACAAGGCAACTACTGGACAGTGTTGACTCAAG
CAGATTTTTGTTCTTCACGAGAAAGACACCAGCTCAAATCGAAGATTTCTTCGGA
GATCTAGATAGTCATGTCCCATGGATGTGTTGGAGTTGGATATTTCAAATACG
ACAAATCTCAGAATGAGTTTCACTGCGCAGTAGAGTATGAAATCTGGAGAAGAC
TGGGTCTAGAAGATTTTCTGGCAGAAGTGTGGAAACAAGGGCATAGGAAAACCA

CTCTTAAAGATTACACAGCTGGTATAAAAAACATGTTTATGGTACCAGAGAAAGAG
TGGTGATGTTACAACCTTTCATAGGAAATACTGTCATTATCGCCGCGTGCCTAGCC
TCAATGTTACCGATGGAAAACTGATTAAAGGGGCGTTTTGTGGTGATGACAGT
CTGCTGTACTTCCCAAAGGGCTGTGAGTTCCCTGATATACAACAGGCTGCAAAC
TTAATGTGGAACCTTTGAAGCTAAGTTGTACAAGAAAAAGTACGGGTACTTCTGTG
GAAGGTACGTGATACATCATGATAGAGGTTGTATAGTATATTATGATCCTCTTAA
GTTGATTTCAAACTCGGTGCAAAACACATCAAGGATTGGGATCATCTAGAAGA
GTTTCAGAAGATCCCTCTGTGATGTTGCTGGCTCGTTGAACAATTGTGCGTATTAC
ATGCAATTGGACGACGCTGTTGGGGAGGTTCAATAAACCGCCCCCCTGGTTC
GTTTGTTTATAAAAGTTTAGTTAAATATCTGTCAGATAAGGTTTTGTTTAGAAGTTT
GTTTATCAATCGCTCTAACTGTTAGTGGTAAAGTTAGAATTAGCGAGTTTATCGA
CTTGTCTAAGTCAGAAAGGTTGCTGCCGTCTATGTTCACTCATGTTAAAAGCGTC
TCTGTCTCAAAGGTTGACAAGGTCATGGTTAATGAAGAAGATTCTTTGTCAGAAG
TCAACTTGTTGAAGGGCGTTAAACTTATAGATGGTGGTTACGTTTGTCTGGCTGG
TCTAGTAGTGTCGGTGAGTGGAATCTTCCAGACAATTGTCGTGGTGGTGTGAG
CATCTGCTTGGTCGATAAAAGAATGCAAAGAGCGGATGAAGCGACACTTGGATC
GTATTATACTGGAGCTGCAAAGAAAAGGTTCCAGTTTAAGATCGTTCCAACTAC
GCAATTACAACCTAAGGATGCAGAAAAGAACATATGGCAAGTCCTTGTTAATATTA
GGAATGTCAAGATGGCTGGGGGTTTTCTGTCCCCTGTGCTTAGAATTTGTGTCTG
TGTGTATAGTTTATAAAAATAATATAAAATTGGGTTTAAGGGAGAAGATTACAAGA
GTGGATGACGCAGGTCCCATTGAACTTACCGAAGAAGTTGTTGATGAGTTCATG
GAGAGTGTGCCTATGTCAGTCAGGCTTGCTAAATTTTGAACCAAATCCTCAAAAA
GAGGTCCGAAACATAATAGTAATAATACTAATGAAAGAAAAGGGCGGTCTAATTT
CCTTAAGAAACAAGACCAGGAGAGTTATGGAGTTAGTGATAGTTTAGATAATTTG
ATTGAAGATGATACCGAGACGTCAGTCGCGGGATCTGATTCGTATTAAATATGTC
TTACGCTATTACTTCTCCGTCACAATTCGTGTTTTTGTGTCATCAGCATGGGCCGAC
CCTGTAGAATTAATAAATATTTGTACTAATTCGTTAGGTAACCAGTTTCAAACACA
ACAAGCAAGGACTACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGAAACCTTTCCC
TCAAAGTACTGTCAGGTTCCCTGACAATGTATTTAAGGTGTATAGGTATAATGCG
GTTATAGATCCTCTAATTACTGCATTGCTGGGAACTTTTCGATACTAGAAATAGAA
TAATAGAGGTAGAAAATCAGCAAAGCCCGACTACAGCCGAAACATTGGATGCCA
CTCGCAGAGTGGACGATGCTACGGTTGCGATCAGGTCCGCTGTTAATAATTTAG
TTAATGAATTGGTAAGAGGAACAGGTTTCTACAACCAGAGTACTTTTGAAAGTAT
GTCTGGGTTGGCCTGGACTTCTGCGCCAGCGTCCATAAGTAATAAAGGACGAAAA
TTAAAGGAAGTGTATCCTAAAATACACGTGGTGCGTACGATAACGTACAGTGTTT
TTCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTTTGTCTTGGAACGCGCGGGTTAAATATACA
TGGTTCATGTATATCCGTAGACAAGTAATAATGCGTGGGATTCTGAATTCCCCCG
GAACCCCCGGTAGGGGCCCAATAATGCGTGGGATTCTGAATTC

Figura 1.8. Sequência completa do genoma do isolado tobamovírus-CB apresentando destaques para os códons de início e de parada das 4 ORFs. ORF1: codifica os domínios da metiltransferase e da helicase, apresenta o códon de início destacado em amarelo e códon de parada em rosa. ORF 2: codifica o domínio da polimerase possui o códon de início em amarelo e o de parada destacado em verde. ORF 3: codifica a proteína de movimento e possui os códons de início e parada destacados em azul turquesa. ORF 4: codifica a capa proteica e possui os códons de início e parada destacados em vermelho.

A análise da sequência através do programa BLASTn revelou alta porcentagem de identidade com isolados de *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), tanto para espécie nova recentemente descrita no México (Li et al., 2013), como também com

outros isolados de ToMMV descritos em tomate e pimentão nos EUA (Webster et al., 2014; Fillmer et al., 2015) e China (Li et al., 2014) disponíveis no GenBank (**Tabela 1.2**) e com um isolado de ToMV isolado de tomate no Brasil (AF411922), disponibilizado em 2002. Nessa tabela constam a porcentagem de identidade em nucleotídeos e em aminoácidos.

Tabela 1.2. Porcentagens de identidade em nucleotídeos (NT) e aminoácidos (AA) de sequência completa do genoma do isolado do tobamovírus-CB, comparado a sequências homólogas de tomate mottle mosaic virus, tomato mosaic virus e tobacco mosaic virus disponíveis no GenBank.

Isolados Número de acesso	NT	AA
tomato mottle mosaic virus (ToMMV)		
KR824951 (China)	98,9	99,5
KR824950 (China)	98,9	99,5
KP202857 (Estados Unidos)	99,1	99,5
NC022230 (México)	99,2	99,4
KT810183 (Estados Unidos)	99,1	99,5
tomato mosaic virus (ToMV)		
AJ417701 (China)	83,5	91,4
KR537870 (Estados Unidos)	83,7	91,9
KJ207374 (Taiwan)	83,7	91,7
NC002692 (Austrália)	83,7	91,9
tobacco mosaic virus (TMV)		
NC001367 (-)	78,5	88,4
AF395129 (China)	78,6	88,4
AF165190 (China)	78,4	88,4
FR878069 (Estados Unidos)	78,7	87,5

As porcentagens de identidade em nucleotídeos do tobamovírus-CB foram menores que 84 quando comparadas a sequências homólogas de ToMV. De acordo com um dos critérios de demarcação de espécies do gênero *Tobamovirus*, identidades menores que 90% indicam que são espécies diferentes (King et al., 2012). Diante disso, é possível sugerir que a espécie do presente trabalho trata-se do *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) e não do ToMV, como havia sido identificada inicialmente por Caner et al. (1992).

As relações filogenéticas de todas as espécies aceitas do gênero *Tobamovirus* foram construídas utilizando as sequências da região codificante da capa proteica sob o critério de máxima verossimilhança e estimadas com o programa MEGA 7.0 com robustez de 1000 réplicas de bootstrap. O modelo molecular evolutivo mais provável foi o HKY (Hasegawa-Kishino-Yano). A sequência de isolado de *Tobacco rattle virus*,

um tobavírus foi utilizada como grupo externo, pois esse gênero forma um grupo monofilético com os tobamovírus, na família *Virgaviridae* (King et al., 2012). Os nomes das espécies utilizadas para construir a árvore das relações filogenéticas, assim como o respectivo número de acesso no GenBank estão detalhadas na **Tabela 1.3**.

As análises filogenéticas, obtidas sob os critérios de MP e MV, utilizando-se sequências homólogas da CP também corroboraram com a identificação do tobamovirus-CB como sendo um isolado do ToMMV, uma vez que formaram um grupo irmão sustentado por um alto valor de bootstrap (**Figura 1.9**). Além disso, os isolados de ToMMV formaram um grupo monofilético com aqueles de ToMV e TMV, como era de se esperar, visto que essas duas espécies de tobamovirus relacionam-se sorologicamente. DAS-ELISA com antissoros policlonais para o ToMV e TMV detectaram os isolados de ToMMV de Israel (Turina et al., 2016).

Um grupo monofilético formado por tobamovírus que infectam solanáceas também foi observado. A topologia da árvore foi semelhante a obtida por Li et al. (2017), ao compararem sequência completa do genoma de um isolado chinês de ToMMV com aquelas homólogas de diversas espécies de tobamovírus. Em 1996, Lartey e colaboradores propuseram a divisão dos tobamovírus em três principais subgrupos, com base no genoma e círculo de hospedeiras (Solanaceae, Brassicaceae e Cucurbitaceae). Porém, com a identificação de novos isolados, os tobamovirus têm sido agrupados em, pelo menos, 8 subgrupos de acordo com suas hospedeiras Solanaceae, Brassicaceae, Cactaceae, Apocynaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Leguminosae e Passifloraceae (Li et al., 2017).

A árvore construída com o genoma completo de isolados de *Tomato mottle mosaic virus*, *Tomato mosaic virus* e *Tobacco mosaic virus* evidenciou que o isolado brasileiro de tobamovírus (tobamovírus-CB) formou um grupo monofilético com isolados de ToMMV. Além disso, o tobamovírus-CB é grupo irmão do isolado de ToMMV proveniente da Espanha (KU594507) e compartilham um ancestral comum com o isolado dos EUA (KP202857) (**Figura 1.10**).

Tabela 1.3. Espécies de vírus e número de acesso das sequências no GenBank usadas na análise filogenética.

Nome espécie	Acesso GenBank
<i>Bell pepper mottle virus</i>	DQ355023
<i>Brugmansia mild mottle virus</i>	NC010944
<i>Cactus mild mottle virus</i>	AJ557824
<i>Clitoria yellow mottle virus</i>	NC016519
<i>Cucumber fruit mottle mosaic virus</i>	JN226146
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	NC001801
<i>Cucumber mottle virus</i>	NC008614
<i>Frangipani mosaic virus</i>	HM026454
<i>Hibiscus latent Fort Pierce virus</i>	KP828049
<i>Hibiscus latent Singapore virus</i>	NC008310
<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i>	NC003610
<i>Maracuja mosaic virus</i>	NC008716
<i>Obuda pepper virus</i>	NC003852
<i>Odontoglossum ringspot virus</i>	U34586
<i>Paprika mild mottle virus</i>	NC004106
<i>Passion fruit mosaic virus</i>	HQ389540
<i>Pepper mild mottle virus</i>	KU646837
<i>Plumeria mosaic virus</i>	KX881422
<i>Rattail cactus necrosis associated virus</i>	JF729471
<i>Rehmannia mosaic virus</i>	KU133476
<i>Ribgrass mosaic virus</i>	JQ319720
<i>Sammons's Opuntia virus</i>	-
<i>Streptocarpus flower break virus</i>	AM040955
<i>Sunn-hemp mosaic virus</i>	-
<i>Tobacco latent virus</i>	AY137775
<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>	M34077
<i>Tobacco mosaic virus</i>	AY029262
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i>	KT383474
<i>Tomato mosaic virus</i>	AY063743
<i>Tropical soda apple mosaic virus</i>	KU659022
<i>Turnip vein-clearing virus</i>	U03387
<i>Ullucus mild mottle virus</i>	-
<i>Wasabi mottle virus</i>	KJ207375
<i>Yellow tailflower mild mottle virus</i>	KJ683937
<i>Youcai mosaic virus</i>	AB261175
<i>Zucchini green mottle mosaic virus</i>	NC003878
<i>Tomato mottle mosaic virus</i>	KT810183
<i>Tobacco rattle virus</i>	DQ448618

Figura 1.9. Árvore filogenética obtida sob o critério de máxima verossimilhança com o programa MEGA7.0 após determinação do modelo de substituição de nucleotídeos (HKY), utilizando a sequência genômica correspondente à capa proteica de todas as espécies aceitas de tobamovirus que possuem o genoma sequenciado. Sequência homóloga de isolado de *Tobacco rattle virus* foi utilizada como grupo externo. Números próximos aos ramos representam os valores de bootstrap (1000 réplicas).

É importante ainda destacar que, embora a primeira descrição comprovada de ocorrência do ToMMV tenha sido relatada recentemente no México (Li et al., 2013), certamente no Brasil já ocorria há, pelo menos, 10 anos. Moreira et al. (2003) relataram a ocorrência de um isolado com características diferentes de ToMV, no

Brasil, ao qual denominaram de estirpe intermediária. Comparações da sequência de nucleotídeos desse isolado, disponibilizada no GenBank sob o número de acesso (AF411922), em 2002, mostraram que, na verdade, trata-se de um isolado de ToMMV. Observação semelhante foi relatada também por Turina et al. (2016). Além disso, o tobamovírus-CB, descrito inicialmente como sendo um isolado de ToMV (Caner et al., 1992), porém, após sequenciamento do genoma completo, identificado como um isolado de ToMMV, é mais uma evidência de que essa espécie de tobamovírus já ocorria no Brasil desde a década de 1990. Devido à elevada semelhança entre as sequências de aminoácidos do ToMV e ToMMV, não seria surpreendente que muitas das infecções que estão sendo diagnosticadas como ToMV utilizando-se métodos sorológicos, sejam, de fato, ToMMV (Ambrós et al., 2017). Vale lembrar que o tobamovírus-CB, vem sendo monitorado por meio de antissoro policlonal contra o ToMV.

Figura 1.10. Árvore filogenética obtida sob o critério de máxima verossimilhança (PAUP, v. 4.0b10), após determinação do modelo de substituição de nucleotídeos (GTR + I + G, I=0,4521, G=1,0379), com sequências do genoma completo dos tobamovirus tomato mosaic virus (ToMV), tomato mottle mosaic virus (ToMMV) e tobacco mosaic virus (TMV), representadas pelos seus respectivos números de acesso no GenBank. Sequência homóloga de rehmanna mosaic virus foi utilizada como grupo externo. Sequência destacada refere-se ao ToMMV isolado brasileiro (tobamovírus-CB). Números próximos aos ramos representam os valores de bootstrap (1000 réplicas).

5. CONCLUSÃO

Tendo como referência os sintomas induzidos em tomateiros e plantas indicadoras do gênero *Nicotiana*, observações ao MET e sorologia (ELISA), o vírus estudado foi mantido e identificado, desde 1992, como sendo um isolado de ToMV obtido de amostras de tomateiros coletadas em área localizada no Estado de São Paulo (Caner et al., 1992).

Por meio de sequenciamento parcial e completo do genoma viral, foi observado que o isolado estudado possui 99% de similaridade com alguns isolados depositados como sendo o ToMV, mas também com uma nova espécie de tobamovirus, o *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), descrita recentemente no México. Os isolados depositados como sendo ToMV e que apresentaram 99% de similaridade com o isolado tobamovirus-CB, provavelmente foram identificados erroneamente, uma vez que a comparação de identidade de seus nucleotídeos pelo programa BLASTn evidenciou 99% de similaridade com os isolados de ToMMV.

O critério para a demarcação de espécie para tobamovirus estipula que um isolado com identidade genômica menor que 90% deve ser considerado como uma nova espécie (King et al., 2012). Dessa forma, pode-se afirmar que a espécie viral escolhida para esse estudo é o *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV-CB) e não uma estirpe de *Tomato mosaic virus* (ToMV). Além disso, pode-se também afirmar que o ToMMV já ocorria no Brasil desde a década de 1990, uma vez que o tobamovirus-CB, agora sabidamente ToMMV-CB, inicialmente identificado como um isolado de ToMV (Caner et al., 1992), vinha sendo mantido na Viroteca do Instituto Biológico, desde esse período. Este é o primeiro relato oficial de um isolado brasileiro de ToMMV com sequenciamento completo disponibilizado no GenBank.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, M. A. V, Soares, R. M., Rivas, E. B., Duarte, L. M. L., Chagas, C. M., Saunal, H., ... Richtzehain, L. J. (2000). 'Characterization of a strain of *Tobacco mosaic virus* from petunia'. *Journal of Phytopathology*, 148(11–12), 601–607. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00563.x>
- Ambrós, S., Martínez, F., Ivars, P., Hernández, C., Iglesia, F. De, & Elena, S. F. (2017). 'Molecular and biological characterization of an isolate of *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) infecting tomato and other experimental hosts in a greenhouse

- in Valencia, Spain'. *European Journal of Plant Pathology*, 1–8.
<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1180-2>
- Caner, J., Duarte, L. M. L., Rivas, E. B., Alexandre, M. A. V. & Oliveira, J. M. (1992) 'Ocorrência de dois vírus em tomateiros, na região de Capão Bonito, SP'. In: 5 *Reunião Anual do Instituto Biológico*, São Paulo. Resumos da 5 RAIB, p. 4-4.
- Fillmer, K., Adkins, S., Pongam, P., & Elia, D. (2015). 'Complete Genome Sequence of a *Tomato mottle mosaic virus* Isolate from the United States'. *Genome Announcements*, 3(2), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00167-15>.
- Gardner, S. N., Hiddessen, a L., Hara, C., Williams, P. L., Wanger, M. C., Henrikson, R. H., & Colston Jr., B. W. (2008). 'Multiplexing Short Primers for Viral Family PCR'. *Nucleic Acids Research*.
- Hull, R. Matthews' plant virology. 4th ed. San Diego: Academic Press, 2002.1001p.
- Hollings, M. & Huttinga, H. (1976) '*Tomato mosaic virus*'. Description of plant viruses. Acesso em [18.05.2017]. Disponível em: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=156>.
- ICTV, 2016. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (accessed 26.06.17).
- Jeong, J.-J., Ju, H.-J., & Noh, J. (2014). 'A Review of Detection Methods for the Plant Viruses'. *Research in Plant Disease*, 20(3), 173–181. <https://doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. San Diego: Academic Press, 2012. 1327p.
- Koenig, R., & Lesemann, D. (2001). 'Plant Virus Identification'. *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000769>
- Lartey, R. T., Voss, T. C. & Melcher, U. (1996) '*Tobamovirus* evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications.', *Molecular biology and evolution*, 13(10), pp. 1327–1338.
- Lefkowitz, E. J., Adams, M. J., Davison, A. J., Siddell, S. G. & Simmonds, P. (2017) 'Classification and Nomenclature of Viruses Online (10th) Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses'. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/introduction/w/introduction-to-the-ictv-online-report. Acesso em [07.07.2017].

- Li, R., Gao, S., Fei, Z., & Ling, K.-S. (2013). 'Complete genome sequence of a new tobamovirus naturally infecting tomatoes in Mexico'. *Genome Announcements*, 1(5), e00794-13. <https://doi.org/10.1007/s>
- Li, Y. Y., Wang, C. L., Xiang, D., Li, R. H., Liu, Y. & Li, F. (2014) 'First Report of *Tomato mottle mosaic virus* Infection of Pepper in China'. *Plant disease*. 98(10), p.1447. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0317-PDN>.
- Li, Y., Wang, Y., Hu, J., Xiao, L., Tan, G., Lan, P., ... Li, F. (2017). 'The complete genome sequence, occurrence and host range of *Tomato mottle mosaic virus* Chinese isolate'. *Virology Journal*, 14(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0676-2>
- Martins, R., Souto, E. R. De, Pedroso, J. C., Manuel, Á., Almeida, R., Augusto, A., ... Vida, J. B. (2008). 'Detection and Identification of TMV Infecting Tomato Under Protected Cultivation in Paraná State'. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(October), 903–909.
- Moreira, S., Eiras, M., Chaves, A., Galleti, S., & Colariccio, A. (2003). 'Caracterização de uma Nova Estirpe do *Tomato mosaic virus* isolada de Tomateiro no Estado de São Paulo'. *Fitopatologia Brasileira*, 28(6), 602–607.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (1998). 'MODELTEST: testing the model of DNA substitution'. *Bioinformatics*, 14(9), 817–818. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.817>
- Randles, W., Harrison, B. D., & Roberts, I. M. (1976). '*Nicotiana velutina mosaic virus*: purification, properties and affinities with other rod-shaped viruses'. *Ann. Appl. Biol.*, 84, 193–204.
- Ryoji, M., Hsia, K., & Kaji, A. (1983). 'Read-through translation'. *Trends in Biochemical Sciences*, 8(3), 88–90. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90256-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90256-6)
- Turina, M., Geraats, B. P. J., & Ciuffo, M. (2016). 'First report of *Tomato mottle mosaic virus* in tomato crops in Israel'. *New Disease Reports*, 33(1), 1. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.033.001>
- Webster, C. G., Rosskopf, E. N., Pierce, F., Lucas, L., Mellinger, H. C., Care, G. C., ... Pierce, F. (2014). 'First Report of *Tomato mottle mosaic virus* Infecting Tomato in the United States'. *Plant Health Progress*, 15(4), 151–152. <https://doi.org/10.1094/PHP-BR-14-0023>.

Capítulo 2: Sinalizadores e antioxidantes não enzimáticos na resposta de defesa das plantas

RESUMO

Estresses de origem biótica ou abiótica desencadeiam um processo complexo conhecido como sinalização que pode ativar respostas de defesa. Muitas moléculas participam na sinalização, como o óxido nítrico (NO), as poliaminas (PO) e o ácido salicílico (SA). Além disso, as plantas sob condição de estresse podem acumular grandes concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs), que também desempenham papel na sinalização. Para manter um nível estável nos níveis das EROs, as plantas possuem moléculas que as eliminam. Dentre elas, o ácido ascórbico e a glutathione são de grande importância por remover diretamente as espécies reativas ou por bloquear a cadeia oxidativa disparada por elas. Os objetivos desse estudo foram (i) analisar o processo de sinalização desempenhado pelo óxido nítrico, poliaminas e ácido salicílico em plantas infectadas por vírus e mecanicamente injuriadas, além de (ii) avaliar a influência do estresse mecânico e da inoculação viral no teor de ácido ascórbico e glutathione em *Solanum pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* 'VFNT'. Nas plantas suscetíveis (*S. pimpinellifolium*) houve aumento no teor de NO nos 1º e 7º dias após a inoculação (DAI) do vírus. Também houve aumento de SA livre no 7º DAI e de SA conjugado nos 14º, 21º e 28º DAI. A sinalização disparada pelas PO foi tardia, ocorrendo aumento no 28º DAI. Nas plantas resistentes (*S. lycopersicum* 'VFNT'), houve diminuição na concentração de NO e parece ter ocorrido sinalização decorrente do estresse mecânico no 1º DAI. Não houve diferenças significativas no teor de PO e SA nas plantas inoculadas com o vírus e injuriadas mecanicamente. Variações mais expressivas foram encontradas no teor dos antioxidantes nas plantas suscetíveis em relação às resistentes. O dano mecânico não influenciou no teor dessas substâncias. Pode-se afirmar que *S. pimpinellifolium* se encontrava sob estresse oxidativo, enquanto *S. lycopersicum* 'VFNT' apresentava-se em estado de homeostase.

Palavras-chave: estresse, óxido nítrico, poliaminas, ácido salicílico, ácido ascórbico, glutathione

Chapter 2: Signaling molecules and non-enzymatic antioxidants in the plant defense response

ABSTRACT

Biotic and abiotic stresses triggers a complex process known as signaling, which can activate defense responses. A great number of molecules participate in the signaling process. Among them, nitric oxide, polyamines and salicylic acid were addressed in this chapter. Besides, plants under stressful conditions can overproduce reactive oxygen species (ROS), which also play a role as signaling molecules. To maintain a steady-state level of ROS, plants possess a wide array of ROS-scavengers. Among them, ascorbic acid and glutathione are of great importance by directly removing ROS or blocking the oxidative chains triggered by them. The aims of this study were (i) to analyze signaling process developed by nitric oxide, polyamines and salicylic acid in virus-infected plants as well as in mechanical injured plants, and (ii) to evaluate the influence of mechanical stress and viral inoculation on the content of ascorbic acid and glutathione in *Solanum pimpinellifolium* and *S. lycopersicum* 'VFNT'. In the susceptible plant (*S. pimpinellifolium*), an increase in the content of nitric oxide 1 and 7 days after inoculation (DAI) was observed in the infected plants. Free salicylic acid content also increased at 7 DAI, and the conjugated form increased at 14, 21 and 28 DAI. Signaling played by polyamines was late, with an increase observed only 28 DAI. On the other hand, in the resistant plant (*S. lycopersicum* 'VFNT'), a decrease in the content of nitric oxide was observed in the infected plants and it seems that mechanical damage triggered a signaling pathway 1 DAI. Polyamines and salicylic acid did not show significant differences, both in infected plants and in mechanical injured ones throughout the experiment. The content of the antioxidants presented more variation in virus-infected of *S. pimpinellifolium* than of *S. lycopersicum* 'VFNT'. Mechanical stress did not influence the content of these compounds as viral presence did. Analyzing these results, it is possible to affirm that *S. pimpinellifolium* was under oxidative stress, while *S. lycopersicum* 'VFNT' was under homeostasis.

Keywords: plant stress, nitric oxide, polyamines, salicylic acid, ascorbic acid, glutathione.

1. INTRODUÇÃO

As respostas de defesa da planta são compostas por uma rede muito complexa e intrincada. Após a percepção de um estresse (**ver Introdução Geral**), seja ele de origem biótica ou abiótica, há uma via de sinalização composta por diversas substâncias. Dentre essas, três delas serão destacadas nesse capítulo: o óxido nítrico (NO), as poliaminas e o ácido salicílico.

Tanto o NO quanto o ácido salicílico desempenham importante papel na ativação das respostas de defesa da planta, atuando sinergisticamente para indução da expressão de proteínas relacionadas à patogênese (do inglês, *pathogenesis-related proteins* – PR proteins). Essas proteínas são quase indetectáveis em tecidos saudáveis e atingem concentrações detectáveis após infecção por um ou mais patógenos. Essas proteínas pertencem a 17 famílias diferentes e são agrupadas de acordo com propriedades biológicas e bioquímicas. Elas podem ter ação direta, como a inibição do crescimento do patógeno ou indireta, como indução de resistência na prevenção contra penetração de patógenos (van Loon et al., 2006; Stangarlin et al., 2011). Por outro lado, o ácido salicílico também pode antagonizar a via de sinalização do NO, de modo que o entendimento da complexidade da ação das substâncias na sinalização das respostas de defesa da planta ainda está em seu estágio inicial (Klessig et al., 2000).

Os três maiores metabólitos derivados do ácido salicílico são o ácido salicílico 2-O- β -D-glicose (SAG), o salicilato de metila 2-O- β -D-glicose (MeSAG) e o salicilato de metila (MeSA), sendo que a maior parte do ácido salicílico formado é metabolizado na forma de SAG (Dean et al., 2005) (**Figura 2.1**). O ácido salicílico pode ser sintetizado através de duas vias. Uma delas tem o isocorismato como precursor, enquanto na outra, a hidroxilação na posição orto do ácido benzoico origina o ácido salicílico (Shah, 2003). Após sua síntese, ocorrem diversas modificações da molécula do ácido salicílico, como glicosilação, metilação e conjugação com aminoácidos. Essas modificações inativam o ácido salicílico ao mesmo tempo em que permitem seu armazenamento e mobilidade, assim como possibilitam à molécula desempenhar sua função. A inativação da molécula se refere à perda de sua toxicidade e garante sua participação em outras funções. A glicosilação, por exemplo, permite seu armazenamento no vacúolo, garantindo a redução da toxicidade dessa molécula. A metilação também inativa a molécula, conferindo permeabilidade pela membrana,

assim como volatilidade, o que permite seu transporte a longas distâncias para desempenhar papel na sinalização das respostas de defesa. A conjugação com aminoácidos é um processo menos esclarecido, mas pode estar envolvido no catabolismo do ácido salicílico (Dempsey et al., 2011).

Figura 2.1. Representação dos três metabólitos derivados de ácido salicílico mais comumente encontrados. **a.** ácido salicílico 2-O-β-D-glicose (SAG), **b.** salicilato de metila (MeSA), **c.** salicilato de metila 2-O-β-D-glicose (MeSAG).

Diversos estudos sugerem que o ácido salicílico possui interação antagônica, dependendo da concentração, com o ácido jasmônico. Enquanto esse, juntamente com o etileno, é ativado em resposta a patógenos necrotróficos, o ácido salicílico é ativado em resposta a patógenos biotróficos (Grant & Jones, 2009). Os vírus são patógenos biotróficos por excelência (Glazebrook, 2005). Dessa maneira, as respostas de defesa para combater esses patógenos estão mais ligadas à ativação do metabolismo do ácido salicílico.

O óxido nítrico afeta a expressão de inúmeros genes que participam da defesa da planta, como os genes que codificam para as enzimas envolvidas na síntese de ácido jasmônico, do etileno e aquelas que participam da via dos fenilpropanoides (Chandok et al., 2003; Wendehenne et al., 2004).

A síntese do NO pode ocorrer no citoplasma a partir de nitrito com a participação da nitrato redutase (NR). Porém, em condições normais, essa síntese é baixa, pois a NR reduz o nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), preferencialmente. Já em condições especiais, como anóxia, na qual o nitrito atinge concentrações elevadas, a NR reduz NO_2^- a NO. Até o momento, não há evidências que a NR desempenhe algum papel na infecção por patógenos. Entretanto, a atividade da óxido nítrico sintase (do inglês, *nitric oxide synthase* – NOS), ainda que não tenha sido encontrado um gene ou uma proteína com sequência similar à enzima encontrada em mamíferos, já foi detectada em plantas (Guo, 2006) e poderia explicar a síntese de NO nesses

organismos. Também pode haver produção de óxido nítrico no cloroplasto e na mitocôndria através da transferência de elétrons da cadeia de transporte de elétrons para a molécula de nitrito pela atividade da enzima nitrito:NO redutase. Há produção de óxido nítrico no apoplasto e nos peroxissomos também. Durante as respostas envolvendo condições estressantes, o cloroplasto e os peroxissomos parecem ser as principais fontes de NO pela atividade da enzima NOS (Groß et al., 2013).

O mecanismo de sinalização pelo qual o NO exerce sua função na defesa da planta é através de reações químicas com proteínas relacionadas à defesa da planta, como a S-nitrosilação, que consiste na ligação covalente da porção do NO ao grupamento sulfidril dos resíduos de cisteína das proteínas-alvos, formando o S-nitrosotiol (SNO). Com essa reação, pode haver mudança na localização de determinada proteína ou modulação de sua atividade (Bellin et al., 2013). Outro mecanismo de defesa que o NO regula é a indução de genes relacionadas à defesa e a morte celular associada à resistência da planta (Romero-Puertas et al., 2004). Foi postulado, também, que em interações incompatíveis, o NO atua na inibição do sistema antioxidante da planta de modo a manter níveis elevados de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que seria tóxico para o patógeno (Zeier et al., 2004).

As poliaminas, que são encontradas em praticamente todas as espécies existentes, são reguladoras fundamentais do crescimento, diferenciação e morte celular. Nas plantas, elas são sintetizadas a partir da descarboxilação da ornitina, a qual origina a putrescina que é precursora da espermidina e da espermina. Também podem ser sintetizadas a partir da arginina por hidrólise da porção de guanidina e da ureia, formando assim putrescina (Dewick, 2009).

Para a ativação de respostas de defesa contra patógenos, deve haver a transmissão do estímulo externo para a célula através de vias de transdução de sinais, às quais são reconhecidas as participações das poliaminas (PAs). As poliaminas mais comumente encontradas são a putrescina (Put), a espermidina (Spd) e a espermina (Spm) (**Figura 2.2**).

O catabolismo das poliaminas ocorre sob a ação de duas enzimas conhecidas como amina oxidases. Uma delas é chamada de amina oxidase contendo cobre (do inglês, *copper-containing amine oxidases* – CuAOs) e a outra é denominada de poliamina oxidase contendo flavina (do inglês, *flavin-containing polyamine oxidases* – PAOs). Durante as respostas de defesa, essas enzimas são ativadas, ocasionando

Figura 2.2. Poliaminas mais comumente encontradas em plantas.

no catabolismo das poliaminas, liberando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual pode, dentre outras funções, participar na sinalização para a morte celular programada (Angelini et al., 2010). O H₂O₂ pode estar envolvido na síntese de óxido nítrico (Tun et al., 2006), cujo papel nas respostas de defesa já foi discutido anteriormente.

Diversos estudos com mutantes que possuem resistência comprometida contra patógenos já mostraram a complexidade das vias de sinalização no reconhecimento desses patógenos. Essa complexidade faz com que a planta possua flexibilidade para responder aos diversos patógenos pelos quais pode ser acometida, ativando estratégias de defesas apropriadas e suprimindo as respostas inapropriadas (Feys & Parker, 2000).

O estresse oxidativo, causado tanto pelos patógenos (ver **Introdução Geral**) quanto pelo próprio metabolismo das plantas, pode ser mitigado através de uma série de mecanismos. O aumento na atividade de enzimas como a catalase, as peroxidases, dentre outras, além da participação de antioxidantes não enzimáticos, como compostos fenólicos (detalhes no **Capítulo 3**), ácido ascórbico e glutatona são algumas das estratégias usadas.

O ácido ascórbico é uma cetolactona solúvel em água que possui dois grupos hidroxila ionizáveis (**Figura 2.3.a**), sendo a principal molécula com atividade antioxidante na planta. Pode ser encontrado em todos os compartimentos subcelulares, desempenha papéis na fotossíntese, na detoxificação de metais e xenobióticos, na regulação do crescimento e na defesa contra patógenos (Smirnoff, 2000; Du et al., 2012).

Figura 2.3. Representações esquemáticas **a.** da molécula de ácido ascórbico evidenciando os dois grupos hidroxila ionizáveis. **b.** da molécula de glutathiona reduzida.

A glutathiona é um tripeptídeo (γ-glutamilcisteinil glicina) (**Figura 2.3.b**) com alto potencial redutor. Sua estabilidade se deve à ligação γ-glutamil e o alto potencial nucleofílico da cisteína central que o torna um potente redutor, sendo um dos eliminadores de peróxido mais eficientes. Tais peróxidos podem ser provenientes tanto do metabolismo celular em condições não estressantes quanto do estresse oxidativo (May et al., 1998). Assim como o ácido ascórbico, a glutathiona desempenha papel na detoxificação de metais e xenobióticos, na defesa e na sinalização para produção de metabólitos secundários (Noctor et al., 2012).

Uma das maneiras de mitigar a ação das substâncias que causam o estresse oxidativo é através da ação conjunta do ácido ascórbico e da glutathiona, no ciclo conhecido como ascorbato-glutathiona. Nesse ciclo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) proveniente de reações da fotorrespiração, da fotossíntese ou da explosão oxidativa que pode ter sido causada pela presença do patógeno (ver **Introdução Geral**), é reduzido a água pelo ácido ascórbico, sendo essa reação catalisada pela ascorbato peroxidase (APX). Nessa reação, o ácido ascórbico pode se oxidar a duas formas. Primeiramente, ao radical monodehidroascorbato (MDHA), o qual pode se dismutar (reação de dismutação é aquela reação redox na qual a molécula é oxidada e reduzida ao mesmo tempo) tanto a ácido ascórbico quanto ao radical dehidroascorbato (DHA). Tanto o MDHA quanto o DHA são instáveis e possuem tempo de vida curto. Assim, esses dois radicais são reduzidos rapidamente a ácido ascórbico contribuindo para manter o *pool* intracelular dessa substância por meio de três enzimas. A monodehidroascorbato redutase (MDHAR) é a enzima que reduz o MDHA a ácido ascórbico e essa reação requer o gasto de uma molécula de NADH. A dehidroascorbato redutase (DHAR) reduz o DHA a ácido ascórbico e é dependente de glutathiona (GSH). Na redução do DHA a ácido ascórbico, a molécula de glutathiona é oxidada à sua forma

dimerizada (GSSG), que é então reduzida, regenerando a glutathione pela ação da enzima glutathione redutase (GR) (**Figura 2.4**) (Smirnoff & Wheeler, 2000).

Essas reações também ocorrem no estroma do cloroplasto, na mitocôndria e nos peroxissomos/glioxissomos. Na parede celular, a ascorbato oxidase (AO) reduz o ácido ascórbico a MDHA, que é então restaurado por um sistema citocromo b presente na membrana plasmática (Smirnoff & Wheeler, 2000).

Como descrito acima, os metabólitos ácido ascórbico e glutathione podem remover diretamente o H_2O_2 , que é uma espécie reativa de oxigênio (ERO), mas eles também podem proteger as células do dano oxidativo através do bloqueio das reações oxidativas em cadeia disparadas pelas EROs (Gara et al., 2003).

Além da reciclagem do ácido ascórbico, o *pool* de ácido ascórbico é mantido pela síntese *de novo* dessa substância, a qual ocorre a partir de moléculas de glicose, principalmente (Conklin & Barth, 2004).

Figura 2.4. Representação esquemática do ciclo ascorbato-glutathione. Modificado de Smirnoff & Wheeler, 2000. MDHA: monodehidroascorbato; DHA: dehidroascorbato; AsA: ácido ascórbico; NADH: nicotinamida adenina diclueotídeo reduzido; NAD: nicotinamida adenina diclueotídeo oxidado; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; GR: glutathione redutase; cAPX: ascorbato peroxidase citosólica; MDHAR: monodehidroascorbato redutase; DHAR: dehidroascorbato redutase.

É importante frisar que as EROs atuam na defesa das plantas contra os vírus, desempenhando dois papéis distintos dependendo da concentração em que se encontram. Em altas concentrações, são fitotóxicas, atuando na morte celular programada, a qual pode restringir o patógeno no local inicial da infecção. Por outro lado, em baixas concentrações, podem agir como moléculas sinalizadoras das respostas de defesa, como a ativação de antioxidantes (Dat et al., 2000; Hernández et al., 2015). As EROs são produzidas, principalmente, pelas NADPH oxidases localizadas na membrana plasmática ou pelo cloroplasto e mitocôndria na cadeia de transporte de elétrons (Groß et al., 2013). As proteínas dos *Tobamovirus* podem modular as vias de sinalização disparadas pelas EROs, afetando as respostas de defesa e a severidade dos sintomas (Conti et al., 2017).

2. OBJETIVOS

Avaliar a possível variação no teor dos sinalizadores óxido nítrico, poliaminas e ácido salicílico, assim como a atividade antioxidante desempenhada pelo ácido ascórbico e glutathione ocasionada pela fricção das folhas com o pistilo em relação às amostras que não foram submetidas a nenhum tratamento, além de avaliar a influência da presença do patógeno nesses mesmos parâmetros comparando amostras provenientes das plantas infectadas com as das plantas injuriadas mecanicamente em dois patossistemas diferentes: *Solanum pimpinellifolium*-tomato mottle mosaic virus (ToMMV) e *S. lycopersicum* 'VFNT'-ToMMV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

As amostras provenientes do experimento detalhado na **Introdução Geral** foram coletadas um dia após a inoculação (DAI) e semanalmente até completar 28 dias (1, 7, 14, 21 e 28 DAI). De cada grupo (Controle, Tampão e Infectadas), foram coletadas 10 amostras nos cinco períodos, totalizando 150 amostras por espécie.

Os sintomas característicos de infecção viral, quando presentes, foram observados e fotografados.

As amostras, exceto aquelas usadas para avaliar a concentração viral e para a análise de NO, foram coletadas, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até o momento da análise. O *n* amostral foi igual a 10. A análise da concentração do vírus foi realizada no Laboratório de Fitovirologia e

Fisiopatologia do Instituto Biológico com a colaboração dos pesquisadores Lígia M. L. Duarte e Alexandre L. R. Chaves. As análises de ácido salicílico e poliaminas foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Botânica (IB – USP) com a colaboração da professora Eny Floh e da especialista Amanda Macedo. Para o estudo do NO foi utilizado um n amostral igual a 6. As amostras foram processadas no momento da coleta e as análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento do Departamento de Botânica (IB – USP) com a colaboração do professor Luciano Freschi e do doutorando Rafael Zuccarelli.

3.2. Concentração viral (Plate-Trapped Antibody-Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay - PTA-ELISA)

As amostras foram preparadas a partir de folhas de *S. pimpinellifolium* e de *S. lycopersicum* 'VFNT' infectadas, as quais foram trituradas com tampão carbonato (TC) 0,05 M, pH 9,6 na proporção de 1:10 (m/v). Alíquotas de 50 µL de amostras foram aplicadas em placa de poliestireno de 96 poços e mantidas por 1 h e 30 min a 37°C. A seguir, a placa foi lavada por três vezes com Tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 contendo *Tween* 20 a 0,5%, para receber 50 µL do antissoro contra o tomate mosaic virus (ToMV) preparado em TF 0,1 M pH 7,2 *Tween* 20 a 0,5% e PVP a 2% (PBSTPo), na concentração de 1:5000 (v/v). Após incubação de 1 h e 30 min a 37°C, lavagem e secagem, foram adicionados 50 µL de anti-imunoglobulina de coelho conjugada à enzima fosfatase alcalina, diluída em PBSTPo na concentração de 1:30000 (v/v). A reação foi visualizada aplicando-se 50 µL de *p*-nitrofenil fosfato (análogo ao substrato da enzima), dissolvido em tampão substrato pH 9,8 na concentração de 1:10 (m/v). A intensidade da reação foi determinada por meio de leitura de absorbância a 405 nm em leitor de ELISA (Bio Rad, modelo 3550-UV).

Foram utilizados dois controles negativos. Um deles foi feito através de um *pool* de folhas provenientes do grupo Controle e outro com um *pool* de folhas do grupo Tampão.

3.3. Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico foi quantificado por espectrofluorimetria a partir de protocolo adaptado de Mioto & Mercier (2013), partindo de folhas frescas de *S. pimpinellifolium* e de *S. lycopersicum* 'VFNT'. Foram coletadas folhas de seis indivíduos e elas foram reunidas e fragmentadas. Os fragmentos foram pesados em seis tubos diferentes, de

modo a conter 250 mg de folhas em cada tubo de 15 mL. Após a pesagem, foi adicionado 1 mL de tampão de reação (solução de DAR (37,5µM) em tampão fosfato 50 mM (pH = 7,2)). As amostras foram incubadas por 30 min sob agitação branda e, após esse período, o tampão de reação foi transferido para outro tubo de 15 mL. Então foi adicionado mais 1 mL de tampão fosfato 50mM (pH = 7,2) às amostras e, logo em seguida, o tampão fosfato foi transferido para o tubo de 15 mL contendo o tampão de reação. Esse processo foi repetido mais uma vez, resultando em um volume de 3 mL, cuja concentração final do indicador foi de 5 µM. Essas amostras foram congeladas em -80 °C até o momento da leitura. No dia da leitura, as amostras foram centrifugadas de modo a precipitar resquícios foliares e a emissão de fluorescência (varredura entre 500-600 nm) de cada ensaio foi monitorada sob excitação de 560 nm em espectrofluorímetro e a quantificação da fluorescência foi calculada utilizando os dados referentes à emissão em 575 nm.

3.4. Poliaminas

A extração de poliaminas foi feita a partir de protocolo adaptado de Silveira et al. (2004), no qual 200 mg de folhas frescas de *S. pimpinellifolium* e de *S. lycopersicum* cv. VFNT foram maceradas com 1,4 mL de ácido perclórico (PCA) 5% por 1h. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 20.000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o pellet ressuscitado em 200 µL de PCA 5%. A amostra foi submetida à nova centrifugação e os sobrenadantes foram unidos para análise tanto das poliaminas livres quanto das conjugadas. Para análise das poliaminas conjugadas, foram adicionados 200 µL de ácido clorídrico 12 N a uma alíquota de 200 µL do extrato, sendo aquecidos a 110 °C por 19 h. Após esse período, a amostra hidrolisada foi seca em jato de N₂ e ressuscitada em 180 µL de PCA 5%.

Antes de se fazer a análise dessas substâncias, foi necessário fazer a derivatização com cloreto de dansil (dansilação), na qual 40 µL das amostras de poliaminas livres ou conjugadas extraídas foram adicionadas a um tubo de centrifuga de 600 µL, com 20 µL de diaminoheptano (DAH) 0,05 mM, 50 µL de solução saturada de carbonato de sódio e 100 µL de solução cloreto de dansyl (5 mg/mL de acetona - 1,8 mM). Os tubos foram lacrados, homogeneizados e incubados no escuro por 50min a 70 °C. Então, 25 µL de solução de prolina (100 mg/mL de água Milli-Q) foram adicionados, a solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a temperatura

ambiente no escuro. Após esse período, foram adicionados 200 µL de tolueno. As amostras foram agitadas e foram coletados 175 µL da fase orgânica, a qual foi seca em jato de N₂. As amostras foram ressuspensas em 175 µL de acetonitrila, dos quais 20 µL foram injetados em CLAE, com as seguintes especificações: coluna C18 250x4,6mm, 5 µm (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). A fase móvel foi composta por acetonitrila (A) e acetonitrila 10%, pH3,5 (B). A programação foi a seguinte: 0-11 min 65% de A em B, 11-25 min 65-100% de A em B, 25-35 min 100% de A. A detecção foi feita por detector de fluorescência a 340 nm de excitação e 510 nm de emissão.

3.5. Ácido salicílico

A análise de ácido salicílico (SA) foi feita a partir protocolo adaptado de Bueno (2014), no qual 500 mg de peso fresco de folhas foram pulverizados em N₂ líquido em microtubos de 2,0 mL. Foi adicionado 1 mL de MeOH 90%, vortexado por 1 min e sonificado por 5 min a temperatura ambiente. Então, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 5 min a 20 °C. O sobrenadante foi coletado em tubos de 2,0 mL e o pellet foi ressuspensado com 0,5 mL de MeOH. Os passos de sonificar e centrifugar foram repetidos e os sobrenadantes foram unidos, aos quais foram adicionados 10 µL de hidróxido de sódio 0,2 M. Após isso, as amostras foram secas em Speed Vac em temperatura ambiente até aproximadamente 50 µL. O resíduo foi ressuspensado em 250 µL ácido tricloroacético (TCA) 5% em água e vortexado. Após isso, foi realizada partição da amostra com 800 µL acetato de etila:hexano (1:1, v/v). Na fase superior orgânica estava solubilizado o SA livre e na fase aquosa inferior, o SA conjugado (SAG). As fases foram separadas e o particionamento foi repetido. Então as amostras de SA livre foram secas em Speed Vac em temperatura ambiente até aproximadamente 25 µL e ressuspensas em 150 µL MeOH. Para as amostras de SA conjugado, foi realizada hidrólise com 300 µL de HCl 8N, incubando por 1 hora a 80° C. Após esse período, as amostras foram particionadas adicionando 800 µL de acetato de etila:hexano e a fase superior foi coletada, sendo repetido o particionamento. Então as amostras foram secas em Speed Vac a temperatura ambiente e as amostras também foram ressuspensas em 150 µL de MeOH.

A análise de SA foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando como fase estacionária a coluna C18 de fase reserva (Supelcosil – LC 18). Como fase móvel, foi utilizado MeOH 75% em água acidificada com 0,5% de

ácido acético glacial (A) e MeOH (B). A programação foi a seguinte: 0 a 3 min - 25%B; 3 a 9 min - 60%B; 9 a 9,5 min - 100%B; 9,5 a 19,5 min - 100%B; 19,5 a 20,5 min - 25%B; 20,5 a 26 min - 25%B, com fluxo de 1 mL/min, com a temperatura da coluna a 40° C e injeção de 20 µL. O detector de fluorescência foi ajustado para 295 nm de emissão e 412 nm de excitação. A identificação e quantificação foram feitas através de curva de calibração com amostra autêntica de SA (Sigma, CAS 69-72-7).

3.6. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi extraído e quantificado a partir de protocolo modificado de Dias et al. (2011). Foram triturados cerca de 250 mg de folhas frescas, adicionados 3 mL de solução de extração (15 g de HPO_3 6% + 0,0465 g de EDTA (1mM) em 250 mL de H_2O), centrifugado por 10 min a 10.000 rpm a 2 °C e o sobrenadante foi coletado. Para análise do ácido ascórbico reduzido, a uma alíquota de 1 mL da amostra foram adicionados 4 mL de água. A amostra foi filtrada em unidade filtrante (membrana durapore 0,45 U de poro - Millex) e injetada em CLAE. Para análise do ácido ascórbico total, a uma nova alíquota de 1 mL da amostra foram adicionados 200 µL de Ditionitrito (DTT 0,2%) e 100 µL de K_2HPO_4 (45%). As amostras foram agitadas, deixadas no escuro por 20 min e depois foram acrescentados 200 µL de H_3PO_4 (2 M) e 3,5 mL de H_2O . As amostras foram filtradas com unidades filtrantes (membrana durapore 0,45U de poro - Millex) para novos tubos e injetadas em CLAE. A fase móvel isocrática foi constituída de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) diluído em 2 L de água, até atingir o pH = 2,3. A coluna utilizada foi a Zorbax XDB-C18 (5,0 µm/ 150X4,6mm), com fluxo de 1 mL/min. A programação foi: 0-4 minutos H_3PO_4 em água, com detecção a 245 nm e injeção de 10 µL.

A curva de calibração utilizada foi preparada a partir de padrão de ácido ascórbico (Sigma, CAS 50-81-7) nas concentrações de 2,5 - 35 µg/mL diluídas em solução de extração.

3.7. Glutathiona

A análise de glutathiona reduzida (GSSH), glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona total foi feita por protocolo adaptado de Israr et al. (2006) e de Rezende (2013).

A extração foi feita a partir de 500 mg de folhas com solução de extração (ácido sulfosalicílico 0,1%) na proporção de 1:2 (m/v). O material vegetal foi homogeneizado com a solução de extração com auxílio de homogeneizador Omni Tip em tubos de centrífuga de 15 mL, os quais foram mantidos em isopor com gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 20 min a 11.000 rpm em centrífuga Sorvall (modelo Legend RT+, Thermo Scientific).

O sobrenadante foi recolhido para tubos de 1,5 mL e armazenados a -20 °C até o momento da análise.

Para realização do branco da amostra, foram aplicadas na placa de poliestireno de 96 poços uma alíquota de 100 µL da amostra e 100 µL de EDTA 0,5 mM e a leitura foi feita a 412 nm. Como a leitura da glutathiona reduzida é feita com a adição de 10 µL de DTNB 3Mm, a leitura do branco da amostra foi corrigida para um volume de 210 µL. As leituras foram feitas em leitor de microplaca (Synergy™ H1, Biotek).

Para realização da leitura de glutathiona reduzida (GSSH) da amostra, foi adicionado ao mesmo poço acima 0,01 µL de DTNB 3 mM, o qual permaneceu sob agitação por 5 min. Após esse período, a leitura foi feita a 412 nm.

Para leitura de glutathiona total da amostra, foram adicionados 0,02 µL de NADPH 0,4 mM e 4 µL de glutathiona redutase à mesma amostra anterior, sendo feita a leitura da amostra a 412 nm após 20 minutos sob agitação e em presença de luz.

O cálculo para glutathiona oxidada (GSSG) foi realizado através da subtração da concentração de glutathiona reduzida (GSSH) da concentração de glutathiona total.

A curva de calibração utilizada foi preparada a partir de padrão de glutathiona reduzida (Sigma, CAS 70-18-8) nas concentrações de 1 - 80 µg/mL diluídas em solução de ácido sulfosalicílico 0,1%.

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do programa R versão 3.2.0 (2015-04-16) e do Graphpad Prism versão 6.0. Para as análises estatísticas, só foram levadas em conta diferenças significativas entre as substâncias dos grupos controle com tampão e tampão com infectadas em um mesmo dia após a inoculação. Não foram consideradas diferenças entre dias diferentes em um mesmo grupo ou em grupos diferentes. Para representar o grau de significância da análise, foram utilizados

os seguintes símbolos: * significativo ($p \leq 0,05$); ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$).

A normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade, pelo teste de Bartlett e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Quando as amostras apresentavam normalidade e homocedasticidade, a comparação dois a dois foi feita utilizando o teste t. Entretanto, quando nem todas as amostras apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Wilcoxon. As tabelas com os valores de normalidade, homocedasticidade e do teste dois a dois podem ser consultadas no **Apêndice I**.

Como a ideia principal era a de comparar apenas o grupo Controle com o Tampão e esse com o das Infectadas em um dia específico, se nesse dia os dados não apresentassem normalidade ou homocedasticidade, apenas esses foram transformados. Primeiramente, os dados foram transformados nas três operações mais comuns para se melhorar a normalidade: raiz quadrada, log e o inverso (Osborne, 2002). Caso nenhuma dessas operações fosse eficaz, foi aplicado o seno, o qual foi eficaz em todos os casos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão apresentados em dois blocos. No primeiro, serão mostradas as análises referentes à injúria mecânica em *S. pimpinellifolium*, assim como sua interação com ToMMV. No segundo bloco, serão abordadas as análises envolvendo a injúria mecânica em *S. lycopersicum* 'VFNT', bem como a interação com ToMMV.

4.1. Resultados obtidos para a espécie *S. pimpinellifolium*

A inoculação mecânica do vírus em *S. pimpinellifolium* resultou em sintomas típicos de infecção viral, os quais foram nítidos a partir do 14º DAI como ilustrado na **Figura 2.5**. Foi possível observar que o vírus causou diminuição do tamanho da planta, afilamento foliar, necrose, clareamento de nervura e mosaico. Os sintomas de mosaico e distorção foliar já foram observados por Li e colaboradores (2013) em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* 'Money-maker') infectadas pelo ToMMV. Outros sintomas observados nessa mesma cultivar foram epinastia, enrugamento sistêmico, rápida necrose e mosqueado foliar (Ambrós et al., 2017).

O aparecimento de sintomas evidentes no 14^o DAI pode ser explicado pela movimentação do vírus pela planta. Sabe-se que o tobacco mosaic virus (TMV), vírus com propriedades muito semelhantes ao ToMMV, atinge o floema com quatro dias após a inoculação, ocasionando infecção sistêmica cinco dias após a inoculação viral, estando disseminado por grande parte da planta após dez dias (Hull, 2002). Dessa forma, aos 14 dias após a inoculação, era esperado que os sintomas fossem nitidamente observados em *S. pimpinellifolium*, uma vez que o vírus, provavelmente, já se encontrava amplamente disseminado.

Figura 2.5. Sintomas causados pelo ToMMV em *Solanum pimpinellifolium*. **a.** Comparação da morfologia de folha sadia (esquerda) e infectada (direita). **b.** Necrose do folíolo apontada pela seta branca. **c.** Diminuição do tamanho da planta infectada (esquerda) comparado com a planta sadia (direita). **d.** Vista superior de afilamento dos folíolos de planta infectada. Fotos **b**, **c** e **d**: Alexandre L. R. Chaves (Instituto Biológico).

Esses sintomas indicam que as respostas de defesa da planta não foram ativadas a tempo para impossibilitar a ocorrência da doença. Assim, sugere-se que a interação entre *S. pimpinellifolium* e o ToMMV é do tipo compatível.

Os sintomas observados em *S. pimpinellifolium* podem ser decorrentes do estresse oxidativo causado pelo aumento das EROs, os quais podem degradar pigmentos e também podem oxidar o ácido 3-indol acético, produzindo substâncias que são inibidoras do crescimento da planta, levando a má formações foliares. Esse efeito foi observado em plantas de *Cucumis sativus* e *Cucurbita pepo* infectadas pelo cucumber mosaic virus (CMV) e pelo zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), nas quais houve aumento da atividade de peroxidases em áreas foliares coincidentes com a concentração viral (Riedle-Bauer, 2000).

Também se postula que o balanço entre o estresse oxidativo e os níveis de antioxidantes da planta desempenham papel importante na formação de sintomas, como má formação foliar, descoloração das folhas e crescimentos anormais da planta (Riedle-Bauer, 2000).

Os resultados referentes aos sinalizadores óxido nítrico, poliaminas e ácido salicílico, assim como a atividade antioxidante desempenhada pelo ácido ascórbico e glutatona serão abordados nos tópicos abaixo.

Concentração viral (PTA-ELISA)

O teste sorológico de PTA-ELISA pode ser utilizado para quantificação viral, uma vez que a retenção do anticorpo marcado com a enzima é proporcional à concentração viral (Clark & Adams, 1977).

Para a realização do ensaio no experimento com *S. pimpinellifolium*, foram utilizadas 2 placas e, em cada uma delas, foram aplicados os controles positivo e os negativos. Por essa razão, na **Figura 2.6**, observam-se duas barras vermelhas diferentes, as quais sinalizam quais amostras foram consideradas infectadas por apresentar valor de absorbância três vezes maior que o controle negativo.

A partir da **Figura 2.6**, é possível observar que a concentração viral no 1º DAI estava baixa, aumentando no 7º DAI, quando 80% das plantas apresentaram alta concentração viral e, no 14º DAI, 100% das plantas encontravam-se com altas concentrações virais. A concentração viral de 100% das amostras coincidiu com o aparecimento dos sintomas demonstrado no item acima.

Figura 2.6. Leituras de absorbância a 405 nm das amostras de *S. pimpinellifolium* infectadas com o ToMMV em diferentes DAI referentes ao 1º experimento com esse patossistema. As barras vermelhas representam 3 vezes o valor do controle negativo que é usado como referência para indicar se a amostra encontra-se infectada. DAI = dias após a inoculação.

É importante ressaltar que no 28º DAI, apesar do teste sorológico apontar que apenas 10% das plantas estavam com alta concentração viral, as plantas apresentavam sintomas bastante característicos. A baixa porcentagem das plantas infectadas nesse último dia analisado pode ter ocorrido devido a duas explicações mutuamente exclusivas: (i) a infecção foi tão drástica que diminuiu os recursos disponíveis para o vírus, causando a diminuição na sua replicação ou (ii) as respostas de defesa da planta foram eficazes nos períodos finais do experimento.

Óxido nítrico (NO)

Os resultados das análises estatísticas realizadas com os dados obtidos para o ensaio de NO encontram-se no **Apêndice I – Tabela I.1**.

Comparando-se o grupo Controle com o Tampão, nota-se que não houve diferença significativa, o que poderia demonstrar que a fricção mecânica nas folhas de *S. pimpinellifolium* não ativou as respostas de defesa que envolvem o NO (**Figura 2.7.a**). Em relação à influência do patógeno observada na comparação entre os grupos Tampão e Infectadas, foi possível notar aumento muito significativo no teor de NO nos 1º e 7º DAI nas plantas infectadas (**Figura 2.7.b**).

Figura 2.7. Leituras expressas em unidades arbitrárias de fluorescência relativas ao teor de óxido nítrico em *S. pimpinellifolium* em diferentes tratamentos e em diferentes DAI. **a.** Comparação entre os grupos Controle-Tampão. **b.** Comparação entre os grupos Tampão-Infectadas. DAI = dias após a inoculação; ** muito significativo ($p \leq 0,01$).

O aumento na concentração de óxido nítrico pode ocorrer em horas ou em poucos minutos após o reconhecimento do eliciador em interações planta-patógeno incompatíveis, como observado em *Glycine max* 'Williams 82' infectada com *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, na qual o aumento no teor de NO ocorreu apenas 6 horas após a inoculação do patógeno (Delledonne et al., 1998). Por outro lado, em interações compatíveis essa resposta pode ser mais demorada, como ocorreu com *Nicotiana tabacum* L. infectada pelo tobacco mosaic virus (TMV), no qual o aumento na concentração de NO ocorreu 12 horas após a inoculação (Foissner et al., 2000; Liao et al., 2013).

No patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV esse aumento foi significativo nos 1° e 7° DAI. Em interações compatíveis, como a observada entre *S. pimpinellifolium* e o ToMMV, as respostas de defesa são tardiamente ativadas ou mesmo nem ocorrem, enquanto que em interações incompatíveis, as respostas de defesa da planta são

prontamente ativadas, culminando na reação de hipersensibilidade em muitos casos (López-Gresa et al., 2012). Essa sinalização por meio do NO ocorreu antes da expressão dos sintomas evidentes no 14º DAI. Era esperado que nos 14º, 21º e 28º DAI, não houvesse variação no teor de NO, assim como ocorreu com *S. pimpinellifolium* infectado pelo ToMMV, pois o papel desempenhado pelos sinalizadores deve ocorrer no início da infecção.

Poliaminas

Os resultados das análises estatísticas realizadas com os dados obtidos para o ensaio de poliaminas encontram-se no **Apêndice I – Tabelas I.2, 3 e 4**.

As poliaminas foram identificadas e quantificadas através de curvas de calibração obtidas com amostras autênticas de putrescina, cadaverina, espermidina e espermina (0,0625 – 2,5 nmol/μL; $R^2 \geq 0,96$) (**Figura 2.8**). Só foi possível realizar a quantificação das poliaminas livres. Os resultados referentes a essas substâncias foram expressos em μg de poliamina/g planta. Os dados referentes à quantificação de cadaverina não foram submetidos à análise estatística, uma vez que, em muitas das amostras, o valor da concentração foi igual a zero.

Figura 2.8. Principais poliaminas encontradas em *S. lycopersicum* 'VFNT' e em *S. pimpinellifolium*. PUT = putrescina; CAD = cadaverina; DAH = diaminohexano (padrão); SPD = espermidina; SPM = espermina. A substância com tempo de retenção 3,282 min não foi identificada.

As comparações foram feitas dia a dia entre os grupos Controle com Tampão e Tampão com Infectadas. Para isso, foi realizado o teste t, com significância de 0,05.

Em *S. pimpinellifolium*, comparando-se o grupo Controle com o Tampão, pode-se observar que houve aumento da concentração de putrescina, espermina e espermidina no grupo Tampão nos 1° e 7° DAI, com maior significância para espermidina nos dois dias e espermina no 1° DAI. O fator primordial que diferencia os grupos Controle e Tampão é o estresse mecânico causado pela fricção do pistilo nas folhas de *S. pimpinellifolium* no segundo grupo. Dessa maneira, o aumento na concentração dessas substâncias pode ter sido causado como resposta a esse estímulo mecânico (**Figura 2.9.a, b e c**). Já foi sugerido que o catabolismo das poliaminas, com a consequente produção de peróxido de hidrogênio, está envolvido no processo de cicatrização de ferimentos da planta devido à ativação do domínio polifenólico da suberina mediada por peroxidase e a síntese de lignina em plantas de milho (*Zea mays* L.) injuriadas mecanicamente, com o consequente fortalecimento da parede celular e de eventos de lignosuberização (Angelini et al., 2008).

Quando comparados os grupos Tampão e Infectadas, nota-se aumento extremamente significativo na concentração de putrescina, espermidina e espermina no 28° DAI nas plantas infectadas (**Figura 2.9.d, e e f**).

Como já explicado anteriormente, a interação entre *S. pimpinellifolium* e ToMMV é do tipo compatível. Em interações desse tipo foi demonstrado que não houve mudanças no teor de poliaminas em plantas de *Nicotiana tabacum* nn infectadas com o tobacco mosaic virus (TMV) em qualquer um dos períodos analisados. Por outro lado, na interação incompatível com *N. tabacum* NN, resistente ao TMV, houve aumentos significativos na concentração dessas substâncias (Marini et al., 2001). Cabe ressaltar que o tempo final das análises do estudo de Marini e colaboradores (2001) correspondeu a três dias após a inoculação e os autores sugerem que a não detecção de diferenças significativas na concentração de poliaminas nas plantas suscetíveis de tabaco seja devido à incapacidade genética de reagir à inoculação viral em termos de metabolismo das poliaminas. No caso de *S. pimpinellifolium*, além de ter ocorrido aumento na concentração de poliaminas no 28° DAI nas plantas infectadas, também houve aumento na concentração dessas substâncias no 1° e 7° DAI nas plantas mecanicamente injuriadas.

A incapacidade genética mencionada por Marini e colaboradores (2001) pode estar relacionada à ausência dos genes de resistência nas plantas suscetíveis, assim como *S. pimpinellifolium*, provavelmente, não possui gene de resistência contra o

ToMMV. Por esse motivo, a resposta do tipo ETI (**ver Introdução Geral**) não é ativada e não ocorre aumento na concentração de poliaminas nas plantas infectadas nos períodos iniciais da infecção. Por outro lado, o aumento na concentração de poliaminas nas plantas injuriadas mecanicamente não está relacionado à interação gene a gene, mas provavelmente seja uma resposta basal ativada em decorrência do estresse mecânico.

Figura 2.9. Concentração de poliaminas livres (µg poliamina/g planta) em extrato de folhas de *S. pimpinellifolium* não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de **a.** putrescina, **b.** espermidina e **c.** espermina entre os grupos Controle e Tampão. Comparação da concentração de **d.** putrescina, **e.** espermidina e **f.** espermina entre os grupos Tampão e Infectadas. DAI = dias após a inoculação; * significativo ($p \leq 0,05$); ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$).

Entretanto, no patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV, houve aumento na concentração de poliaminas no 28º DAI, período que não foi analisado no estudo de

Marini e colaboradores (2001). Tal fato poderia ser explicado pelo mesmo argumento utilizado com as respostas observadas para o NO, as quais foram ativadas tardiamente (López-Gresa et al., 2012). Além disso, já foi sugerido que as poliaminas desempenham papel de defesa em estágios intermediários ou finais da infecção (Yamakawa et al., 1998).

A comparação da concentração das poliaminas no 28º DAI das plantas infectadas com a do 1º DAI das plantas injuriadas mecanicamente mostra que não há variação significativa entre os valores de putrescina e de espermidina (**Apêndice I – Tabela I.19**), ou seja, houve o catabolismo de espermidina nos 1º e 7º DAI nas plantas infectadas, mas houve a restauração da concentração basal. No caso da espermina, só houve o catabolismo no 1º DAI e no último dia da análise, a concentração dessa substância foi maior do que a basal.

Outro estudo realizado com *N. tabacum* sugere que há diminuição da concentração das poliaminas putrescina e espermidina, independentemente do patógeno, de acordo com a severidade dos sintomas. Nesse estudo, foi observado que o declínio no teor dessas substâncias nitrogenadas em *N. tabacum* inoculada com diferentes tipos de patógenos, incluindo o TMV, coincidia com o aparecimento dos sintomas (Edreva, 1998).

Os sintomas em *S. pimpinellifolium* infectado com o ToMMV foram evidentes a partir do 14º DAI (**Figura 2.5**), os quais provavelmente começaram a surgir entre o 7º e o 14º DAI. Houve declínio significativo na concentração de espermidina nos 1º e 7º DAI e muito significativo no teor de espermina no 1º DAI (**Figura 2.9.e, f**) nas plantas infectadas. No estudo conduzido por Edreva (1998), os sintomas causados pelo vírus foram brandos, enquanto que no presente estudo os sintomas foram mais severos. Dessa forma, como Edreva concluiu em seu estudo que a diminuição do teor de poliaminas estava relacionado com o nível de dano causado pelo patógeno, o possível declínio no teor de espermina e espermidina encontrado antes do aparecimento dos sintomas em *S. pimpinellifolium*-ToMMV pode ser explicado pela severidade dos sintomas.

Outra explicação para a diminuição na concentração dessas substâncias pode ser baseada no catabolismo das poliaminas, o qual ocorre com a participação de duas enzimas genericamente chamadas de amina oxidases. Uma delas é a amina oxidase contendo cobre (do inglês, *copper-containing amine oxidases* - CuAO) e a outra é a

poliamina oxidase contendo flavina (do inglês, *flavin-containing polyamine oxidases* - PAO). A primeira está envolvida no catabolismo de putrescina, enquanto que a segunda está envolvida na quebra de espermidina e espermina. A oxidação das poliaminas leva à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual está ligado ao reforço da parede celular, à reação de hipersensibilidade e também à produção de precursores de metabólitos secundários envolvidos na defesa da planta (Cona et al., 2006; Angelini et al., 2008). Além disso, o peróxido de hidrogênio pode estar envolvido na síntese de NO, como observado em estudo feito com *Arabidopsis thaliana*, o qual demonstrou que a aplicação exógena de poliaminas, principalmente espermina e espermidina e não com putrescina, induziu a síntese de NO (Tun et al., 2006; Angelini et al., 2010; Wimalasekera et al., 2011).

No patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV houve diminuição significativa na concentração de espermidina nos 1° e 7° DAI e diminuição muito significativa no teor de espermina no 1° DAI (**Figura 2.9.e, f**). A diminuição na concentração dessas duas substâncias pode estar ligada às reações do catabolismo, as quais teriam levado à produção de H_2O_2 que, como explicado no parágrafo anterior, estaria envolvido na síntese de NO. Dessa maneira, o catabolismo de espermidina e espermina, mas não o de putrescina, poderia estar envolvido com a síntese de NO nas plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas pelo ToMMV, uma vez que ocorreu aumento na concentração dessa substância (**Figura 2.7.b**) no mesmo período em que houve a diminuição na concentração das poliaminas.

Entretanto, a relação entre NO e poliaminas parece não ser completamente esclarecida. Liao et al. (2013), em uma pesquisa feita com espécies de Solanaceae infectadas pelo TMV, demonstraram que a aplicação exógena de inibidor de peróxido de hidrogênio não influenciou nos teores de NO, enquanto que a presença de inibidor de NO afetou a concentração de peróxido de hidrogênio. Essas constatações levaram os autores a afirmar que o peróxido de hidrogênio seria derivado do NO e não o contrário. Nesse mesmo artigo, apesar desses resultados terem sido observados nas três espécies de Solanaceae estudadas, os autores alegam que a comunicação entre peróxido de hidrogênio e NO pode variar de acordo com a espécie estudada, com as condições em que a planta se encontra e até mesmo de acordo com os diferentes tipos de estresse.

Apesar do patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV ser muito semelhante ao do estudo de Liao e colaboradores (2013), os resultados obtidos com as poliaminas e o NO são mais condizentes com as observações mostradas por Tun e colaboradores (2006), nas quais o NO seria derivado do H₂O₂ e não o contrário.

Ácido salicílico

Os resultados das análises estatísticas realizadas com os dados obtidos para o ensaio de ácido salicílico encontram-se no **Apêndice I – Tabelas I.5, 6 e 7**.

Nas plantas friccionadas com o tampão, não houve diferenças significativas, na forma livre, conjugada e total do ácido salicílico (**Figura 2.10.a, b e c**), indicando que o estresse mecânico causado pela fricção do tampão não foi suficiente para desencadear alguma mudança nessa substância. Por outro lado, o teste t apontou diferenças extremamente significativas na comparação da concentração de ácido salicílico livre entre os grupos Tampão e Infectadas no 7º DAI em *S. pimpinellifolium*. Na **Figura 2.10.d**, é possível observar aumento na concentração dessa substância nas plantas infectadas da ordem de quase quatro vezes. Além disso, também foi possível observar aumento muito significativo na concentração de ácido salicílico na forma conjugada nos 14º, 21º e 28º DAI (**Figura 2.10.e**).

O aumento na concentração de ácido salicílico na forma conjugada também foi observado em plantas de tabaco (*N. tabacum* ‘Xanthi’ NN) infectadas pelo TMV e esse aumento ocorreu em paralelo com o de ácido salicílico livre. Como a concentração de ácido salicílico conjugado era baixa antes da inoculação, os autores sugeriram que tanto a forma livre quanto a conjugada foram biossintetizadas *de novo* após a infecção (Malamy et al., 1992). Analisando os dados referentes à infecção de *S. pimpinellifolium* pelo ToMMV, pode-se perceber que o aumento na concentração de ácido salicílico na forma conjugada ocorreu após a ‘explosão’ no teor de ácido salicílico livre no 7º DAI. A glicosilação do ácido salicílico, o qual se encontra em maior proporção sob a forma de 2-O-β-D-glicose (SAG), reflete um processo metabólico normal para lidar com altas quantidade de ácidos fenólicos livres produzidos após a infecção pelo vírus, já que essas moléculas são tóxicas para a célula (Malamy et al., 1992; Dean et al., 2005).

Em relação à concentração de SA total, foi observada diferença significativa nos 7º, 14º e 21º DAI, com aumento na concentração nas plantas infectadas (**Figura 2.10.f**).

O ácido salicílico tem sido amplamente relacionado com a resistência da planta após ataque de um patógeno e, mais especificamente, com patógenos que possuem RNA como material genético, assim como o ToMMV.

Uma das evidências para corroborar o papel desempenhado pelo ácido salicílico na resistência das plantas contra patógenos foi a redução na concentração da capa proteica viral em plantas previamente tratadas com o ácido salicílico em relação às plantas que foram tratadas apenas com tampão ou com o ácido gentísico, um derivado do ácido salicílico. Acredita-se que o papel do ácido salicílico na resistência contra patógenos que possuem RNA como material genético seja o de induzir a expressão de genes envolvidos no silenciamento gênico, resposta comum em infecções virais como visto na **Introdução Geral**. Nesse tipo de resposta, há a participação de diferentes genes, como os responsáveis pela codificação da polimerase de RNA dependente de RNA (do inglês, *RNA-dependent RNA polymerase* – RdRP), das endoribonucleases do tipo Dicer (do inglês, *Dicer-like endoribonucleases* – DCL) e do complexo AGO-RISC. A participação da RdRP no silenciamento gênico ocorre na conversão de RNA de fita simples em RNA de fita dupla que será processado pela Dicer gerando pequenos RNAs de interferência (do inglês, *small interfering RNA* – siRNA) (Burguán, 2006; Campos et al., 2014).

Também já foi postulado que o ácido salicílico estaria envolvido na indução da expressão de proteínas relacionadas à patogênese (Klessig et al., 2000; Kunkel & Brooks, 2002). Essa resposta foi observada em plantas de tomate (*S. lycopersicum* ‘Rutgers’) infectadas pelo tomato mosaic virus (ToMV), as quais apresentaram aumento na concentração das proteínas PR1 e P23 após o tratamento das plantas infectadas com o ácido salicílico (Campos et al., 2014).

Outra via de transdução de sinais, em que esse fitormônio provavelmente está envolvido é a inibição da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria pelo ácido salicílico. Essa inibição ocasiona em aumento na concentração de EROs e esse aumento é percebido por proteínas ainda não identificadas que funcionam como sensores para essas substâncias, acarretando em expressão aumentada de outros genes relacionados à defesa da planta, como os inibidores da replicação e do movimento célula a célula do vírus (Singh et al., 2004). Interessante observar que, mesmo com o aumento na concentração de ácido salicílico nas plantas de *S.*

pimpinellifolium infectadas pelo ToMMV, ainda assim a concentração viral sistêmica foi alta.

Figura 2.10. Concentração de ácido salicílico livre (SA), conjugado (SAG) e total (SA total) em $\mu\text{g/g}$ planta em extrato de folhas de *S. pimpinellifolium* não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - Controle), friccionadas com tampão (barra cinza - Tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de SA entre os grupos **a.** Controle e Tampão e **d.** Tampão e Infectadas; de SAG entre os grupos **b.** Controle e Tampão e **e.** Tampão e Infectadas e de SA total entre os grupos **c.** Controle e Tampão e **f.** Tampão e Infectadas. DAI = dias após a inoculação; * significativo ($p \leq 0,05$); ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** extremamente significativo ($p \leq 0,001$).

Embora tenha ocorrido aumento na concentração de ácido salicílico, *S. pimpinellifolium* foi suscetível ao vírus, com o desenvolvimento da doença. Ainda que o ácido salicílico esteja envolvido com o aumento da concentração de EROs, esse aumento não foi suficiente para causar o colapso do tecido com consequente restrição

do patógeno (Riedle-Bauer, 2000). Por outro lado, a hipótese do longo tempo decorrido (7 DAI) para ocorrer o aumento na concentração de ácido salicílico e o consequente aumento no teor das EROs é mais plausível para explicar a replicação do ToMMV e sua disseminação pelas células de *S. pimpinellifolium* (Hernández et al., 2015). Para corroborar essa ideia, a aplicação de peróxido de hidrogênio e de substâncias que induzem a formação de EROs em plantas de tabaco suscetíveis (*N. tabacum* 'Samsun' (nn)) ao TMV só foi eficiente na supressão da replicação viral quando ocorreu 2 horas após a inoculação do patógeno. Quando a aplicação ocorreu 3 DAI, não houve a supressão da replicação viral (Bacsó et al., 2011). Dessa maneira, não se deve levar em conta apenas o aumento na concentração de ácido salicílico ou de EROs. É muito importante o momento em que ocorrem esses eventos. Se ocorrer em períodos iniciais após a inoculação do patógeno, a probabilidade de supressão da replicação viral é alta. Entretanto, em períodos tardios, não há efeito sobre a replicação do vírus.

Foi observado que plantas transgênicas de tomate (deficientes em acumular SA por possuírem o gene *NahG* que hidrolisa essa substância a catecol) foram mais suscetíveis ao tomato spotted wilt virus do que as plantas correspondentes parentais. Mesmo após a aplicação de SA exógeno, não houve recuperação total dos sintomas, o que indica que essa substância é um componente da defesa basal das plantas de tomate contra os vírus (López-Gresa et al., 2016).

Estudos posteriores que avaliem se essa concentração de ácido salicílico foi suficiente para induzir as vias de transdução de sinais em *S. pimpinellifolium*, como o aumento na expressão de RdRp, explicariam melhor o desenvolvimento de doença nessa planta.

Ácido ascórbico e glutathione

Os resultados das análises estatísticas realizadas com os dados obtidos para os ensaios de ácido ascórbico e glutathione encontram-se no **Apêndice I – Tabelas I.8 e 9**, respectivamente.

Foi possível observar diminuição muito e extremamente significativa na concentração de ácido ascórbico reduzido e total nas plantas friccionadas com o Tampão comparadas com as plantas Controle nos 14º e 21º DAI (**Figura 2.11.a, c**). Levando-se em conta que a principal diferença entre esses dois grupos é o estresse

mecânico, era esperado que as alterações ocorressem nos estágios iniciais do experimento por se tratar de um estímulo pontual. Dessa forma, seria interessante a repetição do experimento a fim de confirmar essas alterações no grupo Tampão. Além disso, no 21º DAI também houve diminuição significativa no teor de glutatona oxidada nas plantas do grupo Tampão (**Figura 2.12.a**).

Figura 2.11. Concentração ácido ascórbico (ng ácido ascórbico /g massa fresca) em extrato de folhas de *S. pimpinellifolium* não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de **a.** ácido ascórbico reduzido, **b.** ácido ascórbico oxidado e **c.** ácido ascórbico total entre os grupos Controle e Tampão. Comparação da concentração de **d.** ácido ascórbico reduzido, **e.** ácido ascórbico oxidado e **f.** ácido ascórbico total entre os grupos Tampão e Infectadas. DAI = dias após a inoculação; ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$). AAR = ácido ascórbico reduzido; AAO = ácido ascórbico oxidado; AAT = ácido ascórbico total.

Em relação às plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas com o ToMMV, pôde ser observado aumento muito significativo no teor de ácido ascórbico oxidado no 28º DAI e aumento extremamente significativo na concentração de ácido ascórbico reduzido e total em todos os dias analisados, com exceção do 1º DAI (**Figura 2.11.d, f**). Esse aumento também foi constatado na concentração de glutathione oxidada, porém com nível de significância menor (**Figura 2.12.b**).

Sabe-se que, em condições de estresse fisiológico como no caso de infecção por patógenos, há a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio. Essa molécula é degradada pela ascorbato peroxidase com a oxidação do ácido ascórbico ao radical monodehidroascorbato (MDHA) e ao dehidroascorbato (DHA), sendo recicladas a sua forma reduzida pelas enzimas do ciclo asorbato-glutathione (Smirnoff & Wheeler, 2000; Groß et al., 2013).

Seguindo esse raciocínio, esperava-se que a concentração de ácido ascórbico reduzido fosse menor nas plantas infectadas, uma vez que essa substância estaria reduzindo as EROs e se oxidando a MDHA e dehidroascorbato, aumentando a concentração de ácido ascórbico oxidado, assim como ocorreu com plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas pelo TMV, nas quais houve diminuição significativa da concentração de ácido ascórbico reduzido e aumento no teor de ácido ascórbico oxidado (Fodor et al., 1997). No caso de *S. pimpinellifolium*, cuja interação com o ToMMV é do tipo compatível, a planta não dispõe de mecanismos de defesa específicos para esse patógeno. Assim, apenas as defesas basais são ativadas, porém com menor amplitude se comparadas às defesas específicas ativadas pelos genes *R* de resistência (Hammond-Kosack & Jones, 2015). Ainda que de maneira não significativa ($p = 0,10$), percebe-se que no 1º DAI, houve aumento na concentração de ácido ascórbico oxidado. Esse aumento aparente pode ter ocorrido na tentativa da planta mitigar os efeitos das EROs.

Analisando os resultados de glutathione e ácido ascórbico conjuntamente, pode-se sugerir que o aumento na concentração de glutathione oxidada nas plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas nos 7º, 14º, 21º e 28º DAI pode ter sido em decorrência da atividade da dehidroascorbato redutase (DHAR), a qual reduz o dehidroascorbato (DHA) a ácido ascórbico reduzido, com a oxidação da glutathione (**Figura 2.12**). Assim, ocorre aumento na concentração de glutathione oxidada e mantém os níveis de ácido ascórbico reduzido elevados nas plantas infectadas (Smirnoff & Wheeler, 2000).

Figura 2.12. Concentração glutatona (μg glutatona/g planta) em extrato de folhas de *S. pimpinellifolium* não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração glutatona oxidada entre os grupos **a**. Controle e Tampão e entre os grupos **b**. Tampão e Infectadas. DAI = dias após a inoculação; * significativo ($p \leq 0,05$); ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$).

Experimentos futuros que avaliem a atividade dessa enzima poderiam confirmar essa hipótese.

Os níveis elevados de ácido ascórbico reduzido ajudariam a planta a mitigar os efeitos das EROs, as quais podem ter sido produzidas através de diversas vias, como o catabolismo das poliaminas (**ver Figura 2.9.d, f**) que geram como produto o peróxido de hidrogênio ou a reação do óxido nítrico, o qual teve sua concentração aumentada 1 e 7 DAI (**ver Figura 2.7.b**), com o ânion superóxido que origina o peroxinitrito que é um potente oxidante (Hancock et al., 2002; Sarkar et al., 2011). As EROs também podem ser produzidas através das NADPH oxidases (Mittler et al., 2004), as quais não foram avaliadas nessa tese. Essas substâncias são importantes sinalizadoras na via

de defesa das plantas, mas os eliminadores de EROs também são importantes para manter um nível estável e não tóxico.

Em um trabalho que caracterizou bioquimicamente a interação planta-vírus do tipo compatível entre *Hibiscus cannabinus* L. e mesteira yellow vein mosaic virus (MYVMV), o teor de glutatona oxidada não foi maior nas plantas infectadas (Sarkar et al., 2011). A interação observada entre *H. cannabinus* e o MYVMV é do mesmo tipo do patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV. Por essa razão, esperava-se que algumas respostas de defesa, como o teor de glutatona oxidada apresentasse um padrão semelhante. Entretanto, em plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas por vírus, houve aumento no teor de glutatona oxidada. Uma das possíveis explicações para o aumento no teor dessa substância é devido ao aumento de NO nas plantas infectadas (**Figura 2.7.b**). Como discutido anteriormente, o óxido nítrico pode reagir com ânion superóxido, produzindo peroxinitrito, o qual pode ser reduzido pela glutatona (Sies et al., 1997; Yu et al., 2013).

Pela análise conjunta dos antioxidantes não enzimáticos, ácido ascórbico e glutatona, pode-se perceber que houve grande variação quantitativa dessas substâncias, principalmente em períodos intermediários e finais do experimento. Isso, provavelmente, ocorreu em resposta ao estresse oxidativo ocasionado pela presença do vírus. Zeier e colaboradores (2004) sugeriram que a função do NO em interações planta-patógeno do tipo incompatível fosse a de inibir a maquinaria antioxidante da célula, garantindo altos níveis de H₂O₂. Apesar de a interação *S. pimpinellifolium*-ToMMV ser do tipo compatível, os resultados obtidos com a análise de NO, ácido ascórbico e glutatona parcialmente corroboraram a hipótese proposta por Zeier e colaboradores, pois no 1º DAI, enquanto a concentração de NO estava maior nas plantas infectadas, não foi observada variação na concentração dos antioxidantes não enzimáticos. Entretanto, no 7º DAI, a concentração de NO ainda se apresentava elevada nas plantas infectadas, mas mesmo assim, a maquinaria antioxidante desempenhada, principalmente, por ácido ascórbico já estava ativa.

4.2. Resultados obtidos para a espécie *S. lycopersicum* 'VFNT'

As plantas infectadas do patossistema *S. lycopersicum* 'VFNT'-ToMMV não apresentaram sintomas até o fim do experimento (28 DAI). Também não foram observadas lesões necróticas locais, as quais são indicativas de morte celular

programada decorrentes da reação de hipersensibilidade (do inglês, *hypersensitive response* - HR), que podem restringir o patógeno no local da infecção. Há situações em que a hospedeira é resistente ao vírus, mas não ocorre a HR, pois a reação ao patógeno é tão rápida, com o acúmulo de EROs acontecendo de maneira rápida e objetiva, que o patógeno é eliminado sem que ocorra qualquer dano oxidativo na planta e desenvolvimento de sintomas. Esse tipo de reação é conhecido como resistência extrema (Hernández et al., 2015).

Pode-se afirmar que, diferentemente da interação *S. pimpinellifolium*-ToMMV, entre *S. lycopersicum* e o ToMMV a interação é do tipo incompatível, pois não houve manifestação da doença.

Concentração viral (PTA-ELISA)

É possível observar na **Figura 2.13** que a porcentagem máxima de plantas consideradas positivas no teste foi de 20% no 21º DAI, embora os valores de absorbância sejam muito baixos.

Figura 2.13. Leituras de absorbância a 405 nm das amostras de *S. lycopersicum* 'VFNT' infectadas com o ToMMV em diferentes DAI. As barras vermelhas representam 3 vezes o valor do controle negativo que é usado como referência para indicar se a amostra encontra-se infectada. DAI = dias após a inoculação

Óxido nítrico

Os resultados das análises estatísticas realizadas com os dados obtidos para o ensaio de NO encontram-se no **Apêndice I – Tabela I.10**.

Entre os grupos Controle e Tampão, houve diferença significativa nos 1º e 14º DAI e muito significativa no 28º DAI nas plantas de *S. lycopersicum* 'VFNT', com aumento na concentração de NO nas plantas injuriadas mecanicamente (**Figura 2.14.a**). A resposta observada no 1º DAI poderia ser explicada pela injúria mecânica, a qual ativou a via de sinalização por NO, uma vez que o NO também está envolvido na defesa contra ferimentos (Wendehenne et al., 2004). Já foi relatado aumento na concentração de NO em plantas de *Arabidopsis* estressadas mecanicamente (Garcês et al., 2001). Entretanto, os 14º e 28º DAI são períodos muito afastados do dano mecânico e, provavelmente, esses incrementos não estejam relacionados com a fricção do pistilo nas folhas.

Em relação às plantas inoculadas com o vírus, os resultados são bastante controversos. As plantas de *S. lycopersicum* "VFNT" não apresentaram sintomas de infecção durante os 28 dias de observação após a inoculação do patógeno. Na interação planta-patógeno incompatível, não há o estabelecimento da doença e o consequente aparecimento de sintomas. Dessa forma, por se tratar desse tipo de interação, esperava-se que ocorresse aumento no teor de NO até 1 DAI. Entretanto, a diminuição observada do teor de NO nas plantas infectadas no 1º DAI comparado ao das plantas friccionadas com o tampão foi muito significativa. Esse resultado é contraditório com a literatura, a qual postula que, após o contato com o patógeno avirulento, há um acúmulo de NO nas plantas resistentes, estabelecendo uma correlação direta entre as respostas de defesa contra patógenos biotróficos e o NO. Dentre as respostas de defesa ativadas pelo NO encontram-se a morte celular associada à resistência e a indução de genes de defesa (Romero-Puertas et al., 2004). Em plantas de tomate infectadas pelo nematódeo *Meloidogyne incognita*, houve aumento na concentração de NO tanto na interação compatível quanto na incompatível. Esse aumento foi observado 12 horas após a infecção, mas também ocorreu no 1º DAI, mantendo-se estável no 2º DAI (Melillo et al., 2011).

Como citado acima, houve aumento na concentração de NO nas plantas mecanicamente injuriadas comparado às plantas não submetidas a nenhum tratamento. Por outro lado, nas plantas inoculadas, houve diminuição no teor dessa substância. Essa resposta pode ter sido ocasionada devido a uma diferença temporal na ativação da resposta dependendo do agente estressor. É provável que o aumento na concentração de NO, caso tenha ocorrido, aconteceu horas após a inoculação do

vírus nas plantas de *S. lycopersicum* 'VFNT'. Por outro lado, a resposta decorrente do estresse mecânico pode ter sido mais tardia, parecendo que houve diminuição na concentração de NO nas plantas inoculadas com o vírus (**Figura 2.14.b**).

Como explicado anteriormente, a morte celular associada à resistência é ativada, dentre outros fatores, em decorrência do acúmulo de NO. Em *S. lycopersicum* 'VFNT', no entanto, não foram observadas lesões necróticas nas plantas inoculadas em decorrência da morte celular, tampouco não foi observado aumento no teor dessa substância em períodos iniciais do experimento. Entretanto, a planta se mostrou resistente à infecção pelo ToMMV. Na **Introdução Geral**, foi mostrado que a interação gene a gene normalmente leva à HR com morte celular no local da infecção. Como será discutido outras vezes ao longo da discussão das respostas de defesa na cultivar VFNT, a resistência da planta sem a observação dos sintomas característicos da HR é conhecida como resistência extrema. Nesse tipo de defesa, as respostas são ativadas tão rapidamente que não há a ocorrência da HR. Em consequência, não são observadas as lesões necróticas locais.

Outro resultado bastante controverso foi o aumento no teor de NO no 21º DAI nas plantas inoculadas (**Figura 2.14.b**). É bastante provável que esse aumento não esteja relacionado com a presença do vírus, uma vez que a planta é resistente. O teste sorológico evidenciou leituras de absorbância muito baixas, apesar de três vezes maiores que as do controle negativo (**Figura 2.13**), indicando que as plantas estavam sadias.

Dessa forma, a realização de outro experimento com coletas em períodos referentes a horas e não a dias após a inoculação poderia explicar melhor o padrão de resposta do NO nas plantas inoculadas de *S. lycopersicum* 'VFNT'. O teor de NO pode ter apresentado aumento em horas após a inoculação e ter chegado em um platô, começando a diminuir no 1º DAI. Nesses experimentos futuros, espera-se aumento na concentração de NO, uma vez que durante as respostas de resistência da planta dependentes dos genes *R*, as plantas produzem essa substância (Dangl, 1998). Interessante observar que os resultados obtidos com *S. pimpinellifolium* mostram que a produção de NO não ocorre apenas em plantas resistentes ao patógeno.

Figura 2.14. Leituras expressas em unidades arbitrárias de fluorescência relativas ao teor de óxido nítrico em *S. lycopersicum* 'VFNT' em diferentes tratamentos. **a.** Comparação entre os grupos Controle-Tampão. **b.** Comparação entre os grupos Tampão-Infectadas. DAI = dias após a inoculação; * significativo ($p \leq 0,05$); ** muito significativo ($p \leq 0,01$).

Poliaminas

Os resultados das análises estatísticas realizadas com os dados obtidos para o ensaio de poliaminas encontram-se no **Apêndice I – Tabelas I.11, 12 e 13**.

Nesse patossistema, não houve diferença significativa nas plantas inoculadas durante o período do experimento. Também não houve diferenças significativas nas plantas mecanicamente injuriadas, como pode ser observado na **Figura 2.15**. Uma vez que *S. lycopersicum* 'VFNT' foi resistente ao ToMMV, esperava-se encontrar aumento na concentração de poliaminas, as quais desempenham papel na defesa da planta em estágios intermediários ou finais (Yamakawa et al., 1998).

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN), resistentes ao tobacco mosaic virus (TMV), apresentaram aumento na concentração de putrescina e diminuição no teor de espermidina e espermina tanto nas plantas inoculadas com o

tampão quanto nas plantas infectadas no 4º DAI. Entretanto, todos esses resultados foram obtidos a partir da extração das lesões necróticas do tabaco. Quando os autores analisaram o fluido intracelular das células de tabaco infectadas, observaram aumento de 18 e 29 vezes no teor de espermina no 3º e 5º DAI, respectivamente, mas não observaram diferenças nas plantas tratadas com o tampão (Yamakawa et al., 1998).

A análise do teor de poliaminas em *S. lycopersicum* 'VFNT' foi realizada a partir do extrato de folhas e não do fluido intracelular das células infectadas. Uma vez que essa planta se mostrou resistente ao vírus, acredita-se que o mesmo não se disseminou pelas células da planta. A baixa porcentagem de plantas infectadas (**Figura 2.13**) corrobora essa ideia. Dessa maneira, muitas células do tecido foliar não apresentavam partículas virais que desencadeariam a produção de poliaminas como resposta de defesa e, com a análise do extrato das folhas, as células sadias diluíram o possível aumento no teor de poliaminas das células infectadas.

No estudo realizado com plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas pelo cucumber mosaic virus (CMV), as quais expressaram a reação de hipersensibilidade (HR), foi observado que a concentração de poliaminas, como a espermina, foi maior nas plantas infectadas, assim como a de seu isômero, a termoespermina. Essas substâncias induziram maior expressão de genes relacionados à patogênese, além de ter havido diminuição dos níveis de capa proteica do CMV quando plantas de *Arabidopsis* foram tratadas de maneira exógena com essas duas substâncias (Sagor et al., 2012).

No patossistema *S. lycopersicum* 'VFNT'-ToMMV, provavelmente, ocorreu o processo conhecido como resistência extrema, como já discutido anteriormente. Com o aumento das EROs ocorrendo de maneira tão rápida e eficaz para conter o patógeno no local da infecção, não há as lesões necróticas, características da HR. Também já foi discutido anteriormente que as EROs podem atuar como sinalizadoras ou fitotóxicas. No caso da resistência extrema, as EROs atuam como fitotóxicas. Por essa razão, elas não teriam participado do processo de sinalização para ativar outras vias, como a das poliaminas e a do ácido salicílico, mostrado a seguir, explicando os resultados obtidos para essas duas substâncias nesse patossistema.

Figura 2.15. Concentração de poliaminas livres (µg poliamina/g planta) em extrato de folhas de *S. lycopersicum* 'VFNT' não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de **a.** putrescina, **b.** espermidina e **c.** espermina entre os grupos Controle e Tampão. Comparação da concentração de **d.** putrescina, **e.** espermidina e **f.** espermina entre os grupos Tampão e Infectadas. DAI = dias após a inoculação.

Ácido salicílico

Os resultados das análises estatísticas realizadas com os dados obtidos para o ensaio de ácido salicílico encontram-se no **Apêndice I – Tabelas I.14, 15 e 16.**

Em relação ao teor de ácido salicílico nas plantas de *S. lycopersicum* 'VFNT' friccionadas com o tampão, também não foi observada variação tanto na forma livre,

conjugada e total (**Figura 2.16.a, b e c**), assim como observado em *S. pimpinellifolium*. O aumento na concentração de ácido salicílico nos períodos iniciais após o estresse mecânico era esperado para as duas espécies, pois essa substância participa das reações de sinalização em situações de estresse abiótico, como relatado em revisão feita por Horváth e colaboradores (2007).

Diferentemente do observado para *S. pimpinellifolium* não houve diferenças significativas na concentração de ácido salicílico nas plantas inoculadas para as formas livre, conjugada e total (**Figura 2.16.d, e e f**). Com base na literatura, esperava-se que nesse patossistema, que apresenta interação incompatível, as diferenças na concentração de ácido salicílico ocorressem em estágios iniciais da infecção. Uma vez que *S. lycopersicum* 'VFNT' possui um gene de resistência contra o tomate mosaico vírus (ToMV), um vírus filogeneticamente próximo ao ToMMV, há uma possibilidade de que esse gene também esteja envolvido na resistência desse tomate ao vírus do presente estudo. Dessa forma, ocorreria a interação gene a gene, na qual o patógeno fica restrito ao local inicial da infecção pelo aumento da concentração de EROs e de morte celular programada. Como não foi observada nenhuma diferença desde o 1º DAI, é possível que esse aumento nas plantas inoculadas tenha ocorrido em um período menor que o analisado, talvez em horas após a inoculação como já sugerido para o NO, não possibilitando sua observação neste estudo. Em plantas de tomate (*S. lycopersicum* L. 'Zheza 205') infectadas pelo TMV, o aumento na concentração de ácido salicílico já foi observado 12 horas após a inoculação do patógeno (Liao et al., 2015).

Entretanto, aumento na concentração de ácido salicílico desde o 1º DAI foi observado em patossistemas com os dois tipos de interação planta-patógeno, ou seja, em interações compatível e incompatível, embora o aumento tenha sido maior na interação incompatível (Madhusudhan et al., 2009). Esses resultados são contraditórios aos obtidos na presente tese, os quais evidenciaram aumento apenas na interação compatível (*S. pimpinellifolium*-ToMMV).

Outro estudo que mostrou aumento na concentração de ácido salicílico em interação incompatível foi o realizado por Peng e colaboradores (2013) analisando *Brassica campestris* L. infectadas com o turnip mosaic virus (TuMV). Nesse estudo, os autores observaram que o aumento na concentração de ácido salicílico ocorreu no 1º e no 5º DAI. Além disso, observaram que no primeiro dia houve aumento na

expressão de genes ligados à resistência em *Brassica*. Vale salientar, porém, que o teor de ácido salicílico detectado pelos autores nas plantas controle de *B. campestris* (tratadas apenas com tampão) foi quase 1000 vezes menor comparado com o das plantas de *S. lycopersicum* 'VFNT'.

Yang e colaboradores (2004) sugeriram que, de acordo com o papel exercido pelo ácido salicílico no processo de resposta de defesa, as plantas são divididas em espécies sensíveis ou insensíveis a esse fitormônio. Nessa última categoria podem ser enquadradas as plantas de arroz, por exemplo, as quais possuem altos níveis basais de SA, que funcionam como antioxidante pré-formado para proteger a planta de danos oxidativos, uma vez que essa substância funciona como um eliminador direto de radicais hidroxila e como quelante de metais. Por outro lado, nas espécies sensíveis ao SA, essa substância funcionaria como um mensageiro secundário que pode ativar genes de defesa e induzir a resistência, embora possa também funcionar como antioxidante. Nesse modelo, as plantas sensíveis ao ácido salicílico possuem níveis basais dessa substância da ordem de 0,1 µg/ g massa fresca, enquanto que as plantas insensíveis podem chegar a 30 µg/ g massa fresca.

As plantas de *S. lycopersicum* 'VFNT' apresentaram cerca de 3 µg de ác. salicílico/ g massa fresca (**Figura 2.16**). Esse valor não é tão alto, mas é trinta vezes maior do que o proposto por Yang et al. (2004) para plantas sensíveis e, como já comentado acima, esse valor foi 1000 vezes maior que nas plantas de *B. campestris*. Assim, aceitando o modelo proposto por Yang e colaboradores para entender o papel do ácido salicílico na resposta de defesa de diferentes plantas, poderíamos sugerir que *S. lycopersicum* 'VFNT' fosse considerada moderadamente sensível e, assim como as plantas insensíveis, devido ao maior nível basal de SA, não apresentaria variações no teor dessa substância nos momentos iniciais de exposição a um patógeno.

Comparando-se os teores de ácido salicílico livre nas duas espécies de *Solanum* estudadas, nota-se que são semelhantes, porém com aumento após 7 DAI nas plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas pelo ToMMV. Isso pode nos levar a duas interpretações. Uma, que o argumento de não detecção de variação na quantidade de ácido salicílico em *S. lycopersicum* 'VFNT' devido ao período de análise ter sido tardio é mais razoável que a quantidade basal dessa substância. Outra, que a sensibilidade da planta ao SA não depende somente do teor basal de SA livre.

Figura 2.16. Concentração de ácido salicílico livre (SA), conjugado (SAG) e total (SA total) em $\mu\text{g/g}$ planta em extrato de folhas de *S. lycopersicum* 'VFNT' não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - Controle), friccionadas com tampão (barra cinza - Tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de SA entre os grupos a. Controle e Tampão e d. Tampão e Infectadas; de SAG entre os grupos b. Controle e Tampão e e. Tampão e Infectadas e de SA total entre os grupos c. Controle e Tampão e f. Tampão e Infectadas. DAI = dias após a inoculação.

Interessante observar que a espécie *S. lycopersicum* 'VFNT' apresentou maiores teores de ácido salicílico conjugado (**Figura 2.16.b e e**) do que *S. pimpinellifolium* (**Figura 2.10.b e e**), principalmente nos 1º e 7º DAI. Uma das formas conjugadas mais comuns dessa substância é o ácido salicílico 2-O- β -D-glicose (SAG). A glicosilação do SA possibilita seu armazenamento no vacúolo, além de deixa-lo em

uma forma não tóxica. Em situações estressantes para a planta, a forma conjugada pode sofrer hidrólise e o ácido salicílico livre ser transportado para o citosol para que seja utilizado como molécula sinalizadora (Dean et al., 2005), ou influenciar a biossíntese de novas moléculas (Dean et al., 2003) nas respostas de defesa. Uma das explicações poderia ser que a sensibilidade da planta estaria relacionada não só ao SA livre, mas a todo SA potencialmente disponível. A manutenção do alto teor de SA conjugado em *S. lycopersicum* 'VFNT' pode refletir sua condição basal de maior resistência a condições estressantes, não havendo diferença entre uma condição de estresse biótico ou abiótico.

Em plantas de *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) infectadas por tomato spotted wilt virus (TSWV) houve aumento na concentração de ácido salicílico nas plantas infectadas, mas não houve aumento no teor dessa substância nas plantas friccionadas com o tampão (Abe et al., 2012). Na presente tese, também não houve diferenças quantitativas na concentração de ácido salicílico nas plantas mecanicamente injuriadas, tanto na interação compatível quanto na incompatível. Uma das explicações para isso é a de que o hormônio que está envolvido nas respostas por ferimento nas plantas é o ácido jasmônico. Diversos estudos apontam para o antagonismo dos ácidos jasmônico e salicílico, com a ativação da sinalização de apenas uma das vias (Grant & Jones, 2009). Como a do ácido salicílico não foi ativada, é provável que a do ácido jasmônico tenha sido. Experimentos futuros que avaliem a ação dessas duas substâncias nos dois patossistemas estudados nessa tese podem confirmar essa hipótese.

Ácido ascórbico e glutathione

Os resultados das análises estatísticas realizadas com os dados obtidos para os ensaios de ácido ascórbico e glutathione encontram-se no **Apêndice I – Tabelas I.17 e 18**, respectivamente.

Houve diminuição significativa no grupo Tampão no 7º DAI para o teor de ácido ascórbico reduzido e total (**Figura 2.17.a, c**) comparado com o grupo Controle. Assim como observado em *S. pimpinellifolium* injuriado mecanicamente, esse período é tardio para relacionar o estresse mecânico com a variação na quantidade dessa substância, sendo necessário mais estudos para melhor explicar esses dados.

Figura 2.17. Concentração ácido ascórbico (ng ácido ascórbico /g massa fresca) em extrato de folhas de *S. lycopersicum* cv. VFNT não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração de **a.** ácido ascórbico reduzido, **b.** ácido ascórbico oxidado e **c.** ácido ascórbico total entre os grupos Controle e Tampão. Comparação da concentração de **d.** ácido ascórbico reduzido, **e.** ácido ascórbico oxidado e **f.** ácido ascórbico total entre os grupos Tampão e Infectadas. DAI = dias após a inoculação; * significativo ($p \leq 0,05$). AAR = ácido ascórbico reduzido; AAO = ácido ascórbico oxidado; AAT = ácido ascórbico total.

As plantas de *S. lycopersicum* 'VFNT' inoculadas, quando comparadas com as do grupo Tampão, não apresentaram diferenças significativas na concentração de ácido ascórbico reduzido, total ou oxidado (**Figura 2.17.e, f e g**). Em relação ao teor de glutathiona oxidada, houve diminuição na concentração dessa substância nas plantas inoculadas comparadas com o grupo Tampão no 7º DAI (**Figura 2.18**). Entretanto, comparado com o patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV, essa variação apresentou um valor de p muito maior, indicando que a influência do ToMMV sob o teor de glutathiona oxidada foi menor em *S. lycopersicum* 'VFNT'.

Figura 2.18. Concentração glutatona (μg glutatona/g planta) em extrato de folhas de *S. lycopersicum* 'VFNT' não submetidas a qualquer tratamento (barra preta - controle), friccionadas com tampão (barra cinza - tampão) ou inoculadas com o ToMMV (barra branca - Infectadas). Comparação da concentração glutatona oxidada entre os grupos a. Controle e Tampão e entre os grupos b. Tampão e Infectadas. DAI = dias após a inoculação; * significativo ($p \leq 0,05$); *** extremamente significativo ($p \leq 0,001$).

S. lycopersicum 'VFNT' apresentou interação do tipo incompatível com o ToMMV, na qual não foi possível a disseminação do vírus pela planta e o estabelecimento da doença. Assim como explicado para a análise dos sinalizadores, na interação incompatível, as respostas de defesa são prontamente ativadas (López-Greza et al., 2012). No caso desse patossistema, é provável que o gene *Tm-2²* que confere resistência ao ToMV também esteja ligado à resistência ao ToMMV. Assim, na interação gene a gene é ativada a imunidade disparada por efetores (do inglês, *effector-triggered immunity* - ETI – ver **Introdução Geral para maiores detalhes**), a qual pode conferir resistência completa ao patógeno (Chisholm et al., 2006; Jones & Dangl, 2006).

As análises referentes à glutathione poderiam fornecer resultados mais específicos caso fossem realizadas em determinadas partes da célula, pois há estudos que indicam maior concentração dessa substância no núcleo com o papel de protegê-lo de um dano oxidativo causado pelas EROs (Zechmann et al., 2005).

5. CONCLUSÃO

As vias de sinalização desempenhadas pelo óxido nítrico, ácido salicílico e poliaminas foram ativadas na interação compatível entre *S. pimpinellifolium* e ToMMV. Essa ativação ocorreu com o aumento na concentração de óxido nítrico nos 1º e 7º DAI e de poliaminas no 28º DAI, além do incremento no teor de ácido salicílico livre no 7º DAI e de ácido salicílico total nos 7º, 14º e 21º DAI. Apesar desse mecanismo de defesa ter sido ativado, isso aconteceu tardiamente, que é uma resposta típica de interações planta-patógeno do tipo compatível. Provavelmente, devido a esse atraso, foi possível que o vírus se disseminasse pelas células da planta, ocasionando na doença. Como houve aumento de ácido salicílico e de óxido nítrico, os quais podem ser tóxicos para a planta, houve também a ativação dos antioxidantes ácido ascórbico e glutathione para manter a homeostase redox das células. Em relação ao dano mecânico, não foram observadas diferenças nos teores dos sinalizadores para essa espécie.

No patossistema *S. lycopersicum* 'VFNT'-ToMMV, não foi observado aumento na concentração dos sinalizadores nas plantas inoculadas e essa planta não apresentou sintomas característicos de infecção por vírus, nem altas concentrações virais. Provavelmente, em se tratando de sinalizadores, as respostas podem ter ocorrido horas após a inoculação viral e 1 DAI, período inicial das análises, foi um momento tardio. Para esse patossistema, cuja interação é do tipo incompatível, análises futuras em períodos referentes a horas após a inoculação podem ser úteis para explicar como e quando ocorrem as respostas de defesa para essa cultivar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, H., Tomitaka, Y., Shimoda, T., Seo, S., Sakurai, T., Kugimiya, S., Tsuda, S. & Kobayashi, M. (2012) 'Antagonistic plant defense system regulated by phytohormones assists interactions among vector insect, thrips and a

- tospovirus.', *Plant & cell physiology*, 53(1), pp. 204–12. doi: 10.1093/pcp/pcr173.
- Ambrós, S., Martínez, F., Ivars, P., Hernández, C., Iglesia, F. De & Elena, S. F. (2017) 'Molecular and biological characterization of an isolate of *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) infecting tomato and other experimental hosts in a greenhouse in Valencia , Spain', *European Journal of Plant Pathology*, pp. 1–8. doi: 10.1007/s10658-017-1180-2.
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavladoraki, P. & Tisi, A. (2010) 'Plant amine oxidases "on the move": An update', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 48(7), pp. 560–564. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.02.001.
- Angelini, R., Tisi, A., Rea, G., Chen, M. M., Botta, M., Federico, R. & Cona, A. (2008) 'Involvement of Polyamine Oxidase in Wound Healing', *Plant Physiology*, 146(1), pp. 162–177. doi: 10.1104/pp.107.108902.
- Bacsó, Y. M. Hafez, Z. & Király, L. K. (2011) 'Inhibition of virus replication and symptom expression by reactive oxygen species in tobacco infected with *Tobacco mosaic virus*', *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 46(1), pp. 1–10. doi: 10.1556/APhyt.46.2011.1.1.
- Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M. & Yoshioka, H. (2013) 'Nitric Oxide as a Mediator for Defense Responses', *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 26(3), pp. 271–277.
- Bueno, C. (2014) 'Ácido salicílico como sinalizador durante a embriogênese de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE'. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Burguán, J. (2006) 'Virus induced RNA silencing and suppression: defence and counter defence', *Journal of Plant Pathology*, 88(3), pp. 233–244.
- Campos, L., Granell, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Conejero, V., Bellés, J. M., Rodrigo, I. & Lisón, P. (2014) 'Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens', *Plant Physiology and Biochemistry*, 77(February), pp. 35–43. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.01.016.
- Chandok, M. R., Ytterberg, A. J., van Wijk, K. J. & Klessig, D. F. (2003) 'The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of

- the glycine decarboxylase complex.', *Cell*, 113(4), pp. 469–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757708>.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B. J. (2006) 'Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response', *Cell*, 124(4), pp. 803–814. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.008.
- Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977) 'Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses.', *The Journal of general virology*, 34(3), pp. 475–483. doi: 10.1099/0022-1317-34-3-475.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. & Tavladoraki, P. (2006) 'Functions of amine oxidases in plant development and defence', *Trends in Plant Science*, 11(2), pp. 80–88. doi: 10.1016/j.tplants.2005.12.009.
- Conklin, P. L. & Barth, C. (2004) 'Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence', *Plant, Cell and Environment*, 27(8), pp. 959–970. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01203.x.
- Conti, G., Rodriguez, M. C., Venturuzzi, A. L. & Asurmendi, S. (2017) 'Modulation of host plant immunity by *Tobamovirus* proteins', *Annals of Botany*, 119, pp. 737–747. doi: 10.1093/aob/mcw216.
- Dangl, J. (1998) 'Plants just say NO to pathogens', *Nature*, 394(8), pp. 525–527. doi: 10.1038/28958.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusegem, F. (2000) 'Dual action of the active oxygen species during plant stress responses.', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 57(5), pp. 779–795. doi: 10.1007/s000180050041.
- Dean, J. V., Shah, R. P. & Mohammed, L. A. (2003) 'Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean cell suspension cultures', *Physiologia Plantarum*, 118(3), pp. 328–336. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00117.x.
- Dean, J. V., Mohammed, L. A. & Fitzpatrick, T. (2005) 'The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures.', *Planta*, 221(2), pp. 287–96. doi: 10.1007/s00425-004-1430-3.

- Delledonne, M., Xia, Y. & Dixon, R. A. (1998) 'Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance', *Nature*, 394(August), pp. 585–588.
- Dempsey, D. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C. & Klessig, D. F. (2011) 'Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism', *The Arabidopsis Book*, 9, pp. 1–24. doi: 10.1199/tab.0156.
- Dewick, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd, 2009. 546 p.
- Dias, A. P. L., Dafré, M., Rinaldi, M. C. S. & Domingos, M. (2011) 'How the redox state of tobacco "Bel-W3" is modified in response to ozone and other environmental factors in a sub-tropical area?', *Environmental pollution* (Barking, Essex : 1987). Elsevier Ltd, 159(2), pp. 458–65. doi: 10.1016/j.envpol.2010.10.020.
- Du, J., Cullen, J. J. & Buettner, G. R. (2012) 'Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V., 1826(2), pp. 443–457. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.06.003.
- Edreva, A. (1998) 'Tobacco polyamines as affected by stresses induced by different pathogens', *Biologia Plantarum*, 40(2), pp. 317–320.
- Feys, B. J. & Parker, J. E. (2000) 'Interplay of signaling pathways in plant disease resistance.', *Trends in genetics: TIG*, 16(10), pp. 449–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050331>.
- Fodor, J., Gullner, G., Ádám, A. L., Barna, B., Komives, T. & Kiraly, Z. (1997) 'Local and Systemic Responses of Antioxidants to *Tobacco mosaic virus* Infection and to Salicylic Acid in Tobacco ', *Plant physiology*, 114, pp. 1443–1451.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C. & Durner, J. (2000) 'In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco.', *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 23(6), pp. 817–824. doi: tpj835 [pii].
- Gara, L. De, Pinto, M. C. De & Tommasi, F. (2003) 'The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant – pathogen interaction', *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, pp. 863–870. doi: 10.1016/S0981-9428(03)00135-9.
- Garcês, H., Durzan, D. & Pedroso, M. C. (2001) 'Mechanical Stress Elicits Nitric Oxide Formation and DNA Fragmentation in *Arabidopsis thaliana*', *Annals of Botany*, 87, pp. 567–574. doi: 10.1006/anbo.2000.1356.

- Glazebrook, J. (2005) 'Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens.', *Annual review of phytopathology*, 43, pp. 205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.
- Grant, M. R. & Jones, J. D. (2009) 'Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease', *Science*, 324(5928), pp. 750–752. doi: 10.1126/science.1173771.
- Groß, F., Durner, J. & Gaupels, F. (2013) 'Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses.', *Frontiers in plant science*, 4(October), p. 419. doi: 10.3389/fpls.2013.00419.
- Guo, F. (2006) 'Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: AtNOS1 is just the beginning', *Trends in plant science*, 11(11), pp. 527–528. doi: 10.1016/j.tplants.2006.09.007.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. 'Response to plant pathogens'. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. editors. *Biochemistry & Molecular biology of plants*. West Sussex, 2015. p.959-1050.
- Hancock, J. T., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. & Neill, S. J. (2002) 'Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species', *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6–8), pp. 611–617. doi: 10.1016/S0981-9428(02)01403-1.
- Hernández, J. A., Gullner, G., Clemente-Moreno, M. J., Künstler, A., Juhász, C., Díaz-Vivancos, P. & Király, L. (2015) 'Oxidative stress and antioxidative responses in plant–virus interactions', *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Elsevier Ltd, 94, pp. 134–148. doi: 10.1016/j.pmpp.2015.09.001.
- Hull, R. Matthews' plant virology. 4th ed. San Diego: Academic Press, 2002.1001p.
- Horváth, E., Szalai, G. & Janda, T. (2007) 'Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling', *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), pp. 290–300. doi: 10.1007/s00344-007-9017-4.
- Israr, M., Sahi, S., Datta, R. & Sarkar, D. (2006) 'Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*.', *Chemosphere*, 65(4), pp. 591–8. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.02.016.
- Jones, J. & Dangl, J. (2006) 'The plant immune system', *Nature*, 444(7117), pp. 323–329. doi: 10.1038/nature05286.

- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. & Silva, H. (2000) 'Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), pp. 8849–55.
- Kunkel, B. N. & Brooks, D. M. (2002) 'Cross talk between signaling pathways in pathogen defense', *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), pp. 325–331. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00275-3.
- Liao, Y.-W.-K., Sun, Z.-H., Zhou, Y.-H., Shi, K., Li, X., Zhang, G.-Q., Xia, X.-J., Chen, Z.-X. & Yu, J.-Q. (2013) 'The role of hydrogen peroxide and nitric oxide in the induction of plant-encoded RNA-dependent RNA polymerase 1 in the basal defense against *Tobacco mosaic virus*.', *PLoS ONE*, 8(9), p. e76090. doi: 10.1371/journal.pone.0076090.
- Liao, Y., Tian, M., Zhang, H., Li, X., Wang, Y., Xia, X., Zhou, J., Zhou, Y., Yu, J., Shi, K. & Klessig, D. F. (2015) 'Salicylic acid binding of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase E2 affects mitochondrial oxidative phosphorylation and electron transport chain components and plays a role in basal defense against *Tobacco mosaic virus* in tomato', *New Phytologist*, 205(3), pp. 1296–1307. doi: 10.1111/nph.13137.
- van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. J. (2006) 'Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants', *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), pp. 135–162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Rodrigo, I., Conejero, V. & Bellés, J. M. (2012) 'Metabolic fingerprinting of *Tomato mosaic virus* infected *Solanum lycopersicum*.', *Journal of plant physiology*. Elsevier GmbH., 169(16), pp. 1586–96. doi: 10.1016/j.jplph.2012.05.021.
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Yenush, L., Conejero, V., Rodrigo, I. & Bellés, J. M. (2016) 'Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and *Tomato spotted wilt virus*', *PLoS ONE*, 11(11), pp. 1–25. doi: 10.1371/journal.pone.0166938.
- Madhusudhan, K. N., Srikanta, B. M., Shylaja, M. D., Prakash, H. S. & Shetty, H. S. (2009) 'Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction',

- Journal of Plant Interactions*, 4(3), pp. 157–166. doi: 10.1080/17429140802419516.
- Malamy, J., Henning, J. & Klessig, D. F. (1992) 'Temperature-Dependent Induction of Salicylic Acid and Its Conjugates during the Resistance Response to *Tobacco mosaic virus* Infection', *the Plant Cell Online*, 4(3), pp. 359–366. doi: 10.1105/tpc.4.3.359.
- Marini, F., Betti, L., Scaramagli, S., Biondi, S. & Torrigiani, P. (2001) 'Polyamine metabolism is upregulated in response to *Tobacco mosaic virus* in hypersensitive, but not in susceptible, tobacco', *New Phytologist*, 149(2), pp. 301–309. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00017.x.
- May, M. J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M. V. & Inze, D. (1998) 'Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development', *Journal of Experimental Botany*, 49(321), pp. 649–667. doi: 10.1093/jxb/49.321.649.
- Melillo, M. T., Leonetti, P., Leone, A., Veronico, P. & Bleve-Zacheo, T. (2011) 'ROS and NO production in compatible and incompatible tomato-*Meloidogyne incognita* interactions', *European Journal of Plant Pathology*, 130(4), pp. 489–502. doi: 10.1007/s10658-011-9768-4.
- Mioto, P. T. & Mercier, H. (2013) 'Abscissic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-regulated by drought.', *Journal of plant physiology*. Elsevier GmbH., 170(11), pp. 996–1002. doi: 10.1016/j.jplph.2013.02.004.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F. (2004) 'Reactive oxygen gene network of plants', *Trends in Plant Science*, 9(10), pp. 490–498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. & Foyer, C. H. (2012) 'Glutathione in plants: an integrated overview.', *Plant, cell & environment*, 35(2), pp. 454–84. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x.
- Osborne, J. W. (2002) 'Notes on the use of data transformations.', *Notes*, 8(6), pp. 1–7.
- Peng, H., Li, S., Wang, L., Li, Y. Y., Li, Y. Y., Zhang, C. & Hou, X. (2013) '*Turnip mosaic virus* induces expression of the LRR II subfamily genes and regulates the

- salicylic acid signaling pathway in non-heading Chinese cabbage', *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Elsevier Ltd, 82(February), pp. 64–72. doi: 10.1016/j.pmpp.2013.01.006.
- Rezende, F. M. (2013) 'Efeito da atmosfera enriquecida com CO₂ em mudas de *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Riedle-Bauer, M. (2000) 'Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants', *Journal of Phytopathology*, 148(5), pp. 297–302.
- Romero-Puertas, M. C., Perazzolli, M., Zago, E. D. & Delledonne, M. (2004) 'Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions', *Cellular Microbiology*, 6(9), pp. 795–803. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00428.x.
- Sagor, G. H. M., Takahashi, H., Niitsu, M., Takahashi, Y., Berberich, T. & Kusano, T. (2012) 'Exogenous thermospermine has an activity to induce a subset of the defense genes and restrict cucumber mosaic virus multiplication in *Arabidopsis thaliana*.' *Plant cell reports*, 31(7), pp. 1227–32. doi: 10.1007/s00299-012-1243-y.
- Sarkar, T. S., Bhattacharjee, A., Majumdar, U., Roy, A., Maiti, D., Goswamy, A. M., Ghosh, S. K. & Ghosh, S. (2011) 'Biochemical characterization of compatible plant-viral interaction A case study with a begomovirus-kenaf host-pathosystem', *Plant Signaling & Behavior*, 6(4), pp. 501–509. doi: 10.4161/psb.6.4.13912.
- Shah, J. (2003) 'The salicylic acid loop in plant defense', *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), pp. 365–371. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00058-X.
- Sies, H., Sharov, V. S., Klotz, L., Briviba, K. & Du, D. (1997) 'Glutathione Peroxidase Protects against Peroxynitrite-mediated Oxidations', *The Journal of biological chemistry*, 272(44), pp. 27812–27817.
- Silveira, V., Iochet, E., Floh, S., Handro, W. & Guerra, M. P. (2004) 'Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*', *Plant cell, tissue and organ culture*, 76, pp. 53–60.

- Singh, D. P., Moore, C. A., Gilliland, A. & Carr, J. P. (2004) 'Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid', *Molecular Plant Pathology*, 5, pp. 57–63. doi: 10.1046/J.1364-3703.2004.00203.X.
- Smirnoff, N. (2000) 'Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule', *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), pp. 229–235. doi: 10.1016/S1369-5266(00)80070-9.
- Smirnoff, N. & Wheeler, G. L. (2000) 'Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function.', *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 35(4), pp. 291–314. doi: 10.1080/10409230008984166.
- Stangarlin, J. R., Kuhn, O. J., Toledo, M. V., Portz, R. L., Schwan-Estrada, K. R. F. & Pascholati, S. F. (2011) 'A defesa vegetal contra fitopatógenos', *Scientia Agraria Paranaensis*, 10(1), pp. 18–46. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Segal Floh, E. I. & Scherer, G. F. E. (2006) 'Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings', *Plant and Cell Physiology*, 47(3), pp. 346–354. doi: 10.1093/pcp/pci252.
- Wendehenne, D., Durner, J. & Klessig, D. F. (2004) 'Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses', *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), pp. 449–455. doi: 10.1016/j.pbi.2004.04.002.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F. & Scherer, G. F. E. (2011) 'Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses.', *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 181(5), pp. 593–603. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002.
- Yamakawa, H., Kamada, H., Satoh, M. & Ohashi, Y. (1998) 'Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against *Tobacco mosaic virus* infection', *Plant physiology*, 118(4), pp. 1213–1222. doi: 10.1104/pp.118.4.1213.
- Yang, Y., Qi, M. & Mei, C. (2004) 'Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress', *Plant Journal*, 40(6), pp. 909–919. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02267.x.
- Yu, F., Li, P., Wang, B. & Han, K. (2013) 'Reversible near-infrared fluorescent probe introducing tellurium to mimetic glutathione peroxidase for monitoring the redox

- cycles between peroxynitrite and glutathione in vivo', *Journal of the American Chemical Society*, 135(20), pp. 7674–7680. doi: 10.1021/ja401360a.
- Zechmann, B., Zellnig, G. & Müller, M. (2005) 'Changes in the subcellular distribution of glutathione during virus infection in *Cucurbita pepo* (L.)', *Plant Biology*, 7(1), pp. 49–57. doi: 10.1055/s-2004-830477.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M. & Lamb, C. (2004) 'Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions', *Plant Physiology*, 136(1), pp. 2875–2886. doi: 10.1104/pp.104.042499.to.

Capítulo 3: Análise comparativa do metaboloma de plantas saudáveis, mecanicamente injuriadas e desafiadas por vírus

RESUMO

Metabolômica é o estudo em que se analisam os perfis de todos, ou da grande maioria, dos metabólitos das células. Essa técnica tem sido utilizada para caracterizar os perfis de plantas infectadas e quantificar os metabólitos envolvidos nas respostas de defesa. Pode ser usado como ferramenta para manipular as plantas para obtenção de plantas resistentes contra patógenos. Um patógeno de particular interesse é o *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), o qual foi recentemente descrito como nova espécie de *Tobamovirus*. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo principal comparar o metaboloma de plantas infectadas por vírus com aquelas que foram apenas injuriadas mecanicamente de uma espécie selvagem (*Solanum pimpinellifolium* L.) e uma cultivar de tomate (*S. lycopersicum* 'VFNT'). As análises foram feitas em cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia a gás, ambas acopladas à espectrometria de massas (CLAE-EM-EM e CG-EM). As plantas selvagens apresentaram padrões diferentes da cultivar, por biossintetizar compostos fenólicos para combater o patógeno. Além disso, houve aumento na concentração de açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos no 1º dia após a inoculação. Os açúcares podem estar envolvidos no processo de sinalização, enquanto os aminoácidos são precursores de moléculas de baixo peso molecular envolvidas na resposta de defesa. A presença do ToMMV pareceu não influenciar o metabolismo da cultivar de tomate, provavelmente pela atividade do gene de resistência *R*, cujo produto impediu que o patógeno se disseminasse pelas células da planta.

Palavras-chave: metabolômica, vírus de planta, dano mecânico

Chapter 3: Comparative analysis of metabolome from healthy plants, mechanically injured and challenged by virus

ABSTRACT

Metabolomics is the study of all, or a great number, of the metabolites produced by an organism. This technique has been used to compare the chemical profile of infected plants to health ones, in addition to quantify the metabolites involved in the defense response. The results can be usefull as a tool to manipulate plants in order to obtain resistant plants against pathogens. One pathogen of particular interest is *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), which has recently been described as a new species of *Tobamovirus*. In this sense, the main goal of this work is to analyze the influence of ToMMV over metabolic profiles of an wild and a cultivar of tomato species artificially infected. The analysis was carried out through high performance liquid chromatography and gas chromatography, both of them coupled to mass spectrometry (HPLC-MS/MS and GC-MS). Wild tomato displayed different patterns from the cultivar species, by biosynthesizing phenolic compounds that could actively ward off the pathogen. Besides, concentration of sugars, organic acids and amino acids increased 1 day after inoculation. Sugars may be involved in signaling process and organic and amino acids can be used as precursors for molecules of low molecular weight involved in the defense response. Apparently, the presence of ToMMV does not influence the metabolism of the cultivar, probably due *R* gene activity preventing the virus to spread through the cells.

Keywords: metabolomics, plant virus, mechanical damage

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo infeccioso causado pelos vírus, há uma grande demanda energética devido à replicação viral e à síntese de novas moléculas que estarão envolvidas nas respostas de defesa da planta. Essa demanda energética pode afetar o estado em que a planta se encontra e alguns autores sugerem que há realocação de recursos que seriam utilizados no crescimento e desenvolvimento da planta para a síntese das moléculas envolvidas nas respostas de defesa. As células infectadas são transformadas em drenos dos produtos da fotossíntese, o que pode acarretar no aumento da taxa respiratória e/ou na diminuição da taxa fotossintética. Entretanto, é difícil prever um cenário que descreva quais alterações metabólicas ocorreriam em determinados sistemas de planta-vírus, pois as infecções causadas por esses patógenos possuem natureza irregular, além da dinamicidade observada nas reações do metabolismo, que são reversíveis e complexas (Herbers et al., 2000; Bolton, 2009; Llave, 2016). Apesar de a ideia acima ser aceita por muitos autores, não há consenso geral entre todos eles a respeito da competição de recursos para defesa ou crescimento e desenvolvimento, mas há poucas dúvidas de que o processo de defesa da planta é energeticamente custoso (Bolton, 2009).

Por ser energeticamente custoso, alguns mecanismos envolvidos no metabolismo primário da hospedeira são alterados, como é o caso do aumento da atividade das invertases da parede celular, o que leva à clivagem da sacarose encontrada no apoplasto em glicose e frutose, as quais serão utilizadas como precursoras na síntese de diversas substâncias envolvidas na resposta de defesa da planta, como os metabólitos secundários (Zhao et al., 2005; Bolton, 2009). A síntese de metabólitos secundários ocorre, na maioria das vezes, posteriormente a outros eventos como abertura de canais de íons e produção de espécies reativas de oxigênio, em uma rede intrincada de vias metabólicas com diversas moléculas sinalizadoras como o óxido nítrico, o ácido salicílico e as poliaminas vistas no **Capítulo 2** desta tese (Zhao et al., 2005; López-Gresa et al., 2010; Moghaddam & Ende, 2012).

O aumento na concentração de açúcares no citoplasma devido ao aumento da atividade das invertases não ocorre apenas para suprir a demanda do metabolismo secundário, mas também tem sido relatado que esses açúcares atuam como sinalizadores para ativar respostas de defesa, podendo estar integrado com os sinais percebidos pelas PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) e atuar no

processo de defesa conhecido como *priming* (Moghaddam & Ende, 2012), assunto já abordado na **Introdução Geral** desta tese.

Dependendo do período após a infecção em que são coletadas as amostras para análise de açúcares, pode haver variações quantitativas, uma vez que, em um primeiro momento, há aumento na concentração de glicose e frutose devido ao aumento na atividade das invertases. Entretanto, essas substâncias serão utilizadas para a síntese das moléculas de defesa, tendo sua concentração diminuída após um certo período. Além do período da coleta, a variação quantitativa também pode ser de origem espacial, uma vez que a ação das invertases é bastante restrita ao local de infecção. Dessa maneira, caso sejam coletadas folhas distantes ao local de infecção ou se for feito um *pool* com folhas distantes e folhas próximas ao local da infecção, a variação quantitativa dos açúcares pode não ser detectada (Bolton, 2009).

Além dos açúcares, outras substâncias que podem ter seus teores alterados em infecções por patógenos são os aminoácidos, apesar de não ser bem delimitado seu papel. Essas substâncias são uma forma de transporte e de armazenamento de nitrogênio. Em casos de grande demanda por carbono, como são os casos de infecção por patógenos, elas são utilizadas em vias que geram energia para a planta, como a via do ácido tricarboxílico, sendo metabolizadas em intermediários como o piruvato, acetoacetato, fumarato, dentre outros (Bolton, 2009; Llave, 2016).

Como já explicado em parágrafo anterior, uma das respostas de defesa das plantas é a produção de metabólitos secundários, que são compostos que não estão diretamente ligados a processos fotossintéticos básicos, nem ao metabolismo respiratório (Theis & Lerda, 2011; Zhao et al., 2005). Dentro dessa classe de substâncias, podem ser encontradas aquelas com baixo peso molecular com atividade antimicrobiana e que são produzidas pelas plantas após submissão a um determinado agente estressante. Essas substâncias são conhecidas como fitoalexinas (Jeandet et al., 2013). Há fitoalexinas que são mais comumente produzidas por indivíduos de determinadas famílias, como o capsidiol e a escopoletina encontradas em Solanaceae. As fitoalexinas podem ser oriundas de diversas classes de metabólitos secundários (Ahuja et al., 2012). Outras substâncias do metabolismo secundário que estão envolvidas em respostas de defesa das plantas são os compostos fenólicos, os quais possuem grande potencial para aumentar a proteção das plantas frente aos estresses bióticos e abióticos (Larbat et al., 2014).

A ação dos metabólitos secundários é bastante estudada em plantas infectadas por fungos, havendo diversos estudos que mostram aumento na concentração de compostos fenólicos (Lyons et al., 1990; Vidhyasekaran et al., 1992; Petkovšek et al., 2009; Kröner et al., 2012). Entretanto, a resposta metabólica de plantas infectadas por vírus não segue um padrão, podendo haver aumento, diminuição ou nenhuma alteração (Bruni et al., 2006; Bruni et al., 2007; Duarte et al., 2008; Nagai et al., 2011).

O perfil metabólico geral das plantas submetidas a estresse é a melhor ferramenta para identificação dos compostos envolvidos na sinalização das respostas de defesa, uma vez que esses compostos poderão agir antes mesmo de ocorrer alterações proteicas ou transcricionais. Além disso, utilizando a cromatografia a gás associada à espectrometria de massas (CG-EM), é possível observar o perfil de centenas de substâncias pertencentes a classes químicas diversas, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, aminas aromáticas, polióis e ácidos graxos (Shulaev et al., 2008). O perfil metabólico pode ser obtido através de diversas técnicas analíticas, como CG-EM mencionado anteriormente e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com absorvância no UV-visível e/ou arranjo de fotodiodos (CLAE-UV/DAD) e CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM-EM). A combinação dessas técnicas é necessária para analisar a maioria dos metabólitos com estruturas, polaridades e pesos moleculares distintos (Shulaev, 2006; Shuman et al., 2011).

2.OBJETIVOS

Utilizando a análise do perfil metabólico, esse capítulo teve como objetivo comparar quantitativa e qualitativamente o perfil de compostos fenólicos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM-EM) e o perfil geral de metabólitos analisados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) de plantas sadias com aquelas submetidas a estresse mecânico e de plantas submetidas a estresse mecânico com as infectadas pelo ToMMV.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

As amostras de *Solanum pimpinellifolium* L. e de *Solanum lycopersicum* 'VFNT' provenientes do experimento detalhado na **Introdução Geral** foram coletadas um dia após a inoculação (DAI) e semanalmente até completar 28 dias (1, 7, 14, 21 e 28 DAI). De cada grupo (Controle, Tampão e Infectadas) foram coletadas 10 amostras nos cinco períodos, totalizando 150 amostras por espécie.

As amostras que seriam destinadas para análise em CLAE-EM-EM foram coletadas em sacos de papel e secas em estufa a 37 °C por uma semana. As amostras destinadas a CG-EM foram coletadas em papel alumínio, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até o momento da análise.

3.2. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A extração dos metabólitos para análise em cromatografia líquida de alta eficiência foi adaptada de Bazzini et al. (2011). Para isso, foi realizada maceração a quente (50 °C) por 30 min com folhas secas e pulverizadas de *S. pimpinellifolium* e de *S. lycopersicum* 'VFNT' na concentração de 20 mg/mL, utilizando MeOH 80%.

Após a extração, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado para injeção em CLAE (Agilent modelo 1200). Para análise dos metabólitos, foi utilizado protocolo de Lariat et al. (2014), utilizando-se como fase móvel ácido fórmico a 0,1% em água (A) e ácido fórmico a 0,1% em MeOH (B) com o fluxo de 0,7 mL/min. A coluna utilizada foi a CB 18 – 250 x 4,6 mm, 5,0 µm, com a seguinte programação (% solventes/min): Isocrático a 1% de B por 2 min, então gradiente linear de 1 a 50% de B por 50 min e outro gradiente linear de 50 a 90% de B por 20 min. A detecção foi feita nos seguintes comprimentos de onda: 352, 325, 300 e 280 nm.

Para identificação das substâncias, uma amostra foi analisada através de CLAE (Shimadzu – CBM 20A) acoplada ao Espectrômetro de Massas (Amazon Speed ETD) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando os mesmos parâmetros cromatográficos acima. O espectrômetro de massas foi ajustado em modo negativo (ESI⁻), voltagem do capilar de 4500 V, nebulizador a 27 psi, fluxo do gás de secagem de 7 L/min e temperatura do capilar de 300 °C, com amplitude de massas de 50 a 1500 *m/z*. A segunda fragmentação (EM2) foi realizada com os dois íons mais abundantes do respectivo tempo.

A quantificação das substâncias foi feita através da construção de curvas-padrão com dois padrões distintos: ácido clorogênico (CAS 372-97-9; concentrações de 3,125 – 1.000 µg/mL) para ácidos fenólicos e rutina (CAS 207671-50-9; concentrações de 1,563 – 750 µg/mL) para flavonoides, tomando como referência os valores dos cromatogramas processados no comprimento de onda no qual a substância apresentava o máximo de absorção.

3.3. Análise por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

O perfil químico das folhas de *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* 'VFNT' foi obtido a partir de protocolo adaptado de Lisec et al. (2006). Nessa análise, 100 mg de folhas frescas e congeladas em nitrogênio líquido foram trituradas em almofariz com o auxílio de pistilo. Importante ressaltar que nessa etapa, foi imprescindível a manutenção das folhas sob baixa temperatura a fim de evitar seu descongelamento. As folhas pulverizadas foram transferidas para tubos de centrifuga de 2 mL com auxílio de funil, o qual também foi mantido em baixas temperaturas. Foram adicionados 1400 µL de MeOH e 60 µL de ribitol (0,2 mg.mL⁻¹ em água), agitados vigorosamente em vortex e mantidos em termomixer a 70 °C, sob agitação de 950 rpm por 15 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.621 g e o sobrenadante coletado em tubos de vidro. A esse sobrenadante foram adicionados 750 µL de CHCl₃ e 1500 µL de água MilliQ. As amostras foram agitadas em vortex e novamente centrifugadas a 2.200 g por 15 min, originando duas fases de partição.

Uma alíquota de 100 µL da fase de partição polar foi transferida diretamente para inserts de 400 µL, seca em concentrador de amostras (Thermo Scientific™ Savant™ SC250EXP SpeedVac™ Concentrator) e posteriormente submetida à reação de derivatização.

A reação de derivatização consistiu em adicionar 28 µL de hidrocloreto de metoxiamina (20 mg.mL⁻¹ em piridina) a 37 °C por 2 h. Após esse período, acrescentou-se 48 µL de MSTFA (N-Methyl-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida), sendo mantido a 37 °C por 30 min.

Finalizada a reação de derivatização, 1 µL de cada amostra foi injetado em modo *splitless* em cromatógrafo a gás (Agilent Technologies 6890N) acoplado ao espectrômetro de massas (Agilent 5975). A coluna utilizada foi a RTX-5Sil MS (30 m;

0,25 mm; 0,25 µm) com pré-coluna de 10 m, com fluxo constante de hélio a 1 mL/min. A temperatura do injetor foi de 230 °C e a programação para as amostras da fase polar foi a seguinte: de 0 a 5 min, isotérmico a 70 °C, seguida de rampa de aquecimento de 5 °C por min até 330 °C e mantidos por 5 min. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram: voltagem da eletromultiplicadora (EM) de 70 eV, fonte de íons a 200 °C, temperatura do quadrupolo 150 °C, espectro de massas a 2 scan/s com varredura de m/z de 50 a 600. Solvente delay: 9-10 min.

Para análise das substâncias em CG-EM foram adotados os seguintes critérios: *threshold* de 20 e apenas substâncias com áreas que correspondessem a pelo menos 1% do total foram consideradas. Entretanto, caso a substância já tivesse sido encontrada em pelo menos uma das réplicas com porcentagem maior ou igual a 1%, independente do grupo e do dia após a inoculação e apresentasse área menor que 1% em outra(s) réplica(s), ela também foi considerada.

Para cada substância foi calculado o índice de retenção linear (IRL), utilizando kit de hidrocarbonetos (Código Sigma – 04070) padrão com homólogos de cadeia de 8 a 20 carbonos. A esse kit de hidrocarbonetos foram adicionados separadamente cada um dos padrões de alcanos com 21 a 28 carbonos, exceto o padrão com 27 carbonos. O IRL foi calculado de acordo com a seguinte equação retirada de Viegas & Bassoli (2007):

$$\text{IRL} = 100 * [(t_c - t_n)/(t_{n+1}/t_n) + n], \text{ onde:}$$

t_c – tempo de retenção do composto de interesse; t_{n+1} – tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n – n° de carbonos do hidrocarboneto anterior.

A identificação das substâncias foi feita utilizando-se a biblioteca NIST02, o banco de dados da NIST Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook, a base de dados online “Golm Metabolome Database” (Hummel et al., 2010), assim como a literatura. Quando o *match* fornecido pela NIST02 foi maior que 900, a identificação da substância foi realizada através desse banco de dados, com a confirmação nos outros bancos de dados citados acima e também na literatura. Em substâncias cujo *match* foi menor que 800, sua identificação foi feita com base na comparação com espectros de massas disponíveis na literatura e nos bancos de

dados de espectros de massas disponíveis *online*. Além do padrão de fragmentação, o IRL também foi levado em consideração para a identificação da substância.

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas através do programa R versão 3.2.0 (2015-04-16) e do Graphpad Prism versão 6.0. Para as análises estatísticas, só foram consideradas diferenças significativas nas comparações, em um mesmo dia de amostragem, entre plantas controle versus plantas friccionadas com tampão e plantas friccionadas com tampão versus plantas desafiadas com vírus. Não foram consideradas diferenças entre dias de amostragem diferentes dentro de um mesmo tratamento, ou em tratamentos diferentes. Para representar o grau de significância da análise, foram utilizados os seguintes símbolos: * significativo ($p \leq 0,05$); ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$).

Os dados, tanto da análise em CLAE, quanto em CG-EM, foram quantificados e esses valores expressos em μg de substância/g planta, foram utilizados para os testes estatísticos, exceto aquelas não identificadas por CG-EM.

A normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade, pelo teste de Bartlett. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Uma vez que nem todas as amostras apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Wilcoxon com 5% de significância. Os dados foram analisados e apresentados em forma de *heatmap* (pacote heatmap.2), no qual constam os valores de p transformados de acordo com a seguinte equação:

$r = -\log_{10}(p) * \text{sinal}(W)$, onde p é o valor da probabilidade do resultado apresentado ter sido causado devido ao acaso e sinal de W foi o sinal da estimativa do teste de Wilcoxon (Key, 2012).

No *heatmap*, os pontos em branco indicam que não houve diferença estatística ou indicam a ausência de determinado dado, pois o tipo de agrupamento utilizado pelo pacote heatmap.2 não permitiu a diferenciação de valores ausentes dos que não apresentam diferença estatística. Os pontos apresentados em vermelho e azul indicam diferenças estatísticas de acordo com o sinal obtido na estimativa do teste de Wilcoxon. Assim, nas comparações entre os pares de tratamentos (plantas controle *versus* plantas friccionadas com tampão e plantas friccionadas com tampão *versus*

plantas desafiadas com vírus), os resultados negativos, ou seja, maior concentração no segundo grupo em relação ao primeiro, são apresentados em azul. Já os resultados positivos, ou seja, maior concentração no primeiro grupo em relação ao segundo, são mostrados em vermelho.

Para a construção dos dendogramas, foi utilizado a distância Euclidiana e o agrupamento pelo método de completa ligação (*complete linkage method*). A distância Euclidiana não permite valores faltando (*missing values*) na tabela. Desse modo, todos os valores faltantes foram substituídos por 0,001 como proposto por Key, 2012 para a construção do *heatmap*. Assim, tanto substâncias que não apresentaram diferenças estatísticas, quanto aquelas com valores faltando apresentam-se na coloração branca.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. METABÓLITOS ANALISADOS POR CLAE

A análise por CLAE foi monitorada em quatro comprimentos de onda diferentes (280, 300, 325 e 352 nm). A maioria das substâncias possuía pico máximo de absorção próximo a 325 nm, com exceção de algumas substâncias como a rutina, a qual apresenta máximo de absorção em 352 nm. Dessa forma, serão utilizados os cromatogramas monitorados em 325 nm para ilustrar as substâncias detectadas.

Os cromatogramas referentes aos extratos hidrometanólicos de folhas de *S. pimpinellifolium* e de *S. lycopersicum* 'VFNT' possuem perfis muito semelhantes. Entretanto, a abundância das substâncias das duas espécies é bastante discrepante, com a espécie selvagem (**Figura 3.1.a.**) apresentando concentração muito menor que a cultivar (**Figura 3.1.b.**). A comparação dos dois cromatogramas na **Figura 3.1** é direta, pois estão na mesma escala e as amostras foram injetadas na mesma concentração (20 mg/mL).

Como a abundância relativa das substâncias encontradas em *S. lycopersicum* 'VFNT' é cerca de quatro vezes maior que em *S. pimpinellifolium*, a visualização dos picos no cromatograma obtido para esta segunda espécie é mais difícil. Por essa razão os dois cromatogramas numerados estão em escalas diferentes (**Figura 3.2**). Os 35 picos apresentados nessa figura encontram-se na **Tabela 3.1**. Muitas substâncias minoritárias não puderam ser identificadas até o momento, mas estão indicadas na tabela pois apresentaram variação quantitativa entre os grupos analisados (Controle, Tampão, Infectadas).

Figura 3.1. Cromatogramas dos extratos hidrometanólicos de folhas de **a.** *S. pimpinellifolium* e **b.** *S. lycopersicum* 'VFNT'. $\lambda = 325$ nm.

A identificação das substâncias foi feita por CLAE-EM-EM (**Apêndice II – Figuras II.1 a II.5**) e os resultados obtidos nessa análise foram comparados com o artigo que analisou os compostos fenólicos de folhas de tomate (Larbat et al., 2014). A segunda fragmentação (EM2) foi feita, geralmente, com os dois íons mais abundantes da primeira fragmentação (EM1) escolhidos pelo programa do computador. Esses íons nem sempre resultaram em fragmentos informativos da substância, pois comparando-os com os obtidos por Larbat e colaboradores (2014) não foi possível fazer a correspondência entre os fragmentos da EM2 obtidos nesse trabalho com os do trabalho citado. Pode-se citar o derivado de feruloil como exemplo. O íon molecular dessa substância possui m/z de 321,15. A segunda fragmentação resulta nos íons 177 (100), 145 (8) e 260 (8), sendo os números em parênteses a porcentagem relativa de cada fragmento. No espectro de massas obtido com as amostras foliares de *S. pimpinellifolium* foi possível encontrar uma substância com fragmento de m/z de 321,09. Possivelmente seja um derivado de feruloil. Entretanto, a segunda fragmentação não foi realizada com esse fragmento, mas com os de m/z de 388,99 e 642,97. Essa segunda fragmentação não resultou nos íons 177, 145 e 260, pois não feita com o íon de 321,09. O fragmento de 642,97 provavelmente seja resultante de um íon dimérico formado pela associação do íon 321,09 com sua forma neutra (Vessecchi et al., 2011). A segunda fragmentação com o íon 642,97 resultou novamente no íon de 321,09, fornecendo uma informação que já havia sido dada pela

primeira fragmentação. Por essa razão, para essa substância só será fornecido o dado referente à primeira fragmentação.

No artigo de Larbat e colaboradores (2014), as substâncias encontradas foram classificadas em cinco grupos de acordo com as estruturas. Os cinco grupos são: ésteres hidroxicinamoílicos, fenolamidas, flavonoides, antocianinas e compostos parcialmente identificados. Nas duas espécies analisadas neste trabalho, não foram encontradas antocianinas, porém foi encontrada uma substância classificada em um grupo distinto - diidroxibenzoico. Dessa maneira, as substâncias analisadas por CLAE desta tese foram classificadas em seis grupos: 1) ésteres hidroxicinamoílicos, 2) fenolamidas, 3) flavonoides, 4) diidroxibenzoicos, 5) compostos parcialmente identificados e, por fim, 6) compostos não identificados.

No grupo dos ésteres hidroxicinamoílicos, as substâncias mais polares foram identificadas como isômeros do ácido cafeoil hexárico (Larbat et al., 2014), como é o caso das substâncias 1, 3 a 6 e 8. Essas substâncias são derivadas do ácido cafeico esterificado com moléculas de ácido hexárico (Dudek et al., 2016). Os ácidos glucárico e galactárico são isômeros do ácido hexárico e já foram encontradas moléculas de ácido cafeoil glucárico e ácido cafeoil galactárico nas folhas e em plântulas de tomate (Elliger et al., 1981; Strack & Gross, 1990; López-Gresa et al., 2012). Além de derivados do ácido cafeico, também foram encontrados derivados do ácido quínico (substâncias 7, 13 e 14) e do ácido ferúlico (substância 17). Os derivados de ácido quínico foram identificados através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e comparação com a literatura. Foram obtidos o ácido 3-cafeoilquínico (ácido neoclorogênico), o ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico) e outro isômero do ácido clorogênico. O ácido clorogênico também foi identificado através de comparação do tempo de retenção com amostra autêntica. Em relação ao derivado de ácido ferúlico, foi observada uma substância com um fragmento de 367,04 unidades de massa atômica (u.m.a), o qual corresponde à massa menos um hidrogênio ($M - H$)⁻ do ácido feruloil quínico (substância 17). Entretanto, na segunda fragmentação do íon de 367,04 u.m.a não foi obtido o íon de 191 u.m.a, que é o pico base dessa segunda fragmentação (**Apêndice II – Figura II.4.b**). Assim, a identificação da substância 17 necessita de confirmação. Outra substância que foi colocada nesse grupo é o ácido cafeico (substância 15). Apesar de não ser um éster hidroxicinamoílico, foi o único derivado hidroxicinâmico detectado e sua identificação

foi baseada em artigo que investigou derivados de ácido cafeico e flavonoides em espécies de Asteraceae (Bazylo et al., 2015).

Figura 3.2. Cromatogramas dos extratos hidrometanólicos de folhas de **a.** *S. pimpinellifolium* e **b.** *S. lycopersicum* 'VFNT'. $\lambda = 325$ nm. Os números correspondem as substâncias da **Tabela 3.1**.

No grupo das fenolamidas foram encontradas substâncias com fragmentos de massa menos um hidrogênio ($M - H$)⁻ correspondentes aos da tiramina cumaroil – 282,10 u.m.a (substância 26) e da tiramina feruloil – 312,05 u.m.a (substância 28). Entretanto, assim como ocorreu com o ácido feruloil quínico, não foram detectados outros íons característicos da tiramina cumaroil, sendo necessárias mais análises a fim de comprovar a identidade da substância 26.

Dentre os flavonoides, a única classe observada foi a dos flavonóis, com a presença de derivados de campferol (substância 27) e de quercetina (substância 24). A substância 24 foi identificada como rutina através da análise do padrão de fragmentação e também por comparação do tempo de retenção com amostra autêntica. Em relação aos diidroxibenzoicos, a única substância observada foi o ácido gentísico (substância 11), o qual foi identificado através da comparação do tempo de retenção de amostra autêntica e não foi detectado na análise por espectrometria de massas. Dentre as substâncias parcialmente identificadas, encontram-se um derivado de feruloil (substância 16). Por fim, as substâncias 2, 9, 10, 12, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35 não puderam ser identificadas.

Tabela 3.1. Substâncias analisadas por CLAE-EM-EM com seus respectivos tempos de retenção, comprimento máximo de absorção em UV-vis e o nome da molécula proposta.

Nº do pico	TR (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Molécula proposta
1	11,07	300, 326	ácido cafeoil hexárico 1
2	11,54	300, 326	N.I.1
3	14,20	300, 326	ácido cafeoil hexárico 2
4	14,63	300, 326	ácido cafeoil hexárico 3
5	15,59	300, 326	ácido cafeoil hexárico 4
6	16,02	300, 326	ácido cafeoil hexárico 5
7	18,36	300, 326	ácido neoclorogênico
8	18,74	300, 326	ácido cafeoil hexárico 6
9	20,12	286, 316	N.I.2
10	21,79	256, 306	N.I.3
11	22,80	330, 284	ácido gentísico
12	23,40	294, 316	N.I.4
13	25,27	300,326	ácido clorogênico
14	26,03	300,326	isômero ác. clorogênico
15	26,71	300, 324	ácido cafeico
16	26,89	300, 320	derivado de feruloil
17	29,42	285,326	isômero ác. feruloil quínico
18	33,30	296,324	N.I.5
19	33,95	310	N.I.6
20	37,38	300, 324	N.I.7
21	37,83	282, 324	N.I.8
22	38,65	285, 326	N.I.9
23	40,23	322, 300	N.I.10
24	43,03	256, 356	rutina
25	46,97	320	N.I.11
26	47,26	290, 308	tiramina cumaroil
27	47,88	262,349	campferol 3-O- rutinosídeo
28	49,41	296, 320	tiramina feruloil
29	51,99	300, 322	N.I.12
30	52,94	314	N.I.13
31	55,28	288,326	N.I.14
32	59,87	266, 338	N.I.15
33	60,68	318	N.I.16
34	66,27	318	N.I.17
35	68,18	332	N.I.18

N.I. = não identificado.

Para fazer a quantificação das substâncias, foram utilizadas curvas padrão de ácido clorogênico ($R^2 = 0,9992$) para os ácidos fenólicos e de rutina ($R^2 = 0,9993$) para

os flavonoides. Os resultados são expressos em μg Equivalentes de ácido clorogênico ou rutina por grama de planta (μg Eq. ác. clorogênico/g planta ou μg Eq. rutina/g planta) (ver **Apêndice II – Tabelas II.10 a II.15**). Após a quantificação, foram realizados os testes de homocedasticidade e o de Wilcoxon para comparação quantitativa das substâncias entre os grupos (ver **Apêndice II – Tabelas II.1 a II.4**).

A **Figura 3.3** apresenta um *heatmap* com os cinco períodos analisados, comparando o grupo Controle com o Tampão (CT) e o grupo Tampão com o das Infectadas (TI) das duas espécies analisadas. Nessa figura, pode-se perceber claramente que o metabolismo secundário envolvendo as substâncias fenólicas de *S. lycopersicum* 'VFNT' (**Figura 3.3.b**) foi muito menos afetado comparado com *S. pimpinellifolium*, que apresentou variações estatísticas de diversas substâncias.

Os dendrogramas mostram o resultado de um agrupamento hierárquico. Nesse caso, cada substância representada por um número à direita de cada *heatmap* é um objeto ou um grupo de tamanho 1. Quando dois objetos ou grupos são unidos, uma linha é desenhada conectando os dois grupos, correspondendo à similaridade entre eles. A escolha de outro grupo que ficará à direita ou esquerda é feita de forma arbitrária (Key, 2012). Nos *heatmaps* abaixo, pode-se observar a formação de dois grandes grupos na **Figura 3.3**, apontados pelas setas vermelhas. Essa separação parece ter levado em consideração se a variação quantitativa foi positiva (representada em vermelho) ou negativa (representada em azul). Na **Figura 3.3.a.**, no grupo superior, as variações que prevalecem parecem ter sido negativas, ou seja, quando essas substâncias variaram, houve aumento na concentração no grupo tratamento em relação ao controle. Já no grupo inferior, prevalecem as variações positivas, ou seja, no grupo tratamento tais substâncias diminuíram em concentração. Já na **Figura 3.3.b**, as variações que prevalecem no grupo superior são as positivas e no grupo inferior, são as negativas.

Em *S. pimpinellifolium*, no 1º DAI, houve variação quantitativa de oito substâncias no grupo TI, sendo que o teor de seis substâncias foi menor nas plantas infectadas e a concentração de apenas duas delas aumentou. Essas duas substâncias não puderam ser identificadas [N.I. 9 e N.I. 25] e elas representam apenas 6% do total de substâncias analisadas por CLAE, indicando que o metabolismo secundário não

Figura 3.3. Gráficos do tipo *heatmap* evidenciando variações significativas nos diferentes dias após a inoculação (1, 7, 14, 21 e 28) entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infetadas (TI) na análise das substâncias em CLAE-EM-EM. Os números a direita de cada *heatmap* representam as substâncias fenólicas mostradas na **Tabela 3.1**. **a.** *Heatmap* obtido para *S. pimpinellifolium*. **b.** *Heatmap* obtido para *S. lycopersicum* 'VFNT'. Os resultados negativos, ou seja, maior concentração no segundo grupo de cada par em relação ao primeiro, são apresentados em azul. Já os resultados positivos, ou seja, maior concentração no primeiro grupo de cada par em relação ao segundo, são mostrados em vermelho. Os dendrogramas foram obtidos através do método de completa ligação com as setas vermelhas apontando dois grandes grupos formados.

sofreu grande influência nesse dia do experimento com a presença do vírus. Em relação ao grupo CT, foi observada variação quantitativa de três substâncias, as quais apresentaram maior concentração nas plantas injuriadas mecanicamente. Essas três substâncias pertencem a três grupos distintos. Uma delas se enquadra no grupo dos flavonoides e foi identificada como campferol 3-O-rutinosídeo [27]. Outra substância foi classificada no grupo dos ésteres hidroxycinamoílicos e é um isômero do ácido clorogênico [14]. Apesar de terem sido separadas em dois grupos, essas duas substâncias têm características em comum, ou seja, a presença de hidroxilas livres, que lhes conferem um papel como antioxidante. Por fim, a terceira substância pertence ao grupo das fenolamidas e foi identificada como tiramina cumaroil [26]. A função das fenolamidas ainda é pouco conhecida, mas pode-se inferir que participem em respostas de defesa das plantas (Larbat et al., 2014). Uma de suas principais funções é a de reforçar a parede celular para prevenir a invasão de patógenos com a suberização dos tecidos (Guillet & De Luca, 2005). Dessa forma, a substância

identificada como tiramina cumaroil apresentou aumento em sua concentração no 1º dia do experimento, provavelmente, em decorrência do ferimento causado pela fricção do pistilo contra as folhas.

Pode-se perceber que as substâncias que variaram devido à infecção pelo vírus não foram as mesmas da injúria mecânica, embora já tenha sido relatado que as respostas de defesa decorrentes de estresse abiótico se sobrepõem àquelas que ocorrem devido a estresse biótico (Zhao et al., 2005).

No 7º DAI, dentre as nove substâncias que tiveram variações nas concentrações, cinco delas apresentaram aumento nas plantas infectadas. Uma delas foi como identificada campferol 3-O-rutinosídeo [27], cujo teor também aumentou no 1º dia do experimento nas plantas injuriadas mecanicamente. Como discutido no parágrafo anterior, a sobreposição das respostas de defesa disparadas por estresse biótico e abiótico poderia ser uma explicação para o aumento da concentração desse flavonoide tanto nas plantas injuriadas mecanicamente quanto nas infectadas. A injúria mecânica foi percebida pela planta mais rapidamente, já no 1º DAI. A partir do 7º DAI, com a concentração viral mais elevada, a presença do patógeno poderia ter disparado a defesa desempenhada pelo flavonoide, o qual possui participação conhecida nessas respostas (Forkmann & Martens, 2001). Infelizmente, as outras quatro substâncias que apresentaram teores maiores nas plantas infectadas no 7º DAI não puderam ser identificadas [10, 18, 29 e 30].

Assim como ocorreu com as substâncias do 1º DAI, as substâncias ativadas nas plantas infectadas foram diferentes das ativadas nas plantas mecanicamente injuriadas. Outro fato interessante é que, comparando os mesmos grupos (CT ou TI) no 1º e 7º DAI (**Figura 3.4**), as substâncias que tiveram variações quantitativas não foram as mesmas. Por exemplo, houve aumento na concentração de uma substância não identificada [N.I. 9] no 1º DAI, mas esse aumento não foi observado no 7º DAI das plantas infectadas, chegando a diminuição vista no 14º DAI.

Comparando-se o 1º e o 7º DAI do patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV, pode-se perceber que nesse último houve maior quantidade de substâncias apresentando variação quantitativa, mais uma vez reforçando que as respostas de defesa ativadas na interação planta-patógeno do tipo compatível são tardiamente ativadas (López-Gresa et al., 2016).

Figura 3.4. Gráficos do tipo *heatmap* evidenciando variações significativas entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infectadas (TI) na análise das substâncias em CLAE-EM-EM nos diferentes dias após a inoculação (1, 7, 14, 21 e 28). Os números a direita de cada *heatmap* representam as substâncias fenólicas mostradas na **Tabela 3.1**. **a.** *Heatmap* obtido para *S. pimpinellifolium*. **b.** *Heatmap* obtido para *S. lycopersicum* 'VFNT'. Os resultados negativos, ou seja, maior concentração no segundo grupo de cada par em relação ao primeiro, são apresentados em azul. Já os resultados positivos, ou seja, maior concentração no primeiro grupo de cada par em relação ao segundo, são mostrados em vermelho. Os dendrogramas foram obtidos através do método de completa ligação.

Houve aumento no teor de seis substâncias nas plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas no 14^o DAI. Uma dessas substâncias é o ácido clorogênico [13]. Esse aumento também ocorreu nos 21^o e 28^o DAI, mas não de maneira tão expressiva quanto no 14^o DAI, como pode ser observado pela atenuação da coloração azul nesses dias posteriores (**Figura 3.3.a**). O aumento na concentração de ácido clorogênico no 14^o DAI foi coincidente com a observação visível de sintomas como afilamento foliar em *S. pimpinellifolium* e com a alta concentração viral observada em 100% das plantas analisadas (**ver Capítulo 2, Figuras 2.5 e 2.6**). O ácido clorogênico pode mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo nas plantas (Niggeweg et al., 2004). Como visto no **Capítulo 2**, houve aumento na concentração de ácido salicílico livre nas plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas pelo ToMMV no 7^o DAI. Foi discutido que o ácido salicílico pode sinalizar para o aumento na produção das EROs, as quais poderiam causar o estresse oxidativo. Dessa maneira, além dos antioxidantes não enzimáticos representados pelo ácido ascórbico e glutathione, também houve aumento

na concentração de ácido clorogênico para contrabalancear os efeitos danosos ocasionados pelas EROs. Interessante observar que no 14º DAI, houve redução significativa de ácido cafeico [15] nas plantas infectadas, sugerindo que essa substância tenha sido utilizada na biossíntese do ácido clorogênico (Dewick, 2009).

O aumento na concentração do ácido clorogênico pode ser explicado por duas hipóteses: uma é a de mitigar os efeitos das EROs. Outra hipótese é de que essa substância pode desempenhar um papel direto como antimicrobiano, assim como foi relatado para outro composto fenólico, a escopoletina, pois essas substâncias contribuem para criar um ambiente altamente inóspito para o patógeno (Costet et al., 2002). Também foi relatado aumento no teor de ácido clorogênico em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) infectadas com o TMV e os autores discutiram que os fenilpropanoides podem servir como fitoanticipinas em muitas espécies de plantas (Choi et al., 2006), ou seja, são inibidores pré-formados e não induzidos após a infecção. No caso de *S. pimpinellifolium*, o ácido clorogênico poderia ser classificado como fitoalexina, ao invés de fitoanticipina, pois a concentração dessa substância apresentou grande aumento nas plantas infectadas. Entretanto, Dixon (2001) discutiu que, em casos em que um metabólito constitutivo é produzido em grande quantidade após uma infecção, seu status como fitoalexina ou fitoanticipina depende se a concentração constitutiva do metabólito é suficiente para possuir atividade antimicrobiana. Dessa forma, seria necessário realizar um ensaio em que a concentração basal ou constitutiva de ácido clorogênico em *S. pimpinellifolium* fosse testada como antimicrobiana frente ao ToMMV. Em caso positivo, o ácido clorogênico poderia ser corretamente classificado como fitoanticipina para *S. pimpinellifolium* frente à infecção pelo ToMMV.

No 14º DAI, outra substância que apresentou aumento da mesma magnitude que o ácido clorogênico nas plantas infectadas foi o campferol 3-O-rutinosídeo [27]. O derivado de feruloil, outro fenilpropanoide também apresentou aumento na concentração. Essas três substâncias derivadas de fenilpropanoides desempenham papel nas respostas de defesa já bastante conhecido (Dixon et al., 2002). Outra substância que variou significativamente nas plantas infectadas no 14º DAI foi um dos isômeros do ácido cafeoil hexárico [5], a qual já se mencionou anteriormente que desempenha papel de defesa nas plantas (Larbat et al., 2014). As outras três substâncias não puderam ser identificadas.

Foi observada variação quantitativa da rutina [24] nas plantas infectadas no 21º DAI. Sabe-se que os flavonoides desempenham papel na infecção contra patógenos. Entretanto, no patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV, a rutina parece ter desempenhado papel secundário em relação ao ácido clorogênico, uma vez que sua variação ocorreu apenas no 21º DAI, com menor significância. Também foi observado aumento no teor de dois isômeros de ácido cafeoil hexárico [1 e 6]. Essas substâncias são sintetizadas a partir da doação do grupo acil do ácido clorogênico para o ácido hexárico (Strack et al., 1987). Dessa maneira, pode-se perceber a concentração de ácido clorogênico [13] não se manteve tão alta nas plantas infectadas no 21º comparado com o 14º DAI e é provável que isso tenha acontecido devido à biossíntese dos isômeros do ácido cafeoil hexárico [1, 3 a 6 e 8].

Uma substância não identificada [N.I. 34], foi uma das únicas substâncias cuja variação quantitativa foi observada em dois períodos seguidos do experimento. Assim como no 21º, houve aumento na concentração dessa substância no 28º DAI e esse aumento foi mais significativo nesse último dia. É muito provável que essa substância esteja envolvida na atividade antioxidante da planta, assim como o ácido clorogênico [13], o qual também manteve o alto teor no 28º DAI. Analisando esses resultados juntamente com o teor de ácido salicílico e dos antioxidantes ácido ascórbico e glutathione (**ver Capítulo 2**), pode-se afirmar que o estresse oxidativo causado pela presença do patógeno foi de tamanha magnitude que a planta manteve seu sistema antioxidante ativo desde o 14º até o 28º DAI.

Um resultado interessante observado no patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV foi a diminuição no teor de ácido gentísico [11] nas plantas infectadas. Já foi relatada indução dessa substância em plantas de tomate e de pepino (*Cucumis sativus* L.) infectadas por prunus necrotic ringspot virus. A interação entre esse vírus e as duas espécies de plantas foi do tipo compatível (Fayos et al., 2006). Por essa razão, esperava-se que na interação compatível observada em *S. pimpinellifolium* e o ToMMV, também ocorresse aumento no teor dessa substância. É possível que não tenha ocorrido aumento na concentração de ácido gentísico devido à maior expressão da enzima cinamato 4-hidroxilase, a qual hidroxila o ácido cinâmico na posição 'para', dando origem ao ácido *p*-cumárico que origina o ácido cafeico utilizado na biossíntese do ácido clorogênico. Caso a maior expressão fosse da cinamato 2-hidroxilase, seria sintetizado o ácido 2-cumárico que, após sucessivas reações, seria convertido em

ácido salicílico que é precursor do ácido gentísico (Dewick, 2009) (**Figura 3.5**). Além disso, os derivados hidroxicinâmicos possuem atividade antioxidante maior que os derivados de ácido benzoico, pois o grupamento $--CH=CH--COOH$ garante maior habilidade de doação de elétrons e a subsequente estabilização do radical livre do que o grupo carboxílico nos ácidos benzoicos (Rice-Evans et al., 1996).

Figura 3.5. Possíveis rotas biossintéticas a partir do ácido cinâmico. Adaptado de Dewick, 2009.

Em relação às substâncias analisadas por CLAE-EM-EM em *S. lycopersicum* 'VFNT', pode-se perceber que houve pouca variação comparada com as de *S. pimpinellifolium* e as variações foram de menor magnitude como pode ser observado pela coloração menos intensa de azul e de vermelho. Essas variações ocorreram até o 14º DAI (**Figura 3.3.b**).

No 1º DAI, houve diminuição na concentração de dois isômeros de ácido cafeoil hexárico [4 e 8] e do ácido neoclorogênico [7], além de outras duas substâncias não identificadas nas plantas infectadas. Como discutido anteriormente, os isômeros de ácido cafeoil hexárico e o ácido neoclorogênico são fenilpropanoides que desempenham papel de defesa (Dixon et al., 2002). Desta maneira, esperava-se que ocorresse aumento no teor dessas substâncias nas plantas infectadas. Nas plantas injuriadas mecanicamente, houve aumento na concentração de uma substância não identificada, mas que provavelmente esteja envolvida na resposta a dano mecânico.

No 7º DAI, não houve variação quantitativa de nenhuma substância nas plantas infectadas. Porém, ocorreu aumento na concentração de rutina [24], de campferol 3-O-rutinosídeo [27] e de ácido cafeico [15] nas plantas friccionadas com o tampão. Essas respostas devem ser melhor investigadas, pois a fricção do pistilo é um estímulo pontual, o que deveria desencadear respostas rápidas.

Algumas substâncias que tiveram diminuição da concentração no 1º DAI também apresentaram essa resposta no 14º DAI nas plantas infectadas, como é o caso dos isômeros de ácido cafeoil hexárico [4 e 8], do ácido neoclorogênico [7] e de uma substância não identificada [N.I. 2]. Além dessas, também houve diminuição na concentração de outros isômeros de ácido cafeoil hexárico [1, 3 e 5] e do derivado de feruloil [16].

Os resultados obtidos para *S. lycopersicum* 'VFNT' indicam que a planta não ativou o metabolismo das substâncias fenólicas nas plantas infectadas, pois estas não apresentavam estado de estresse oxidativo, como *S. pimpinellifolium*, na qual foi detectado grande aumento no teor de alguns fenólicos, como o ácido clorogênico [13]. Nas plantas de *S. lycopersicum* 'VFNT' a concentração de ácido clorogênico não variou em nenhum período analisado para nenhum dos dois grupos (**Figura 3.3.b**). Isso pode ser explicado porque a concentração basal dessa substância já é elevada, comparada com a de *S. pimpinellifolium* (**Figura 3.1**). Entretanto, a explicação mais plausível para a não observação de variação no teor de ácido clorogênico [13] nas plantas de *S. lycopersicum* 'VFNT' infectadas com o ToMMV é devido à resposta conhecida como resistência extrema, a qual já foi abordada no **Capítulo 2**. Nesse caso, o patógeno não obteve sucesso em infectar a planta e, por essa razão, o metabolismo da planta não foi afetado.

Em *S. pimpinellifolium*, que se mostrou suscetível ao vírus, a concentração de ácido clorogênico e de outros ácidos fenólicos foi inerentemente inferior a de *S. lycopersicum* 'VFNT', que foi resistente ao patógeno (**Figura 3.1**). Entretanto, com a infecção, o teor de ácido clorogênico na espécie suscetível chegou a se igualar com a concentração dessa substância em *S. lycopersicum* 'VFNT' (**Figura 3.6**) e aumentou cerca de 9 vezes comparado com o grupo Tampão da mesma espécie.

Figura 3.6. Comparação da concentração de ácido clorogênico (ug/ g planta) no 14° DAI nas espécies **a.** *S. pimpinellifolium* e **b.** *S. lycopersicum* 'VFNT'.

Em infecções por patógenos, sabe-se que há produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). O aumento das EROs pode estar associado ao aumento da taxa respiratória, podendo acarretar na diminuição da taxa fotossintética líquida (Shalitin & Wolf, 2000), gerando uma carga excessiva de elétrons que não são captados pelo complexo fotossintetizante, acarretando no acúmulo dessas substâncias. Uma das funções das EROs é de delimitar a propagação do patógeno para outras partes da planta. Já foi explicado no **Capítulo 2** que as EROs podem desempenhar dois papéis distintos dependendo da concentração. Caso estejam em altas concentrações, elas funcionam como substâncias tóxicas, atuando na morte celular programada, a qual pode restringir o patógeno ao local inicial da infecção. Entretanto, em concentrações menores, podem desempenhar papel na sinalização das respostas de defesa da planta (Dat et al., 2000).

Caso a produção de EROs seja excessiva, pode ocorrer danos à própria célula da hospedeira. Por essa razão, as plantas possuem formas de mitigar o excesso dessas substâncias, como o sistema antioxidante ascorbato-glutationa da planta visto no **Capítulo 2**. Nesse capítulo, foi visto que o aumento na concentração de ácido clorogênico, de campferol 3-O-rutinosídeo e de alguns isômeros de ácido cafeoil hexárico também pode estar envolvido no controle da concentração das EROs.

4.2. METABÓLITOS ANALISADOS POR CG-EM

Os cromatogramas das duas espécies foram muito similares quando comparados entre eles, com a ocorrência de 29 substâncias com área maior ou igual a 1% em pelo menos uma das réplicas, de algum dos tratamentos em determinado dia (**Figura 3.7**). As 29 substâncias encontram-se na **Tabela 3.2**. A numeração

começa em 36 devido à continuação da sequência realizada com as substâncias analisadas por CLAE-EM-EM.

No início da corrida, até aproximadamente 16 min, diversos picos não foram incluídos na tabela com a identificação das substâncias pois os padrões de fragmentação sugerem que são moléculas resultantes dos reagentes de derivatização.

Figura 3.7. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos metanólicos (fase polar) de folhas. **a.** *S. pimpinellifolium* e **b.** *S. lycopersicum* 'VFNT'.

A maioria das substâncias apresentou alto *match* com a NIST02. Dentre as 23 substâncias identificadas, não incluindo o padrão interno, 19 apresentaram *match* maior que 900, os quais são excelentes. Três substâncias apresentaram *match* maior que 800, os quais podem ser considerados como bons e apenas uma delas apresentou *match* maior que 700, que é considerado razoável (Hübschmann, 2015). Além disso, os metabólitos primários de tomate são bastante estudados e as substâncias foram procuradas na literatura para confirmar a possibilidade de ocorrência. Em artigo que analisou o perfil metabólico das folhas e de frutos de espécies selvagens de tomate (Schauer et al., 2005), foram encontradas 21 substâncias em comum com as desta tese. Só não foram encontrados o 2-cetogluconato e o glucarato. O glucarato ou ácido glucárico já foi detectado em tomate e essa substância foi discutida no tópico referente às análises por CLAE, pois ela é

uma porção da molécula de ácido cafeoil hexárico (glucárico). O 2-cetogluconato foi encontrado em casca de frutos de tomate (Mintz-Oron et al., 2008). As figuras com os espectros de massas das substâncias identificadas encontram-se no **Apêndice II – Figuras II.6 a II.10**. Também podem ser consultadas tabelas com a abundância relativa dos fragmentos (**Apêndice II – Tabela II.9**).

Tabela 3.2. Substâncias analisadas por CG-EM com seus respectivos tempos de retenção, nome da molécula proposta, *match* de acordo com a biblioteca da NIST02 e índice de retenção linear (IRL).

Nº do pico	TR (min)	Provável substância	Match – NIST02	IRL
36	16.624	Glicerol (TMS)	958	1274.5
37	17.294	Treonina (TMS)	967	1295.1
38	17.557	Glicina (TMS)	977	1304.6
39	17.808	Succinato (TMS)	968	1314.1
40	18.207	Glicerato (TMS)	969	1329.0
41	20.705	Aspartato (TMS)	987	1423.9
42	22.248	Malato (TMS)	982	1484.9
43	23.098	5-Oxoprolina (TMS)	987	1519.7
44	23.214	GABA (TMS)	866	1524.5
45	23.378	Glutamato	-	1531.4
46	27.609	ribitol (TMS) - (padrão interno)	980	1715.8
47	27.832	N.I. 1	-	1726.2
48	27.909	N.I. 2	-	1729.7
49	28.453	N.I. 3	-	1755.1
50	29.51	Chiquimato (TMS)	940	1804.5
51	29.65	Citrato (TMS)	896	1811.3
52	30.23	2-cetoglutarato (TMS)	764	1839.6
53	30.399	Quinato (TMS)	-	1847.9
54	30.674	Frutose, O-metiloxima (TMS)	980	1861.3
55	30.862	Frutose, O-metiloxima (TMS)	977	1870.5
56	31.168	Glicose, O-metoxima, (1E)- (TMS)	928	1885.4
57	31.537	Glicose, O-metoxima, (1Z)- (TMS)	941	1903.6
58	32.095	Tirosina (TMS)	906	1931.9
59	33.085	2-ceto-gulonato (TMS)	888	1982.8
60	33.372	Glucarato (TMS)	926	1997.5
61	34.214	Palmitato (TMS)	983	2041.9
62	34.859	Inositol (TMS)	955	2076.0
63	35.203	Galactose, O-metiloxima, (1E)- (TMS)	854	2094.2
64	43.785	Sacarose (TMS)	922	*

TR = tempo de retenção; IRL = índice de retenção linear; * = não pôde ser calculado, pois o padrão de alcano não estava disponível.

A substância 44 foi identificada como ácido butanoico, 4-[(bis(trimetilsilil)amino)-, trimetilsilil éster ou ácido γ -aminobutírico, tri-TMS (GABA-tri,TMS) e apresentou tempo de retenção de 23,21 min. Apesar do match apresentado pela NIST02 para essa substância não ter sido tão alto quanto o das outras, o espectro de massas disponível no banco de dados da NIST Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C39508231&Mask=2000#Gas-Chrom>) foi muito semelhante. A identificação também foi feita comparando com amostra autêntica de GABA derivatizado, cujo tempo de retenção (23,30 min) foi bastante próximo ao da substância.

A substância 45 foi identificada pela NIST02 como éster de ácido glutâmico-L-glicil, bis(trimetilsilil), porém com *match* baixo (756). Dessa forma, os fragmentos dessa substância, juntamente com o IRL foram inseridos no banco de dados *online* “Golm Metabolome Database”, o qual a identificou como glutamato TMS.

As substâncias 47, 48 e 49 não puderam ser identificadas, pois as identificações propostas pelas NIST02 não eram condizentes com a literatura. A substância 47 foi identificada como inosose, 2-desoxi-,O-metiloxime, tetrakis-O-(trimetilsilil)-, com *match* de 806. Entretanto, não há descrição da ocorrência dessa substância em *Solanum*. As outras duas substâncias foram identificadas como 4-cetoglicose, bis(O-metiloxime), tetrakis(trimetilsilil), as quais também não foram encontradas em *Solanum*. As comparações dos fragmentos obtidos para essas substâncias no banco de dados *online* “Golm Metabolome Database”, não retornaram identificações precisas, pois os fragmentos eram muito diferentes das substâncias propostas ou retornavam substâncias desconhecidas. Alguns fragmentos observados para essas substâncias ($m/z = 103, 133, 147$ e 217) (**Apêndice II – Figura II.7.e,f e g**) podem ser característicos tanto de açúcares quanto de hidroxíácidos, como indicado por Sobolevsky e colaboradores (2003). Esses autores também analisaram compostos derivatizados em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas, com analisador de massas do tipo quadrupolo e a ionização foi feita com feixe de elétrons a 70 eV, assim como foi feito para o presente trabalho. Dessa forma, serão necessárias outras técnicas para a correta identificação dessas três substâncias.

A substância 53 foi identificada como quinato através da comparação dos valores de m/z dos fragmentos obtidos no CG-EM com aqueles apresentados por

Sobolevsky e colaboradores (2003), além do valor de IRL. Neste caso, o uso do índice de retenção linear foi crucial, pois os valores de fragmentos também poderiam ser correspondentes aos do ácido clorogênico.

Larbat e colaboradores (2014) constataram a presença expressiva de ácido clorogênico em extratos hidroetanólicos de folhas. No presente trabalho, já foi discutida a presença de ácido clorogênico em grande quantidade. Assim, uma sugestão para a obtenção de quinato nas análises feitas por CG, pode ser devido à degradação do ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), mas a outra parte correspondendo ao ácido cafeico não foi detectada em CG-EM. Porém, a presença de ácido cafeico nas espécies de *Solanum* analisadas foi discutida anteriormente nas análises por CLAE.

As quantidades médias com os desvios padrão em µg de substância/g de massa fresca de *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* 'VFNT' nos três grupos (Controle, Tampão e Infectadas) durante os cinco períodos analisados para as substâncias que apareceram em, pelo menos, três amostras do total de 10 para que fosse possível realizar a análise estatística encontram-se no **Apêndice II – Tabelas II.16 a II.21**.

Muitas substâncias apareceram de maneira randômica, sendo que algumas delas apareceram em apenas uma das réplicas referentes a um tratamento e em um determinado dia. Além disso, em alguns casos foram observados valores muito altos de desvio padrão. Lisec e colaboradores (2006), em trabalho contendo o protocolo detalhado da análise de perfil metabólico em CG-EM, além da análise desses perfis em tomate e em *Arabidopsis*, sugeriram que seis seria um número mínimo de réplicas, porém, esse número deveria ser maior caso fossem feitas análises estatísticas. Neste trabalho, o número de réplicas adotado foi de 10, como explicado no **item 3.1**. e, ainda assim, foi observado grande desvio. Na tentativa de diminuir o desvio padrão das amostras, o número de réplicas poderia ser aumentado, porém, isso inviabilizaria o restante das análises. Apesar do desvio padrão ser alto, foi tomado o cuidado de todas as amostras possuírem homocedasticidade (**Apêndice II – Tabelas II.5 e II.7**).

A **Figura 3.8** apresenta os resultados significativos da comparação par a par de cada substância em um determinado dia. As comparações foram feitas apenas entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infectadas (TI). Os grupos Controle e Infectadas não foram comparados diretamente e não foram feitas comparações de

uma mesma substância em dias diferentes. Tanto a cor azul quanto a vermelha representam valores de p significativos. Os resultados apresentados em azul representam maior concentração no segundo grupo em relação ao primeiro. Caso a maior concentração seja referente ao primeiro grupo em relação ao segundo, os resultados são mostrados em vermelho. A cor branca indica resultados não significativos ou valores que não existem.

Assim como ocorreu com a análise por CLAE-EM-EM, as variações quantitativas das substâncias analisadas por CG-EM foram mais expressivas em *S. pimpinellifolium* comparado com *S. lycopersicum* 'VFNT' (Figura 3.8).

Figura 3.8. Gráficos do tipo *heatmap* evidenciando variações significativas nos diferentes dias após a inoculação (1, 7, 14, 21 e 28) nas substâncias analisadas por CG-EM entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infectadas (TI). **a.** *Heatmap* obtido para *S. pimpinellifolium*. **b.** *Heatmap* obtido para *S. lycopersicum* 'VFNT'. Os resultados negativos, ou seja, maior concentração no segundo grupo de cada par em relação ao primeiro, são apresentados em azul. Já os resultados positivos, ou seja, maior concentração no primeiro grupo de cada par em relação ao segundo, são mostrados em vermelho. Os dendrogramas foram obtidos através do método de completa ligação.

Houve aumento na concentração de glicina [38], malato [42], quinato [53], glicose [57] e inositol [62] no 1º DAI em folhas infectadas de *S. pimpinellifolium*. O aumento na concentração de glicose e de malato também foi observado em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) infectadas pelo TMV no 1º DAI (Choi et al., 2006). O aumento na concentração de ácidos orgânicos, como o malato [42] e o quinato [53] no 1º DAI pode ter sido causado como uma resposta primária da planta à presença

do vírus, aumentando a oferta de precursores de moléculas com baixo peso molecular envolvidas na defesa da planta (Abu-Nada et al., 2007).

Apesar do malato [42] ter sua concentração aumentada no 1º DAI nas plantas infectadas, pode-se perceber que nos 21º e 28º DAI, a concentração dessa substância diminui nessas plantas (**Figura 3.8.a**). Além do malato, o citrato também apresentou diminuição na concentração em períodos finais do experimento (21º e 28º DAI). Tal observação também foi constatada por (Srivastava et al., 2017) em plantas de *Papaver somniferum* L. infectadas pelo ageratum enation virus (AEV). O malato pode ser biossintetizado a partir da conversão do oxaloacetato pela enzima malato desidrogenase localizada no cloroplasto, organela cuja estrutura pode ser comprometida pelo vírus (Gonçalves et al., 2005), o que explicaria a redução na concentração de malato nas plantas infectadas em períodos em que a concentração viral estava elevada (21º e 28º DAI).

Nas folhas friccionadas com o tampão no 1º DAI, houve aumento na concentração de apenas duas substâncias, a treonina [37] e a 5-oxoprolina [43], que não foram afetadas pela presença do vírus.

Assim como observado para a análise por CLAE-EM-EM, pode-se observar que a variação quantitativa da maioria das substâncias em um determinado dia não foi coincidente com os demais períodos, com exceção dos períodos finais (21 e 28 DAI), ou seja, se uma substância que apresentou variação quantitativa no 1º DAI, essa variação não foi observada no 7º DAI, tanto para as plantas injuriadas mecanicamente quanto para as plantas infectadas (**Figura 3.9**). Os valores de *p* obtidos pelo teste de Wilcoxon na comparação dos grupos encontram-se no **Apêndice II – Tabelas II.6 e II.8**.

López-Greza e colaboradores (2012) analisaram a influência do ToMV no metabolismo do tomateiro nos 1º ao 5º DAI, nos 7º, 9º, 11º, 13º e 16º DAI pela manhã e à noite. Esses autores verificaram que houve diminuição na concentração de aminoácidos e de ácidos orgânicos, com exceção da asparagina/aspartato e glutamina/glutamato, os quais apresentaram aumento em sua concentração. Apesar de não haver clareza em relação a qual dia da coleta os autores se referem, esse resultado não corrobora o encontrado para *S. pimpinellifolium* infectado com o ToMMV, pois houve aumento na concentração de glutamato [45] apenas no 28º DAI,

Figura 3.9. Gráficos do tipo *heatmap* evidenciando variações significativas entre os grupos Controle-Tampão (CT) e Tampão-Infectadas (TI) nos diferentes dias após a inoculação (1, 7, 14, 21 e 28) nas substâncias analisadas por CG-EM. **a.** *Heatmap* obtido para *S. pimpinellifolium*. **b.** *Heatmap* obtido para *S. lycopersium* 'VFNT'. Os resultados negativos, ou seja, maior concentração no segundo grupo de cada par em relação ao primeiro, são apresentados em azul. Já os resultados positivos, ou seja, maior concentração no primeiro grupo de cada par em relação ao segundo, são mostrados em vermelho. Os dendrogramas foram obtidos através do método de completa ligação.

não sendo observado aumento na concentração dessa substância no 14^o DAI, período próximo ao analisado no trabalho de López-Greza e colaboradores. Como já mencionado diversas vezes, a interação observada entre *S. pimpinellifolium* e ToMMV é do tipo compatível, na qual as respostas de defesa são tardiamente ativadas e essa é uma explicação plausível para o aumento tardio na concentração de glutamato, que é precursor de compostos relacionados a respostas de estresse (Hothorn et al., 2006).

Na presente tese as coletas para as análises foram realizadas durante o período da tarde, que seria intermediário ao realizado no trabalho de López-Greza e colaboradores (2012). Por essa razão, as variações quantitativas das substâncias podem não ser similares.

O glutamato é precursor da glutathione, que está envolvida no sistema antioxidante da planta, como visto no **Capítulo 2**. Foi observado que o teor de glutathione oxidada (GSSG) foi maior nas plantas infectadas a partir do 7^o DAI e, no 21^o DAI, esse aumento foi extremamente significativo ($p \leq 0,0001$) (**Capítulo 2 - Figura 2.13.b**). Nesse mesmo período, o teor de glutamato foi significativamente

menor nas plantas infectadas (**Figura 3.8.a**), provavelmente por estar envolvido na biossíntese *de novo* da glutatona, pois a reciclagem dessa substância poderia não ser suficiente para estabilizar as espécies reativas de oxigênio.

Outro resultado encontrado no trabalho de López-Greza e colaboradores (2012) que não corroboram os obtidos para o patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV foi o aumento no teor de GABA [44], pois houve diminuição na concentração dessa substância no 7º DAI. Esses autores afirmam que são relatados resultados opostos em interações planta-patógeno diferentes.

Também foi observado aumento na concentração de glicose e de malato em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) infectadas pelo tobacco mosaic virus (TMV) (Choi et al., 2006) e isso também aconteceu no 1º DAI. Shalitin & Wolf (2000) observaram aumento na concentração de glicose e de frutose em folhas de melão (*Cucurbita melo* L.) infectadas pelo cucumber mosaic virus (CMV). Esses resultados corroboram os obtidos para o patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV.

O aumento na concentração de açúcares era esperado e isso pode ocorrer por três razões. De um lado, essas substâncias podem servir como fonte energética para a biossíntese de moléculas envolvidas na defesa da planta. Por outro, a alta demanda por açúcares solúveis serviria para manter a alta taxa respiratória observada em plantas infectadas (Herbers et al., 2000; Shalitin & Wolf, 2000; Choi et al., 2006). Além disso, postula-se que os açúcares possam servir como sinalizadores para ativar respostas de defesa da planta, potencializando-as (Herbers et al., 2000; Moghaddam & Ende, 2012).

O acúmulo de açúcares solúveis pode ser explicado por um modelo proposto por Herbers e colaboradores (2000). A presença viral causa acúmulo de sacarose devido a perturbações físicas na via de transporte, como a modificação dos plasmodesmos por causa das interações com as proteínas de movimento do vírus. As invertases da parede celular quebram a sacarose, de modo irreversível, em glicose e frutose, as quais vão para as células do mesófilo. O aumento na concentração dessas hexoses ativa a expressão de invertases da parede celular, as quais levam a uma retenção mais eficiente dos carboidratos, o que acarreta em um *feedback* negativo na fotossíntese e no fortalecimento das respostas de defesa da planta.

Caso o modelo citado no parágrafo anterior seja um dos mecanismos utilizados pela planta para aumentar a resistência, isso poderia explicar a susceptibilidade de *S.*

pimpinellifolium ao ToMMV, uma vez que primeiramente houve aumento na concentração de glicose e inositol nas plantas infectadas no 1º DAI como esperado, mas isso ocorreu antes do aumento na concentração de sacarose, a qual não levou ao acúmulo das hexoses como propõe o modelo. Ao contrário da resposta esperada para fortalecer as respostas de defesa, houve redução na concentração de glicose e frutose no 14º DAI. Diante desses resultados, pode-se sugerir que a sinalização e o fortalecimento das respostas de defesa da planta por meio do aumento na concentração de açúcares não foram uma via ativa no metabolismo dessa planta.

No 14º DAI, houve diminuição significativa no teor de glicose [56]. Foi visto no **Capítulo 2** que houve ativação do sistema antioxidante representado pelo ácido ascórbico, glutatona e ácido clorogênico [13] e a biossíntese dessas substâncias ocorre a partir de moléculas do metabolismo primário, o qual foi afetado pela presença viral. Também houve aumento na concentração de ácido salicílico conjugado (**ver Capítulo 2**) e a maior parte dessas moléculas está ligada à glicose. Dessa maneira, a diminuição na concentração de glicose (**Figura 3.8**) pode estar relacionada à glicosilação do ácido salicílico que seria tóxico para a planta na sua forma livre (Dean et al., 2005). Também houve diminuição na concentração de glicerato [40], quinato [53], frutose [54 e 55] e glicose [56 e 57] nas plantas mecanicamente injuriadas no 21º dia do experimento. Nesse mesmo dia, houve aumento na concentração de sacarose. No 28º dia do experimento também foi observada diminuição no teor dessas mesmas substâncias, com exceção do quinato e do glicerato. Como já mencionado anteriormente, as respostas esperadas em decorrência da injúria mecânica aconteceriam em períodos iniciais do experimento. Essa mudança tardia no metabolismo primário nas plantas mecanicamente estressadas deve ser melhor investigada em experimentos futuros.

Nos 21º e 28º DAI, houve diminuição significativa na concentração de quinato [53] nas plantas de *S. pimpinellifolium* infectadas pelo vírus. Se correlacionarmos essa resposta com as observadas para a análise por CLAE-EM-EM, esse resultado é bastante coerente, pois o ácido clorogênico [13] que teve sua concentração aumentada do 14º ao 28º DAI, é biossintetizado a partir da esterificação do ácido cafeico com uma molécula de quinato. O ácido cafeico [15] também apresentou diminuição no teor no 14º e 28º DAI (**Figura 3.3.a**). Assim, pode-se sugerir que a

diminuição na concentração de quinato e de ácido cafeico ocorreram pois teriam sido utilizados na biossíntese do ácido clorogênico [13].

Com exceção do glutamato [45] no 28º DAI, todas as substâncias que apresentaram variação quantitativa nos 21º e 28º DAI, apresentaram diminuição na concentração, pois os tecidos infectados demandam maior quantidade de nutrientes por causa da ativação de uma vasta gama de respostas de defesa (Herbers et al., 2000).

Para *S. lycopersicum* 'VFNT', a inoculação viral parece não ter afetado o metabolismo primário de maneira contundente. No 1º DAI, o estresse mecânico causou maior influência no metabolismo do que a presença viral em termos de variações quantitativas das substâncias. Nas plantas friccionadas mecanicamente, houve diminuição na concentração de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, enquanto que nas plantas infectadas, houve aumento de um aminoácido e do quinato (**Figura 3.8.b**). O aumento do quinato poderia estar relacionado com maior síntese do ácido clorogênico. Entretanto, essa substância não apresentou variação quantitativa como observado na análise por CLAE-EM-EM (**Figura 3.3.b.** - substância 13). As demais substâncias que mostraram variações em seus teores nas plantas infectadas parecem não estar diretamente relacionadas entre si de modo a formar um padrão que poderia ser explicado por um modelo. Isso provavelmente ocorreu pois não foi possível a disseminação do vírus por toda a planta, fato comprovado pela baixa concentração viral analisada pelo teste sorológico PTA-ELISA (**Capítulo 2 – Figura 2.14**). Uma vez que o vírus não conseguiu se disseminar pela planta, o seu metabolismo não foi influenciado.

5. CONCLUSÕES

Não se sabe ao certo como os vírus alteram o metabolismo da planta. Possivelmente, esses patógenos exercem efeitos diretos e/ou indiretos na expressão gênica da hospedeira (Herbers et al., 2000).

As duas espécies analisadas apresentaram quadros distintos quanto às mudanças em seu metabolismo. Na espécie *S. pimpinellifolium*, suscetível ao vírus, o metabolismo dos compostos fenólicos foi ativado, provavelmente na tentativa de inativar o patógeno devido à toxicidade dessas substâncias. Entretanto, essa ativação foi demasiado tarde, uma vez que houve o desenvolvimento da doença com sintomas

bastante evidentes, característica de uma interação planta-patógeno do tipo compatível, na qual as defesas são tardiamente ativadas. Em relação a *S. lycopersicum* 'VFNT', a presença do vírus parece não ter influenciado diretamente em seu metabolismo de compostos fenólicos. Em relação ao metabolismo primário e secundário, poucas substâncias tiveram variações quantitativas. Essa resposta provavelmente tenha ocorrido pois o gene de resistência *Tm-2²* que confere resistência ao ToMV, vírus filogeneticamente muito próximo ao ToMMV, também pode estar envolvido na resistência desse último. Com a interação gene a gene, o vírus não pôde se disseminar pela planta, não acarretando em mudanças metabólicas. No **Capítulo 2** foi discutida a resposta denominada de resistência extrema. Os resultados obtidos para o perfil metabólico de *S. lycopersicum* 'VFNT' inoculado com o ToMMV reforçam a ideia da rapidez com que as respostas são ativadas nesse tipo de defesa, pois o metabolismo dessa planta foi pouco influenciado pela inoculação viral.

O estudo do perfil metabólico em plantas infectadas é uma ferramenta muito útil para os melhoristas vegetais para obtenção de linhagens resistentes (Abu-Nada et al., 2007). Dessa forma, espera-se que esse trabalho possa ser útil como base para futuras pesquisas que visem a obtenção de plantas resistentes ao ToMMV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Nada, Y., Kushalappa, A. C., Marshall, W. D., Al-Mughrabi, K., & Murphy, A. (2007). 'Temporal dynamics of pathogenesis-related metabolites and their plausible pathways of induction in potato leaves following inoculation with *Phytophthora infestans*'. *European Journal of Plant Pathology*, 118(4), 375–391. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9150-8>
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). 'Phytoalexins in defense against pathogens'. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>
- Bazylko, A., Boruc, K., Borzym, J., & Kiss, A. K. (2015). 'Aqueous and ethanolic extracts of *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga ciliata*. Investigations of caffeic acid derivatives and flavonoids by HPTLC and HPLC-DAD-MS methods'. *Phytochemistry Letters*, 11, 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.11.005>

- Bazzini, A. A., Manacorda, C. A., Tohge, T., Conti, G., Rodriguez, M. C., Nunes-Nesi, A. & Asurmendi, S. (2011). 'Metabolic and miRNA profiling of TMV infected plants reveals biphasic temporal changes'. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028466>
- Bolton, M. D. (2009). 'Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire'. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 22(5), 487–97. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0487>
- Bruni, R., Bellardi, M. G., Parrella, G., & Bianchi, A. (2006). 'Impact of *Alfalfa mosaic virus* subgroup I and II isolates on terpene secondary metabolism of *Lavandula vera* D.C., *Lavandulaxalardii* and eight cultivars of *L. hybrid*'. *Rev. Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(4–6), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.10.004>
- Bruni, R., Bianchi, A., & Bellardi, M. G. (2007). 'Essential oil composition of *Agastache anethiodora* Britton (Lamiaceae) infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV)'. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 66–70. <https://doi.org/10.1002/ffj.1760>
- Choi, Y. H., Kim, H. K., Linthorst, H. J. M., Hollander, J. G., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., ... Verpoorte, R. (2006). 'NMR Metabolomics to Revisit the *Tobacco Mosaic virus* Infection in *Nicotiana tabacum* Leaves'. *Journal of Natural Products*, 69, 742–748.
- Costet, L., Fritig, B., & Kauffmann, S. (2002). 'Scopoletin expression in elicitor-treated and *Tobacco mosaic virus*-infected tobacco plants'. *Physiologia Plantarum*, 115, 228–235. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150208.x>
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). 'Dual action of the active oxygen species during plant stress responses'. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57(5), 779–795. <https://doi.org/10.1007/s000180050041>
- Dean, J. V., Mohammed, L. A., & Fitzpatrick, T. (2005). 'The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures'. *Planta*, 221(2), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1430-3>
- Dewick, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd, 2009. 546 p.

- Dixon, R. A. (2001). 'Natural products and plant disease resistance'. *Nature*, 411, 843–847.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., & Wang, L. (2002). 'The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective'. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 371–390. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x>
- Duarte, L. M. L., Salatino, M. L. F., Salatino, A., Negri, G., & Barradas, M. M. (2008). 'Effect of *Potato virus X* on total phenol and alkaloid contents in *Datura stramonium* leaves'. *Summa Phytopathologica*, 34(1), 65–67.
- Dudek, M. K., Dudkowski, Ł., Bazyłko, A., Ka, S., & Kiss, A. K. (2016). 'Caffeic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Galinsoga parviflora* and their effect on inhibiting oxidative burst in human neutrophils'. *Phytochemistry Letters*, 16, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.05.007>
- Elliger, C. A., Lundin, R. E., & Haddon, W. F. (1981). 'Caffeoyl esters of glucaric acid in *Lycopersicon esculentum* leaves'. *Phytochemistry*, 20(5), 1133–1134. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)83044-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)83044-0)
- Fayos, J., Bellés, J. M., López-Gresa, M. P., Primo, J., & Conejero, V. (2006). 'Induction of gentisic acid 5-O-beta-D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens'. *Phytochemistry*, 67(2), 142–8. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.10.014>
- Forkmann, G., & Martens, S. (2001). 'Metabolic engineering and applications of flavonoids'. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 155–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287230>
- Gonçalves, M. C., Vega, J., Oliveira, J. G., & Gomes, M. M. A. (2005). '*Sugarcane yellow leaf virus* infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves'. *Fitopatologia Brasileira*, 30(1), 10–16. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000100002>
- Guillet, G., & De Luca, V. (2005). 'Wound-inducible biosynthesis of phytoalexin hydroxycinnamic acid amides of tyramine in tryptophan and tyrosine decarboxylase transgenic tobacco lines'. *Plant Physiology*, 137(2), 692–699. <https://doi.org/10.1104/pp.104.050294>

- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H. P., Hajirezaei, M., & Sonnewald, U. (2000). 'Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of *Potato virus Y* with tobacco'. *Molecular Plant Pathology*, 1(1), 51–59.
- Hothorn, M., Wachter, A., Gromes, R., Stuwe, T., Rausch, T., & Scheffzek, K. (2006). 'Structural Basis for the Redox Control of Plant Glutamate'. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 27557–27565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602770200>
- Hübschmann, H. J. Handbook of GC-MS – Fundamentals and applications. 3rd ed. Wiley-VCH. 2015. 880 p.
- Hummel, J., Strehmel, N., Selbig, J., Walther, D., & Kopka, J. (2010). 'Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles'. *Metabolomics*, 6, 322–333. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0198-7>
- Jeandet, P., Clément, C., Courot, E., & Cordelier, S. (2013). 'Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance'. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14136–14170. <https://doi.org/10.3390/ijms140714136>
- Key, M. (2012). 'A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat maps'. *BMC Bioinformatics*, 13. <https://doi.org/http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/S16/S10>
- Kröner, A., Marnet, N., Andrivon, D., & Val, F. (2012). 'Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens'. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 57, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.006>
- Larbat, R., Paris, C., Le Bot, J., & Adamowicz, S. (2014). 'Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation'. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 224, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.010>
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). 'Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants'. *Nature Protocols*, 1(1), 387–96. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>

- Llave, C. (2016). 'Dynamic cross-talk between host primary metabolism and viruses during infections in plants'. *Current Opinion in Virology*, 19, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.06.013>
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Kyong, H., Hae, Y., Verpoorte, R., Rodrigo, I., ... María, J. (2012). 'Metabolic fingerprinting of *Tomato mosaic virus* infected *Solanum lycopersicum*'. *Journal of Plant Physiology*, 169(16), 1586–1596. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.021>
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Yenush, L., Conejero, V., Rodrigo, I., & Bellés, J. M. (2016). 'Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to *Citrus exocortis* viroid and *Tomato spotted wilt virus*'. *PLoS ONE*, 11(11), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166938>
- López-Gresa, M. P., Maltese, F., Bellés, J. M., Conejero, V., Kim, H. K., Choi, H. Y., & Verpoorte, R. (2010). 'Metabolic Response of Tomato Leaves Upon Different Plant – Pathogen Interactions'. *Phytochemical Analysis*, 21, 89–94. <https://doi.org/10.1002/pca.1179>
- Lyons, P. C., Woody, K. V, & Nicholson, R. L. (1990). 'Caffeoyl ester accumulation in corn leaves inoculated with fungal pathogens'. *Phytochemistry*, 29(1), 97–101.
- Petkovšek, M. M., Štampar, F., & Veberič, R. (2009). 'Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*'. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.09.003>
- Mintz-Oron, S., Mandel, T., Rogachev, I., Feldberg, L., Lotan, O., Yativ, M., ... Aharoni, A. (2008). 'Gene wxpression and metabolism in tomato fruit surface tissues'. *Plant Physiology*, 147(2), 823–851. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116004>
- Moghaddam, M. R. B., & Ende, W. Van Den. (2012). 'Sugars and plant innate immunity'. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 3989–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers129>
- Nagai, A., Duarte, L. M. L., & Santos, D. Y. A. C. (2011). 'Influence of Viral Infection on Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae)'. *Natural Product Communications*, 6(8), 1189–1192.
- Niggeweg, R., Michael, A. J., & Martin, C. (2004). 'Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid'. *Nature Biotechnology*, 22(6), 746–54. <https://doi.org/10.1038/nbt966>

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). 'Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids'. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Schauer, N., Zamir, D., & Fernie, A. R. (2005). 'Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex'. *Journal of Experimental Botany*, 56(410), 297–307. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri057>
- Shalitin, D., & Wolf, S. (2000). 'Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants'. *Plant Physiology*, 123(2), 597–604. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.597>
- Shulaev, V. (2006). 'Metabolomics technology and bioinformatics'. *Briefings in Bioinformatics*, 7(2), 128–139. <https://doi.org/10.1093/bib/bbl012>
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., & Mittler, R. (2008). 'Metabolomics for plant stress response'. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 199–208. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x>
- Shuman, J. L., Cortes, D. F., Armenta, J. M., Pokrzywa, R. M., Mendes, P., Shulaev, V. 'Plant metabolomics by GC-MS and differential analysis'. In: Pereira, A. Plant Reverse Genetics. Blacksburg, 2011. p.229-246.
- Srivastava, A., Agrawal, L., Raj, R., Jaidi, M., & Raj, S. K. (2017). 'Ageratum enation virus Infection Induces Programmed Cell Death and Alters Metabolite Biosynthesis in *Papaver somniferum*'. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01172>
- Sobolevsky, T. G., Chernetsova, E. S., Revelsky, A. I., Revelsky, I. A., Starostin, A. B., Miller, B., & Oriedo, V. (2003). 'Electron ionization mass spectra and their reproducibility for trialkylsilylated derivatives of organic acids , sugars and alcohols'. *European Journal of Mass Spectrometry*, 9, 487–495. <https://doi.org/10.1255/ejms.580>
- Strack, D., & Gross, W. (1990). 'Properties and Activity Changes of Chlorogenic Acid:Glucaric Acid Caffeoyltransferase From Tomato (*Lycopersicon esculentum*)'. *Plant Physiology*, 92(1), 41–7. <https://doi.org/10.1104/pp.92.1.41>
- Strack, D., Gross, W., Wray, V., & Grotjahn, L. (1987). 'Enzymic synthesis of caffeoylglucaric acid from chlorogenic acid and glucaric acid by a protein preparation from tomato cotyledons'. *Plant Physiology*, 83(3), 475–8. <https://doi.org/10.1104/pp.83.3.475>

- Theis, N., & Lerdau, M. (2011). 'The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites'. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3), S93–S102. <https://doi.org/http://www.jstor.org/stable/10.1086/374190>
- Vessecchi, R., Lopes, N. P., Gozzo, F. C., Dörr, F. A., Murgu, M., Lebre, D. T., ... Riveros, J. M. (2011). 'Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa'. *Química Nova*, 34(10), 1875–1887. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600030>
- Vidhyasekaran, P., Borromeo, E. S., & Mew, T. W. (1992). '*Helminthosporium oryzae* toxin suppresses phenol metabolism in rice plants and aids pathogen colonization'. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 41(5), 307–315. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(92\)90018-Q](https://doi.org/10.1016/0885-5765(92)90018-Q)
- Viegas, M. C., & Bassoli, D. G. (2007). 'Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax'. *Química Nova*, 30(8), 2031–2034.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). 'Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites'. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>

Considerações finais

Analisar cada resposta de defesa da planta separadamente é uma tarefa muito difícil, pois cada alteração em determinada molécula está intrincada com mudanças em outras moléculas. É uma rede muito complexa e por essa razão muitos estudos são necessários para que se possa encontrar padrões de respostas, os quais podem ser úteis no melhoramento genético a fim de obtenção de plantas resistentes às doenças.

Nesta última parte, os dados coletados serão reunidos de modo a tentar explicar como as respostas estão interligadas temporal e espacialmente.

O estresse mecânico causado pela fricção do pistilo nas folhas das plantas não resultou em mudanças tão drásticas quanto o observado para as diferenças encontradas em decorrência da presença viral. Por essa razão, os comentários serão mais direcionados para as respostas observadas nas plantas infectadas pelo vírus.

As respostas de defesa das plantas contra os vírus podem ocorrer como resultado de uma interação gene a gene, na qual o produto do gene de resistência da planta se liga, direta ou indiretamente, ao produto do gene de avirulência do patógeno, ativando uma grande variedade de mecanismos de defesa (interação incompatível). Caso essa interação não ocorra, seja devido à ausência do gene de resistência ou de avirulência, as respostas de defesa podem não ocorrer ou ocorrer de forma tão tardia que possibilita a colonização do tecido da hospedeira pelo patógeno, caracterizando a interação compatível. As respostas tardias observadas nas plantas que não possuem gene de resistência são, de modo geral, as mesmas das plantas com o gene, com o diferencial temporal mencionado acima (Klessig et al., 2000; López-Gresa et al., 2016).

Nesta tese foi possível observar os dois tipos de interação. No patossistema *S. pimpinellifolium*-ToMMV, foi observada a interação do tipo compatível, uma vez que o vírus se propagou por toda a planta, ocasionando a doença. Por outro lado, no patossistema *S. lycopersicum* 'VFNT'-ToMMV, a interação foi do tipo incompatível.

Apesar de já ter sido relatado espécies de tomate selvagem como fontes de genes de resistência contra vírus de plantas, como o gene *Tm-1* isolado de *Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M Spooner e os genes *Tm-2* e *Tm-2²* isolados de *S.*

peruvianum L. que conferem resistência ao tomato mosaic virus (ToMV) (Lanfermeijer et al., 2005; Ishibashi et al., 2007), *S. pimpinellifolium* foi suscetível ao ToMMV.

A suscetibilidade ao vírus, provavelmente, foi em decorrência da ausência de gene de resistência. Embora essa planta não possua esse gene de resistência e uma resposta de defesa específica e eficaz como a ETI (**ver Introdução Geral**) não tenha sido ativada, houve ativação das respostas de defesa basais da planta, pois algumas moléculas advindas do vírus podem funcionar como PAMPs, como é o caso de moléculas de fita dupla de RNA produzidas durante a replicação viral. Essas moléculas são reconhecidas pela maquinaria do silenciamento gênico, sendo disparada uma resposta antiviral do tipo PTI (Conti et al., 2017). Como explicado na **Introdução Geral**, a amplitude de defesa da PTI não é tão alta quanto a da ETI e no caso de *S. pimpinellifolium*, ela foi incapaz de impedir o estabelecimento da doença.

A **Figura 1** reúne as informações obtidas de todas as análises realizadas com a espécie *S. pimpinellifolium* a partir da análise de componentes principais (do inglês, *principal component analysis* – PCA). Foram computadas 13 variáveis: óxido nítrico, poliaminas, ácido salicílico livre e conjugado, ácido ascórbico reduzido, oxidado e total, glutatona oxidada, concentração viral por ELISA, carboidratos (somadas as concentrações dos açúcares frutose, glicose, galactose, sacarose e inositol), aminoácidos (somadas as concentrações de treonina, glicina, glutamato, GABA e oxo-prolina), ácidos orgânicos (soma dos teores de glicerato, quinato, glicerol, malato, aspartato e citrato) e fenólicos (somada a concentração de todos os compostos fenólicos obtidos por CLAE). Para obter as variáveis carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos, o *heatmap* (**Capítulo 3**) foi observado e foram selecionadas as substâncias que apresentaram alguma variação durante o experimento. As variáveis estão plotadas na **Figura 1.a** e os tratamentos com os respectivos dias estão plotados na **Figura 1.b**.

As amostras foram obtidas através da média das replicatas para um grupo (Controle, Tampão e Infectadas) em um determinado dia, totalizando 15 amostras. As duas componentes principais contabilizaram 62,2% da variabilidade nos dados. Pode-se perceber que todos os autovetores possuem valores positivos no eixo da componente principal 1 (CP1), o que provavelmente significa que todas as variáveis são correlacionadas positivamente uma em relação a outra e a CP1 é o fator comum dessa correlação.

De um modo geral, pode-se perceber que a CP1 separou os tratamentos em dois grandes grupos. No lado positivo dessa componente, encontram-se o tratamento das plantas infectadas dos 7º, 14º, 21º e 28º DAI. Também se encontra o tratamento controle referente ao 14º DAI, embora tenha apresentado score menor. Dessa maneira, pode-se afirmar que a infecção pelo ToMMV teve uma grande influência no metabolismo de *S. pimpinellifolium*. Interessante observar que o 1º DAI do tratamento das plantas infectadas ficou separado do restante do grupo, enfatizando que as respostas de defesa dessa planta são tardiamente ativadas.

Figura 1. Análise de componentes principais (PCA) com todas as análises feitas para a espécie *S. pimpinellifolium* com todos os tratamentos (Controle – C; Tampão – T; Infectadas – I) em todos os dias do experimento. AA = aminoácidos; AAO = ácido ascórbico oxidado; AAR = ácido ascórbico reduzido; AAT = ácido ascórbico total; AO = ácidos orgânicos; CHO = açúcares; ELISA = concentração viral; FEN = fenólicos; GSSG = glutatona oxidada; NO = óxido nítrico; PA = poliaminas; SA = ácido salicílico livre; SAG = ácido salicílico conjugado. **a.** Gráfico da PCA com as variáveis mencionadas acima. **b.** Gráfico da PCA com os tratamentos em todos os dias analisados. Controle – figura cheia; Tampão – figura vazia; Infectadas – figura com símbolo; DAI 1 – vermelho; DAI 7 – azul; DAI 14 – verde; DAI 21 – roxo; DAI 28 – ouro.

Na **Tabela 1** encontram-se os valores de variância para as componentes da PCA da **Figura 1**.

Para reforçar a ideia de que a infecção pelo ToMMV foi a responsável pelo padrão observado na PCA da **Figura 1**, foi realizada outra PCA apenas com os dados referentes ao grupo Controle e Tampão para observação do padrão de resposta. Na **Figura 2.b**, pode-se perceber que a PCA sem os dados referentes à infecção pelo ToMMV apresentou um padrão distinto, com a formação de grupos de acordo com o

Tabela 1. Valores de variância explicada e acumulada para os componentes que explicam a maior parte das variações para a PCA construída para espécie *S. pimpinellifolium* com todos os tratamentos.

PC	Variância explicada	Variância acumulada
1	0,484	0,484
2	0,138	0,622
3	0,108	0,730
4	0,085	0,815
5	0,068	0,883
6	0,052	0,935
7	0,044	0,978
8	0,011	0,990
9	0,006	0,996
10	0,003	0,999
11	0,001	1,000

tempo do experimento, independente do tratamento. Foram formados quatro grupos com os dados dos 1º (elipse vermelha), 7º (azul), 14º (verde) e 28º (ouro) dias do experimento. Só não foram agrupados os dados do 21º dia do experimento. A formação desses grupos também reforça a ideia de que a fricção mecânica não causou tanta influência no metabolismo da planta. No 21º DAI, foram observadas diferenças nos teores de putrescina, ácido ascórbico reduzido e total, glutathiona e de metabólitos primários quando comparados os grupos Controle e Tampão. Enquanto houve aumento significativo na concentração de putrescina, houve diminuição muito e extremamente significativa no teor de ácido ascórbico reduzido e total e de glutathiona oxidada. Provavelmente, por conta dessas diferenças, não houve a formação do grupo com os dados provenientes do 21º DAI.

Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) com todas as análises feitas para a espécie *S. pimpinellifolium* com os tratamentos (Controle – C; Tampão – T) em todos os dias do experimento. AA = aminoácidos; AAO = ácido ascórbico oxidado; AAR = ácido ascórbico reduzido; AAT = ácido ascórbico total; AO = ácidos orgânicos; CHO = açúcares; ELISA = concentração viral; FEN = fenólicos; GSSG = glutathiona oxidada; NO = óxido nítrico; PA = poliaminas; SA = ácido salicílico livre; SAG = ácido salicílico conjugado. Elipses em diferentes cores representam os diferentes dias após a inoculação (DAI). Vermelho: 1 DAI; Azul: 7 DAI; Verde: 14 DAI; Ouro: 28 DAI. **a.** Gráfico da PCA com as variáveis mencionadas acima. **b.** Gráfico da PCA com os tratamentos em todos os dias analisados. Controle – figura cheia; Tampão – figura vazia; Infectadas – figura com símbolo; DAI 1 – vermelho; DAI 7 – azul; DAI 14 – verde; DAI 21 – roxo; DAI 28 – ouro.

Na **Tabela 2** encontram-se os valores de variância para as componentes da PCA da **Figura 2**.

Tabela 2. Valores de variância explicada e acumulada para os componentes que explicam a maior parte das variações para a PCA construída para espécie *S. pimpinellifolium* apenas com os tratamentos Controle e Tampão.

PC	Variância explicada	Variância acumulada
1	0,329	0,329
2	0,233	0,563
3	0,182	0,745
4	0,095	0,840
5	0,072	0,912
6	0,055	0,967
7	0,027	0,993
8	0,005	0,998
9	0,002	1,000

Para resumir as alterações observadas em *S. pimpinellifolium* infectado pelo ToMMV ao longo do experimento, foi feito um esquema de uma célula infectada com

algumas respostas de defesa. No 1º DAI, foi observado aumento na concentração de NO, o qual ocorreu provavelmente, em resposta à infecção e pelo catabolismo das poliaminas, que geram como produto o H₂O₂ que seria um intermediário na produção do NO (Tun et al., 2006) (**Figura 3**).

Figura 3. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 1º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de NO e em azul, para a diminuição na concentração de poliaminas. Adaptado de Somssich & Hahlbrock, 1998; Kawakami et al., 2004; Fröhlich & Durner, 2011; Yamasaki & Cohen, 2006; Wimalasekera et al, 2011; Bielen et al., 2013. AsA = ácido ascórbico; Citb = citocromo b; CP = capa proteica; DHA = dehidroascorbato; EROs = espécies reativas de oxigênio; Fd = ferredoxina; GalLDH = L-galactone-1,4-lactone desidrogenase; GR = glutationa redutase; GSH = glutationa reduzida; GSSG = glutationa oxidada; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; MDHA = monodehidroascorbato; MDHAR = monodehidroascorbato redutase; NADPH:NR = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato:nitrato redutase; MP = membrana plasmática; MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *mitogen activated protein kinase*); NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADP⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; NO = óxido nítrico; NR = nitrato redutase; PA = poliaminas; PM = proteína de movimento; RdRp = RNA dependente RNA polimerase; SAG = ácido salicílico 2-O-β-D-glicose; SAR = resistência sistêmica adquirida (do inglês, *systemic acquired resistance*); vRNA = RNA viral. O retângulo verde representa o ciclo ascorbato-glutationa.

No 7º DAI, a concentração de NO ainda estava elevada e houve também o aumento na concentração de ácido salicílico. O teor de poliaminas foi menor nas plantas infectadas, provavelmente pelo catabolismo dessas substâncias ser o responsável pela manutenção da concentração de NO elevada. Pode-se perceber também que houve ativação do sistema antioxidante não enzimático representado pelo ácido ascórbico e glutaciona (**Figura 4**).

Figura 4. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 7º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de NO, SA, AsA e GSSG e em azul, para a diminuição na concentração de poliaminas. Adaptado de Somssich & Hahlbrock, 1998; Kawakami et al., 2004; Fröhlich & Durner, 2011; Yamasaki & Cohen, 2006; Wimalasekera et al., 2011; Bielen et al., 2013. AsA = ácido ascórbico; Cyt b = citocromo b; CP = capa proteica; DHA = dehidroascorbato; EROs = espécies reativas de oxigênio; Fd = ferredoxina; GalLDH = L-galactone-1,4-lactone desidrogenase; GR = glutaciona redutase; GSH = glutaciona reduzida; GSSG = glutaciona oxidada; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; MDHA = monodehidroascorbato; MDHAR = monodehidroascorbato redutase; NADPH:NR = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato:nitrato redutase; MP = membrana plasmática; MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *mitogen activated protein kinase*); NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; $NADP^+$ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; NO = óxido nítrico; NR = nitrato redutase; PA = poliaminas; PM = proteína de movimento; RdRp = RNA dependente RNA polimerase; SAG = ácido salicílico 2-O- β -D-glicose; SAR = resistência sistêmica adquirida (do inglês, *systemic acquired resistance*); vRNA = RNA viral. O retângulo verde representa o ciclo ascorbato-glutationa.

No 14º e no 21º DAI, não houve mais alterações na concentração de NO e ácido salicílico livre, demonstrando que o papel dessas moléculas foi desempenhado no período inicial da infecção, o que é comum em sinalizadores. Nesse dia também não houve alteração no teor de poliaminas. Entretanto, como pode ser observado na **Figura 5**, a atividade antioxidante ainda permanecia ativa. Como houve aumento muito grande na concentração de ácido salicílico livre, o qual é tóxico para a planta, houve a glicosilação dessa substância para armazenamento no vacúolo, o que causou aumento na concentração de ácido salicílico conjugado. Talvez por causa da glicosilação do ácido salicílico, houve diminuição na concentração de glicose livre. Como visto no **Capítulo 3**, houve aumento significativo na concentração de ácido clorogênico nas plantas infectadas a partir do 14º DAI. Também houve aumento na

concentração de um flavonoide, o campferol 3-O-rutinosídeo. Como essas moléculas são metabólitos secundários, elas estão representadas de maneira geral no esquema.

Figura 5. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 14º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de AsA, GSSG, SAG e metabólitos secundários. Destaque em azul para a diminuição na concentração de glicose. Adaptado de Somssich & Hahlbrock, 1998; Kawakami et al., 2004; Fröhlich & Durner, 2011; Yamasaki & Cohen, 2006; Wimalasekera et al., 2011; Bielen et al., 2013. AsA = ácido ascórbico; Citb = citocromo b; CP = capa proteica; DHA = dehidroascorbato; EROs = espécies reativas de oxigênio; Fd = ferredoxina; GalLDH = L-galactone-1,4-lactone desidrogenase; GR = glutathione redutase; GSH = glutathione reduzida; GSSG = glutathione oxidada; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; MDHA = monodehidroascorbato; MDHAR = monodehidroascorbato redutase; NADPH:NR = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato:nitrato redutase; MP = membrana plasmática; MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *mitogen activated protein kinase*); NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADP⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; NO = óxido nítrico; NR = nitrato redutase; PA = poliaminas; PM = proteína de movimento; RdRp = RNA dependente RNA polimerase; SAG = ácido salicílico 2-O-β-D-glicose; SAR = resistência sistêmica adquirida (do inglês, *systemic acquired resistance*); vRNA = RNA viral. O retângulo verde representa o ciclo ascorbato-glutationa.

Uma das diferenças entre o 14º e o 21º DAI é que nesse último não houve a diminuição na concentração de glicose (**Figura 6**). No 21º DAI foi observado aumento na concentração de ácido clorogênico, apesar de ter sido menos intenso do que no 14º DAI.

Figura 6. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 21º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de AsA, GSSG, SAG e metabólitos secundários. Adaptado de Somssich & Hahlbrock, 1998; Kawakami et al., 2004; Fröhlich & Durner, 2011; Yamasaki & Cohen, 2006; Wimalasekera et al., 2011; Bielen et al., 2013. AsA = ácido ascórbico; Citb = citocromo b; CP = capa proteica; DHA = dehidroascorbato; EROs = espécies reativas de oxigênio; Fd = ferredoxina; GalLDH = L-galactone-1,4-lactone desidrogenase; GR = glutaciona redutase; GSH = glutaciona reduzida; GSSG = glutaciona oxidada; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; MDHA = monodehidroascorbato; MDHAR = monodehidroascorbato redutase; NADPH:NR = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato:nitrato redutase; MP = membrana plasmática; MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *mitogen activated protein kinase*); NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADP⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; NO = óxido nítrico; NR = nitrato redutase; PA = poliaminas; PM = proteína de movimento; RdRp = RNA dependente RNA polimerase; SAG = ácido salicílico 2-O-β-D-glicose; SAR = resistência sistêmica adquirida (do inglês, *systemic acquired resistance*); vRNA = RNA viral. O retângulo verde representa o ciclo ascorbato-glutationa.

Finalmente, no 28º DAI, o estresse oxidativo causado, provavelmente, pela presença do patógeno, foi de tamanha magnitude que os antioxidantes não enzimáticos ainda estavam ativos quase 1 mês após a entrada do vírus na planta. A concentração de ácido salicílico conjugado também continuou alta nas plantas infectadas. Houve aumento no teor de poliaminas, pois o papel exercido por essas substâncias é tardio e devido a outros fatores explicados com maior detalhe no **Capítulo 2**. Além do ácido clorogênico, também houve aumento na concentração de rutina. Por isso, no esquema há a representação de aumento na concentração de metabólitos secundários (**Figura 7**).

Figura 7. Representação de uma célula vegetal com as respostas de defesa desencadeadas após a entrada do patógeno no 28º DAI. Destaque em vermelho para o aumento na concentração de AsA, GSSG, SAG, poliaminas e metabólitos secundários. Adaptado de Somssich & Hahlbrock, 1998; Kawakami et al., 2004; Fröhlich & Durner, 2011; Yamasaki & Cohen, 2006; Wimalasekera et al., 2011; Bielen et al., 2013. AsA = ácido ascórbico; Citb = citocromo b; CP = capa proteica; DHA = dehidroascorbato; EROs = espécies reativas de oxigênio; Fd = ferredoxina; GalLDH = L-galactone-1,4-lactone desidrogenase; GR = glutatona redutase; GSH = glutatona reduzida; GSSG = glutatona oxidada; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; MDHA = monodehidroascorbato; MDHAR = monodehidroascorbato redutase; NADPH:NR = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato:nitrato redutase; MP = membrana plasmática; MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *mitogen activated protein kinase*); NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADP⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; NO = óxido nítrico; NR = nitrato redutase; PA = poliaminas; PM = proteína de movimento; RdRp = RNA dependente RNA polimerase; SAG = ácido salicílico 2-O-β-D-glicose; SAR = resistência sistêmica adquirida (do inglês, *systemic acquired resistance*); vRNA = RNA viral. O retângulo verde representa o ciclo ascorbato-glutatoniano.

Em relação a *S. lycopersicum* 'VFNT', considerando que essa cultivar possui o gene *Tm-2²*, o qual confere resistência ao tomate mosaic virus (ToMV) (Pino-Nunes et al., 2009), é provável que esse gene também esteja envolvido na resistência ao tomate mottle mosaic virus (ToMMV).

As análises das moléculas envolvidas na resposta de defesa tiveram início, provavelmente, antes do 1º DAI. Para as respostas de defesa da interação incompatível (*S. lycopersicum* 'VFNT'-ToMMV), esse período foi considerado tardio visto que não houve variações quantitativas nos teores da maioria das moléculas.

Após a entrada na célula, foi relatado que no período de 0 a 6 h, já são encontradas proteínas virais do TMV e do ToMV, como a replicase, a proteína de movimento, a capa proteica viral, além de sequências do RNA viral (Kawakami et al.,

2004). O produto do gene de avirulência do ToMV é a proteína de movimento (Lanfermeijer et al., 2004). Caso a proteína de movimento do ToMMV também seja o produto do gene de avirulência que seja reconhecido pelo gene *Tm2²* e que a dinâmica de infecção seja semelhante a do TMV e do ToMV, em cerca de 6 h poderia ter havido a interação gene a gene que culminaria nas respostas de defesa de *S. lycopersicum* 'VFNT'. Assim, a explosão oxidativa, com aumento na concentração de óxido nítrico e de ácido salicílico provavelmente ocorreriam em questões de horas após a inoculação.

O gene *Tm-2²* confere resistência extrema ao ToMV, com a ausência de lesões locais macroscópicas. Essa ausência é interpretada como uma resposta rápida do gene de resistência à infecção pelo ToMV, de modo que o vírus se restrinja a apenas poucas células (Lanfermeijer et al., 2003). Não foram observadas lesões macroscópicas em *S. lycopersicum* 'VFNT', o que nos leva a acreditar que esse gene de resistência também esteja ligado à resistência extrema ao ToMMV. A resistência extrema explicaria a baixa concentração viral e a não observação de respostas de defesa, pois podem ter ocorrido muito rapidamente e provavelmente tenha se restringido às poucas células que foram infectadas.

Assim como a análise representada na **Figura 2** agrupou as análises de acordo com os distintos períodos do experimento, a PCA feita com os dados de *S. lycopersicum* 'VFNT' também mostrou esse padrão de resposta (**Figura 8**), indicando que, nesse caso, a infecção não influenciou o metabolismo dessa espécie. A construção da PCA para essa espécie seguiu o mesmo procedimento adotado para *S. pimpinellifolium*, com a diferença de que o grupo dos aminoácidos foi formado pela soma das concentrações de treonina, oxo-prolina e glutamato e ácidos orgânicos pela soma dos teores de glicerato, quinato, glicerol, succinato, 2-cetoglutarato e 2-cetogluconato.

Os autovetores dessa PCA não estão todos correlacionados assim como os observados na PCA da espécie suscetível. Foram formados 4 grupos distintos de acordo com o dia do experimento. O 1º DAI formou um grupo que está representado em vermelho, o 7º DAI está representado pela elipse em azul, os 14º e 21º DAI formaram um único grupo, que se encontra em verde e o 28º DAI está representado pela elipse ouro. Nesse caso, a PC1 separou os grupos relacionados ao período inicial da análise (1 e 7 DAI) dos grupos relacionados ao período intermediário (14 DAI) e final do experimento (21 e 28 DAI). Entretanto, não houve distinção do grupo das

Infectadas com o grupo Tampão, mais uma vez indicando que a infecção pelo ToMMV não causou influências no metabolismo dessa planta (**Figura 8.a**).

Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) com todas as análises feitas para a espécie *S. lycopersicum* ‘VFNT’ com todos os tratamentos (Controle – C; Tampão – T; Infectadas – I) em todos os dias do experimento. AA = aminoácidos; AAO = ácido ascórbico oxidado; AAR = ácido ascórbico reduzido; AAT = ácido ascórbico total; AO = ácidos orgânicos; CHO = açúcares; ELISA = concentração viral; FEN = fenólicos; GSSG = glutathiona oxidada; NO = óxido nítrico; PA = poliaminas; SA = ácido salicílico livre; SAG = ácido salicílico conjugado. Elipses em diferentes cores representam os diferentes dias após a inoculação (DAI). Vermelho: 1 DAI; Azul: 7 DAI; Verde: 14 e 21 DAI; Ouro: 28 DAI. **a.** Gráfico da PCA com as variáveis mencionadas acima. **b.** Gráfico da PCA com os tratamentos em todos os dias analisados. Controle – figura cheia; Tampão – figura vazia; Infectadas – figura com símbolo; DAI 1 – vermelho; DAI 7 – azul; DAI 14 – verde; DAI 21 – roxo; DAI 28 – ouro.

Na **Tabela 3** encontram-se os valores de variância para as componentes da PCA da **Figura 8**.

Tabela 3. Valores de variância explicada e acumulada para os componentes que explicam a maior parte das variações para a PCA construída para espécie *S. lycopersicum* ‘VFNT’ com todos os tratamentos.

PC	Variância explicada	Variância acumulada
1	0,286	0,286
2	0,223	0,510
3	0,145	0,655
4	0,126	0,781
5	0,118	0,900
6	0,030	0,929
7	0,028	0,957
8	0,017	0,975
9	0,013	0,987
10	0,009	0,996
11	0,004	0,999
12	0,001	1,000

Como já citado diversas vezes ao longo dos outros capítulos dessa tese, é necessário analisar as respostas de defesa de *S. lycopersicum* 'VFNT' em períodos referentes a horas após a inoculação, para que se possa compreender melhor os mecanismos de defesa utilizados por essa planta, pois isso poderá ajudar no desenvolvimento de plantas comerciais resistentes ao ToMMV (Kang et al., 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bielen, A., Remans, T., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2013) 'The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions.', *International journal of molecular sciences*, 14(3), pp. 6382–413. doi: 10.3390/ijms14036382.
- Conti, G., Rodriguez, M. C., Venturuzzi, A. L. & Asurmendi, S. (2017) 'Modulation of host plant immunity by *Tobamovirus* proteins', *Annals of Botany*, 119, pp. 737–747. doi: 10.1093/aob/mcw216.
- Fröhlich, A. & Durner, J. (2011) 'The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed?', *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 181(4), pp. 401–4. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.07.014.
- Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T. & Ishikawa, M. (2007) 'An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), pp. 13833–8. doi: 10.1073/pnas.0703203104.
- Kang, B.-C., Yeam, I. & Jahn, M. M. (2005) 'Genetics of plant virus resistance.', *Annual Review of Phytopathology*, 43, pp. 581–621. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.011205.141140.
- Kawakami, S., Watanabe, Y. & Beachy, R. N. (2004) '*Tobacco mosaic virus* infection spreads cell to cell as intact replication complexes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), pp. 6291–6. doi: 10.1073/pnas.0401221101.
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. & Silva, H. (2000) 'Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), pp. 8849–55. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=34022&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Lanfermeijer, F. C., Dijkhuis, J., Sturre, M. J. G. & Haan, P. De (2003) 'Cloning and characterization of the durable *Tomato mosaic virus* resistance gene Tm-2² from *Lycopersicon esculentum*', *Plant molecular biology*, 52, pp. 1037–1049.
- Lanfermeijer, F. C., Jiang, G., Ferwerda, M. A., Dijkhuis, J., de Haan, P., Yang, R. & Hille, J. (2004) 'The durable resistance gene Tm-2² from tomato confers resistance against ToMV in tobacco and preserves its viral specificity', *Plant Science*, 167(4), pp. 687–692. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.04.027.
- Lanfermeijer, F. C., Warmink, J. & Hille, J. (2005) 'The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-2² resistance genes from tomato differ in four amino acids.', *Journal of experimental botany*, 56(421), pp. 2925–33. doi: 10.1093/jxb/eri288.
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Yenush, L., Conejero, V., Rodrigo, I. & Bellés, J. M. (2016) 'Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and *Tomato spotted wilt virus*', *PLoS ONE*, 11(11), pp. 1–25. doi: 10.1371/journal.pone.0166938.
- Pino-Nunes, L. E., De O. Figueira, A. V., Neto, A. T., Zsögön, A., Piotto, F. A., Silva, J. A., Bernardi, W. F. & Peres, L. E. P. (2009) 'Induced mutagenesis and natural genetic variation in tomato "Micro-tom"', *Acta Horticulturae*, 821, pp. 63–72. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.821.5.
- Somssich, I. E. & Hahlbrock, K. (1998) 'Pathogen defence in plants- a paradigm of biological complexity', *Trends in plant science*, 3(3), pp. 86–90.
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Segal Floh, E. I. & Scherer, G. F. E. (2006) 'Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings', *Plant and Cell Physiology*, 47(3), pp. 346–354. doi: 10.1093/pcp/pci252.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F. & Scherer, G. F. E. (2011) 'Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses.', *Plant science : an international journal of experimental plant biology*. Elsevier Ireland Ltd, 181(5), pp. 593–603. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002.
- Yamasaki, H. & Cohen, M. F. (2006) 'NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants?', *Trends in Plant Science*, 11(11), pp. 522–524. doi: 10.1016/j.tplants.2006.09.009.

Apêndice I

Tabela I.1. Valores de p referentes aos testes estatísticos aplicados aos dados obtidos a partir da análise de NO em diferentes DAI com a espécie *S. pimpinellifolium*. O teste de homocedasticidade aplicado foi o Bartlett, o de normalidade foi o Shapiro-Wilk e a comparação dois a dois foi o teste de Wilcoxon. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Grupo DAI	homocedasticidade		normalidade			teste Wilcoxon	
	C e T	T e I	C	T	I	C e T	T e I
1	0,11	0,56	0,03	0,92	0,03	0,06	2,17.10-3**
7	0,58	0,06	0,02	0,53	0,53	0,94	2,17.10-3**
14	0,45	0,08	0,72	0,52	0,52	0,24	0,82
21	0,42	0,06	0,65	0,85	0,85	0,09	0,59
28	0,44	0,17	0,25	0,05	0,05	0,13	0,48

DAI = dias após a inoculação; C = Controle; T = Tampão; I = Infectadas. **muito significativo ($p \leq 0,01$).

Tabela I.2. Valores de p referentes à homocedasticidade dos dados das poliaminas em diferentes DAI para os grupos Controle-Tampão e Tampão- Infectadas para *S. pimpinellifolium*. Valores em itálico representam dados que foram transformados. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os valores em itálico representam dados que foram transformados.

DAI poliamina	dados dos grupos C e T					dados dos grupos T e I				
	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
putrescina	0,73	0,21	0,80	0,91	0,62	0,72	0,75	0,34	0,07	0,22
espermidina	0,68	0,82	0,79	0,23	0,68	0,38	0,39	0,72	0,43	0,86
espermina	0,33	0,28	0,44	0,05	0,73	0,05	0,67	0,06	0,78	0,54

DAI = dias após a inoculação; C = Controle; T = Tampão; I = Infectadas.

Tabela I.3. Valores de p referentes à normalidade dos dados das poliaminas em diferentes DAI para os grupos Controle, Tampão e Infectadas para *S. pimpinellifolium*. O teste aplicado foi o Bartlett e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Grupo	DAI	putrescina	espermidina	espermina
Controle	1	0,09	0,65	0,42
	7	0,91	0,12	0,43
	14	0,05	0,07	0,55
	21	0,14	0,68	0,24
	28	0,32	0,99	0,73
Tampão	1	0,05	0,06	0,84
	7	0,29	0,09	0,33
	14	0,89	0,55	0,30
	21	0,93	0,40	0,69
	28	0,13	0,71	0,34
Infectadas	1	0,41	0,66	0,10
	7	0,99	0,27	0,50
	14	0,48	0,86	0,35
	21	0,82	0,16	0,44
	28	0,57	0,34	0,24

DAI = dias após a inoculação

Tabela I.4. Valores de p referentes ao teste t dos dados das poliaminas em diferentes DAI para os grupos Controle-Tampão e Tampão- Infectadas para *S. pimpinellifolium*. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

DAI	Controle-Tampão			Tampão-Infectadas		
	putrescina	espermidina	espermina	putrescina	espermidina	espermina
1	$6,79 \cdot 10^{-3**}$	$3,75 \cdot 10^{-4***}$	$2,28 \cdot 10^{-4***}$	0,06	0,03*	$5,74 \cdot 10^{-3**}$
7	$8,83 \cdot 10^{-3**}$	$3,33 \cdot 10^{-3***}$	0,01*	0,46	0,03*	0,96
14	0,39	0,59	0,38	0,51	0,55	0,11
21	0,04*	0,02*	0,05	0,04	0,23	0,54
28	$1,22 \cdot 10^{-3**}$	$7,75 \cdot 10^{-4***}$	$4,93 \cdot 10^{-3**}$	$8,90 \cdot 10^{-5****}$	$1,43 \cdot 10^{-6****}$	$1,05 \cdot 10^{-4***}$

DAI = dias após a inoculação; * significativo ($p \leq 0,05$); ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$).

Tabela I.5. Valores de p referentes à homocedasticidade dos dados de ácido salicílico em diferentes DAI para os grupos Controle-Tampão e Tampão-Infectadas para *S. pimpinellifolium*. O teste aplicado foi o Bartlett e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores em itálico representam dados que foram transformados.

DAI ác. salic.	dados dos grupos C e T					dados dos grupos T e I				
	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
livre	0,47	<i>0,64</i>	0,24	0,63	<i>0,06</i>	0,79	<i>0,06</i>	0,004	0,44	0,96
conjugado	0,70	0,79	<i>0,72</i>	<i>0,48</i>	0,27	0,53	0,67	0,90	0,31	0,14
total	0,22	0,82	0,26	0,34	0,40	0,05	0,02	$2,20 \cdot 10^{-5}$	0,75	0,72

DAI = dias após a inoculação

Tabela I.6. Valores de p referentes à normalidade dos dados de ácido salicílico em diferentes DAI para os grupos Controle, Tampão e Infectadas para *S. pimpinellifolium*. O teste aplicado foi o Bartlett e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores em itálico representam dados que foram transformados.

Grupo	DAI	livre	conjugado	total
Controle	1	0,93	0,05	0,27
	7	0,39	0,11	0,83
	14	0,87	<i>0,05</i>	0,47
	21	0,88	<i>0,01</i>	0,81
	28	<i>0,10</i>	0,21	0,40
Tampão	1	0,60	0,05	0,12
	7	0,49	0,08	0,58
	14	0,83	0,10	0,04
	21	0,23	0,47	0,40
	28	<i>0,04</i>	0,71	0,12
Infectadas	1	0,61	<i>0,31</i>	0,77
	7	<i>0,78</i>	<i>0,32</i>	0,50
	14	0,87	0,07	0,71
	21	0,29	<i>0,85</i>	0,89
	28	<i>0,08</i>	0,36	0,02

DAI = dias após a inoculação.

Tabela I.7. Valores de p referentes ao teste t dos dados de ácido salicílico em diferentes DAI para os grupos Controle-Tampão e Tampão- Infectadas para *S. pimpinellifolium*. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos

DAI	Controle-Tampão			Tampão-Infectadas		
	livre	conjugado	total	livre	conjugado	total
1	0,87	0,41	0,39	0,97	0,29	0,49
7	0,64	0,35	0,37	$1,45 \cdot 10^{-4***}$	0,01	0,01*
14	0,29	0,75	0,48	0,11	$2,3 \cdot 10^{-3**}$	0,01*
21	0,96	0,09	0,13	0,30	$6,5 \cdot 10^{-3**}$	0,01*
28	0,16	0,86	0,38	0,62	$5,3 \cdot 10^{-3**}$	0,25

DAI = dias após a inoculação. * significativo ($p \leq 0,05$); ** muito significativo ($p \leq 0,01$);

***extremamente significativo ($p \leq 0,001$).

Tabela I.8. Valores de homocedasticidade obtidos pelo teste de Bartlett, de normalidade obtidos por Shapiro-Wilk e de p obtidos pelo teste t para a espécie *S. pimpinellifolium* para os teores de ácido ascórbico reduzido, oxidado e total. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

DAI	homocedasticidade		normalidade			teste t	
Grupos	C e T	T e I	C	T	I	C e T	T e I
REDUZIDO							
1	0,65	0,44	0,74	0,61	0,98	0,69	0,51
7	0,28	0,99	0,83	0,09	0,56	0,15	$9,16 \cdot 10^{-4***}$
14	0,21	0,36	0,07	0,74	0,08	$3,89 \cdot 10^{-3**}$	$9,10 \cdot 10^{-6****}$
21	0,81	0,29	0,21	0,11	0,20	$2,98 \cdot 10^{-3**}$	$1,12 \cdot 10^{-4***}$
28	0,15	0,42	0,81	0,20	0,18	0,63	$6,27 \cdot 10^{-4***}$
OXIDADO							
1	0,99	0,91	0,48	0,96	0,25	0,09	0,10
7	0,38	0,74	0,35	0,78	0,39	0,84	0,93
14	0,65	0,88	0,65	0,98	0,11	0,63	0,10
21	0,10	0,34	0,05	0,37	0,71	0,88	0,70
28	0,59	0,10	0,98	0,14	0,65	0,99	$4,53 \cdot 10^{-3**}$
TOTAL							
1	0,16	0,76	0,90	0,08	0,17	0,76	$2,26 \cdot 10^{-3}$
7	0,59	0,82	0,89	0,91	0,48	0,12	$6,46 \cdot 10^{-4***}$
14	0,31	0,68	0,15	0,08	0,98	$3,46 \cdot 10^{-5****}$	$7,43 \cdot 10^{-9****}$
21	0,92	0,62	0,23	0,40	0,85	$3,59 \cdot 10^{-3**}$	$2,32 \cdot 10^{-4***}$
28	0,03	0,20	0,26	0,11	0,45	0,63	$2,69 \cdot 10^{-6****}$

DAI = dias após a inoculação. ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$).

Tabela I.9. Valores de homocedasticidade obtidos pelo teste de Bartlett, de normalidade obtidos por Shapiro-Wilk e de p obtidos pelo teste t para a espécie *S. pimpinellifolium* para o teor de glutatona oxidada. ** muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$). Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

DAI \ Grupo	homocedasticidade		normalidade			teste t	
	C e T	T e I	C	T	I	C e T	T e I
OXIDADO							
1	0,64	0,009	0,33	0,43	0,25	0,79	0,63
7	0,86	0,34	0,09	0,21	0,07	0,32	0,03*
14	0,18	0,39	0,45	0,90	0,37	0,02	$2,36 \cdot 10^{-3**}$
21	0,38	0,23	0,24	0,54	0,61	$5,02 \cdot 10^{-4***}$	$6,48 \cdot 10^{-5****}$
28	0,63	0,17	0,41	0,11	0,97	0,13	$4,01 \cdot 10^{-3**}$

DAI = dias após a inoculação. **muito significativo ($p \leq 0,01$); *** e **** extremamente significativo ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$).

Tabela I.10. Valores de p referentes aos testes estatísticos aplicados aos dados obtidos a partir da análise de NO em diferentes DAI com a espécie *S. lycopersicum* 'VFNT'. O teste de homocedasticidade aplicado foi o Bartlett, o de normalidade foi o Shapiro-Wilk e a comparação dois a dois foi o teste de Wilcoxon. Todos os testes foram avaliados com 5% de confiança. DAI = dias após a inoculação; C = Controle; T = Tampão; I = Infectadas.

Grupos DAI	homocedasticidade		normalidade			teste Wilcoxon	
	C e T	T e I	C	T	I	C e T	T e I
1	0,63	0,35	0,44	0,04	0,02	0,03*	$2,17 \cdot 10^{-3**}$
7	0,50	0,55	0,03	0,77	0,27	0,18	0,13
14	0,66	0,89	0,94	0,65	0,87	0,04*	0,30
21	0,46	0,92	0,25	0,77	0,45	0,18	$1,52 \cdot 10^{-2*}$
28	0,39	0,50	0,76	0,68	0,38	$4,33 \cdot 10^{-3**}$	0,82

DAI = dias após a inoculação. *significativo ($p \leq 0,05$); **muito significativo ($p \leq 0,01$).

Tabela I.11. Valores de p referentes à homocedasticidade dos dados transformados das poliaminas em diferentes DAI para os grupos Controle-Tampão e Tampão- Infectadas para *S. lycopersicum* 'VFNT'. O teste aplicado foi o Bartlett e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores em itálico representam dados que foram transformados.

DAI poliamina	dados dos grupos C e T					dados dos grupos T e I				
	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
putrescina	0,44	0,20	0,88	0,44	0,23	0,87	0,91	0,99	0,07	0,42
espermidina	1,00	0,35	0,14	0,82	0,08	0,16	0,22	0,05	0,39	0,10
espermina	0,81	0,37	0,16	0,18	0,97	0,10	0,79	0,68	0,06	0,14

DAI = dias após a inoculação.

Tabela I.12. Valores de p referentes à normalidade dos dados das poliaminas em diferentes DAI para os grupos Controle, Tampão e Infectadas para *S. lycopersicum* 'VFNT'. O teste aplicado foi o Bartlett e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Grupo	DAI	putrescina	espermidina	espermina
Controle	1	0,40	0,57	0,25
	7	0,85	0,55	0,04
	14	0,28	0,14	0,46
	21	0,38	0,51	0,54
	28	0,45	0,58	0,87
Tampão	1	0,19	0,08	0,20
	7	0,13	0,22	0,30
	14	0,75	0,07	0,47
	21	0,14	0,07	0,68
	28	0,11	0,15	0,05
Infectadas	1	0,24	0,26	0,42
	7	0,23	0,73	0,34
	14	0,36	0,26	0,33
	21	0,25	0,16	0,84
	28	0,08	0,82	0,13

DAI = dias após a inoculação

Tabela I.13. Valores de p referentes ao teste t dos dados das poliaminas em diferentes DAI para os grupos Controle-Tampão e Tampão- Infectadas para *S. lycopersicum* 'VFNT'. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Controle-Tampão				Tampão-Infectadas		
DAI	putrescina	espermidina	espermina	putrescina	espermidina	espermina
1	0,41	0,11	0,92	0,07	0,34	0,58
7	0,09	0,28	0,46	0,21	0,15	0,28
14	0,27	0,18	0,45	0,90	0,49	0,15
21	0,19	0,95	1,00	0,11	0,37	0,15
28	0,37	0,20	0,62	0,85	0,05	0,17

Tabela I.14. Valores de p referentes à homocedasticidade dos dados de ácido salicílico em diferentes DAI para os grupos Controle-Tampão e Tampão-Infectadas para *S. lycopersicum* 'VFNT'. O teste aplicado foi o Bartlett e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores em itálico representam dados que foram transformados.

DAI ás. salic.	dados dos grupos C e T					dados dos grupos T e I				
	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
livre	0,13	0,03	0,69	0,48	0,64	0,54	0,74	0,93	0,99	0,63
conjugado	0,58	0,64	0,87	0,47	0,76	0,64	0,45	0,51	0,32	0,77
total	0,47	0,96	0,39	0,52	0,70	0,74	0,74	0,65	0,43	0,61

DAI = dias após a inoculação.

Tabela I.15. Valores de p referentes à normalidade dos dados de ácido salicílico em diferentes DAI para os grupos Controle, Tampão e Infectadas para *S. lycopersicum* 'VFNT'. O teste aplicado foi o Bartlett e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores em *itálico* representam dados que foram transformados.

Grupo	DAI	livre	conjugado	total
Controle	1	0,42	<i>0,23</i>	0,07
	7	0,18	<i>0,14</i>	0,39
	14	0,25	0,06	0,49
	21	<i>0,88</i>	0,23	0,11
	28	0,06	0,47	0,03
Tampão	1	<i>0,16</i>	<i>0,10</i>	0,05
	7	0,79	<i>0,06</i>	0,02
	14	0,38	0,34	0,38
	21	<i>0,11</i>	0,18	0,90
	28	0,07	0,70	0,50
Infectadas	1	0,32	<i>0,48</i>	0,29
	7	0,29	<i>0,02</i>	0,29
	14	0,42	0,07	0,42
	21	<i>0,58</i>	0,95	0,23
	28	0,42	<i>0,03</i>	0,42

DAI = dias após a inoculação.

Tabela I.16. Valores de p referentes ao teste t dos dados de ácido salicílico em diferentes DAI para os grupos Controle-Tampão e Tampão- Infectadas para *S. lycopersicum*. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Controle-Tampão				Tampão-Infectadas		
DAI	livre	conjugado	total	livre	conjugado	total
1	0,91	<i>0,99</i>	0,81	<i>0,77</i>	<i>0,47</i>	0,57
7	0,64	<i>0,88</i>	0,86	0,94	<i>0,40</i>	0,52
14	0,36	0,24	0,78	0,25	0,80	0,62
21	<i>0,48</i>	0,81	0,71	<i>0,36</i>	0,95	0,66
28	0,84	0,56	0,67	0,40	<i>0,22</i>	0,24

DAI = dias após a inoculação.

Tabela I.17. Valores de homocedasticidade obtidos pelo teste de Bartlett, de normalidade obtidos por Shapiro-Wilk e de p obtidos pelo teste t para a espécie *S. lycopersicum* 'VFNT' para os teores de ácido ascórbico reduzido, oxidado e total. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

	homocedasticidade		normalidade			teste t	
	C e T	T e I	C	T	I	C e T	T e I
REDUZIDO							
1	0,09	0,17	0,87	0,30	0,87	0,51	0,42
7	0,76	0,15	0,10	0,14	0,55	0,04*	0,08
14	0,48	0,44	0,19	0,29	0,57	0,33	0,31
21	0,69	0,56	0,17	0,74	0,04	0,18	0,98
28	0,94	0,54	0,90	0,35	0,47	0,90	0,22
OXIDADO							
1	0,34	0,12	0,11	0,70	0,54	0,25	0,93
7	0,75	0,33	0,82	0,74	0,34	0,86	0,74
14	0,66	0,33	0,26	0,03	0,14	0,94	0,13
21	0,54	0,79	0,10	0,15	0,45	0,45	0,88
28	0,66	0,78	0,07	0,88	0,86	0,42	0,43
TOTAL							
1	0,06	0,16	0,96	0,51	0,84	0,31	0,60
7	0,58	0,80	0,44	0,51	0,39	0,02*	0,06
14	0,20	0,87	0,33	0,15	0,95	0,05	0,44
21	0,44	0,08	0,68	0,61	0,43	0,96	0,30
28	0,83	0,99	0,88	0,48	0,26	0,76	0,39

Tabela I.18. Valores de homocedasticidade obtidos pelo teste de Bartlett, de normalidade obtidos por Shapiro-Wilk e de p obtidos pelo teste t para a espécie *S. lycopersicum* 'VFNT' para o teor de glutatona oxidada. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Grupo DAI	homocedasticidade		normalidade			teste t	
	C e T	T e I	C	T	I	C e T	T e I
OXIDADO							
1	0,13	0,21	0,06	0,13	0,74	0,45	0,52
7	0,99	0,26	0,28	0,66	0,44	$1,45 \cdot 10^{-4***}$	0,04*
14	0,59	0,03	0,33	0,72	0,42	0,15	0,99
21	0,37	0,25	0,05	0,14	0,60	0,51	0,99
28	0,12	0,05	0,69	0,32	0,59	0,93	0,69

DAI = dias após a inoculação. *significativo ($p \leq 0,05$); ***extremamente significativo ($p \leq 0,001$).

Tabela I.19. Valores de p para teste de homocedasticidade, normalidade e teste t para a comparação entre as poliaminas do 1º DAI das plantas mecanicamente injuriadas com as do 28º DAI das plantas infectadas para a espécie *S. pimpinellifolium*.

	Normal.	Homoc.	Teste t	Normal.	Homoc.	Teste t	Normal.	Homoc.	Teste t - W
	putrescina			espermidina			espermina		
T1	0,08			0,06			0,84		
I28	0,57	0,33	0,88	0,34	0,90	0,09	0,24	0,02	$5,26 \cdot 10^{-4****}$

Apêndice II

Tabela II.1. Valores de p referentes ao teste de homocedasticidade realizado através do teste de Bartlett e de Wilcoxon para a análise de CLAE-EM-EM para a espécie *S. pimpinellifolium* para os grupos C e T. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

	DAI	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
Nº	Provável subst.	Homocedasticidade					Teste de Wilcoxon				
1	ácido cafeoil hexárico 1	0,84	0,19	0,50	0,30	0,53	0,39	0,17	0,08	$2,9 \cdot 10^{-2}$	0,28
2	N.I.1	0,77	0,23	0,63	0,41	0,38	0,32	0,14	0,11	0,09	0,33
3	ácido cafeoil hexárico 2	0,69	0,10	0,77	0,26	0,07	0,32	0,01	0,03	$3,9 \cdot 10^{-3}$	0,68
4	ácido cafeoil hexárico 3	0,57	0,16	0,65	0,38	0,11	0,13	0,01	0,04	0,05	0,85
5	ácido cafeoil hexárico 4	0,43	0,14	0,35	0,11	0,30	0,32	0,04	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	0,14
6	ácido cafeoil hexárico 5	0,84	0,13	0,99	0,32	0,05	0,14	0,04	$3,9 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,32
7	ácido neoclorogênico	0,67	0,16	0,58	0,29	0,05	0,39	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	0,36
8	ácido cafeoil hexárico 6	0,29	0,21	0,87	0,51	0,10	0,19	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,68
9	N.I.2	0,14	0,74	0,68	0,76	-	0,79	$3,3 \cdot 10^{-4}$	0,12	0,03	-
10	N.I.3	-	0,94	-	-	0,53	-	0,10	-	-	0,14
11	ácido gentísico	0,78	0,93	0,14	0,08	0,65	1	0,27	$3,6 \cdot 10^{-4}$	0,04	$6,5 \cdot 10^{-3}$
12	N.I.4	-	0,13	0,09	0,61	0,80	-	0,97	$5,4 \cdot 10^{-3}$	0,42	0,44
13	ácido clorogênico	0,18	0,18	0,09	0,12	0,38	0,48	$8,9 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	0,06
14	isômero ác. clorogênico	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-
15	ácido cafeico	0,84	0,74	0,67	0,66	0,32	0,76	0,19	$1,9 \cdot 10^{-3}$	0,14	0,08
16	derivado de feruloil	-	-	0,86	0,96	0,73	-	-	$8,6 \cdot 10^{-3}$	0,84	0,01
17	isômero ác. feruloil quínico	-	0,11	0,96	0,70	0,73	-	$3,0 \cdot 10^{-4}$	0,57	0,02	0,14
18	N.I.5	-	-	-	-	0,23	-	-	-	-	0,04
19	N.I.6	-	0,98	0,61	0,45	0,71	-	0,74	0,34	0,01	0,10
20	N.I.7	0,55	0,56	0,78	0,42	0,79	0,21	0,32	0,28	$7,3 \cdot 10^{-3}$	0,04
21	N.I.8	-	0,07	0,22	-	0,52	0,37	$5,1 \cdot 10^{-3}$	0,02	-	0,91
22	N.I.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continua Tabela II.1

Continuação Tabela II.1

	DAI	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
Nº	Provável subst.	Homocedasticidade					Teste de Wilcoxon				
23	N.I.10	0,65	0,80	0,92	0,80	0,43	0,44	0,85	$2,9 \cdot 10^{-3}$	0,05	0,03
24	Rutina	-	0,41	0,33	0,76	0,24	-	0,97	0,85	0,22	0,14
25	N.I.11	0,47	0,30	0,75	0,61	0,62	0,32	0,65	0,73	0,97	0,68
26	tiramina cumaroil	-	0,05	0,94	0,44	0,94	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,31	0,85	0,01	0,62
27	campferol 3-O-rutinosídeo	0,65	0,21	0,74	0,44	0,51	$1,1 \cdot 10^{-5}$	0,85	0,85	0,02	0,09
28	tiramina feruloil	-	-	-	-	0,15	-	-	-	-	$4,4 \cdot 10^{-3}$
29	N.I.12	-	0,20	0,11	0,72	0,85	-	0,39	0,05	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$7,7 \cdot 10^{-4}$
30	N.I.13	0,96	0,76	0,15	0,72	0,08	0,60	0,88	0,05	0,80	$1,1 \cdot 10^{-3}$
31	N.I.14	-	-	-	-	0,50	-	-	-	-	0,02
32	N.I.15	-	-	0,17	-	0,99	-	-	0,07	-	0,35
33	N.I.16	0,29	0,08	0,25	0,66	0,71	0,17	0,97	0,05	0,15	0,85
34	N.I.17	0,84	0,99	0,70	0,77	0,99	0,20	0,94	0,49	0,32	1
35	N.I.18	0,81	0,69	0,97	0,62	0,63	0,16	0,06	0,57	0,38	0,34

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.1

Tabela II.2. Valores de *p* referentes ao teste de homocedasticidade realizado através do teste de Bartlett e de Wilcoxon para a análise de CLAE-EM-EM para a espécie *S. pimpinellifolium* para os grupos T e I. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

	DAI	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
Nº	Subst.	Homocedasticidade					Teste de Wilcoxon				
1	ácido cafeoil hexárico 1	0,92	0,33	0,34	0,06	0,17	0,80	0,58	0,06	0,03	0,25
2	N.I.1	0,62	0,10	0,52	0,12	0,35	0,85	0,63	0,09	0,973	0,28
3	ácido cafeoil hexárico 2	0,79	0,16	0,35	0,91	0,57	0,91	1	0,01	0,91	0,148
4	ácido cafeoil hexárico 3	0,63	0,18	0,64	0,12	0,68	0,48	0,97	0,04	0,97	0,11
5	ácido cafeoil hexárico 4	0,59	0,65	0,09	0,67	0,91	0,91	0,68	6,8.10 ⁻³	0,97	0,12
6	ácido cafeoil hexárico 5	0,56	0,39	0,09	0,76	0,09	0,74	0,44	0,03	0,06	0,19
7	ácido neoclorogênico	0,86	0,19	0,27	0,74	0,07	0,22	0,97	1,9.10 ⁻³	0,74	0,08
8	ácido cafeoil hexárico 6	0,87	0,07	0,54	0,08	0,38	0,28	0,74	6,8.10 ⁻³	0,25	0,028
9	N.I.2	0,37	0,81	0,63	0,69	-	0,03	0,65	4,0.10 ⁻³	0,29	-
10	N.I.3	-	0,91	-	-	0,44	-	0,04	-	-	0,578
11	ácido gentísico	0,76	0,31	0,10	0,85	0,67	0,06	0,19	1,6.10 ⁻³	0,07	0,80
12	N.I.4	0,54	-	0,57	-	0,86	0,63	-	0,24	-	0,09
13	ácido clorogênico	0,49	0,63	0,49	0,48	0,09	5,2.10 ⁻³	0,01	-	-	2,9.10 ⁻³
14	isômero ác. clorogênico	0,47	0,49	-	-	-	0,84	0,26	-	-	-
15	ácido cafeico derivado de feruloil	0,22	0,51	0,31	0,10	-	0,211	4,6.10 ⁻³	2,2.10 ⁻⁵	0,16	0,06
16	isômero ác. feruloil quínico	0,19	-	0,80	-	0,19	0,05	-	1,7.10 ⁻³	-	0,35
17	isômero ác. feruloil quínico	0,71	0,48	0,18	0,73	0,07	0,10	0,74	1,1.10 ⁻⁵	0,19	0,03
18	N.I.5	-	0,53	-	-	0,42	-	3,3.10 ⁻⁴	-	-	5,7.10 ⁻⁴
19	N.I.6	0,92	0,31	0,13	-	0,37	0,39	8,0.10 ⁻³	0,02	-	0,08
20	N.I.7	0,05	0,60	0,45	0,17	0,95	0,04	0,63	1,8.10 ⁻⁴	0,12	0,80
21	N.I.8	-	0,07	0,61	-	0,06	-	0,62	1,3.10 ⁻⁴	-	0,47
22	N.I.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	N.I.10	0,09	0,49	0,66	0,26	0,27	8,9.10 ⁻³	1	0,01	5,2.10 ⁻³	1,3.10 ⁻⁴
24	Rutina	-	-	0,06	0,93	0,82	-	-	0,52	0,01	0,12
25	N.I.11	0,23	0,42	0,76	0,71	0,52	0,19	0,45	1	-	0,48
26	tiramina cumaroil	0,62	0,19	0,26	-	0,85	1	4,3.10 ⁻⁴	0,02	-	0,52
27	campferol 3-O-rutinosídeo	0,25	0,60	0,32	0,18	0,42	0,14	1,8.10 ⁻⁴	1,1.10 ⁻⁵	0,27	0,05
28	tiramina feruloil	-	0,07	-	-	0,05	-	-	-	-	0,10
29	N.I.12	-	-	0,08	0,88	0,24	-	4,4.10 ⁻⁴	0,06	0,12	0,06
30	N.I.13	0,47	0,49	0,68	0,62	0,18	0,67	1,8.10 ⁻⁴	0,74	0,01	0,03
31	N.I.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1.10 ⁻³
32	N.I.15	-	0,42	0,19	-	0,62	-	-	0,15	-	1,7.10 ⁻³
33	N.I.16	0,55	0,10	0,72	-	0,40	1	0,82	0,33	2,2.10 ⁻⁵	8,1.10 ⁻³
34	N.I.17	0,91	-	0,55	0,77	0,74	0,23	0,15	0,12	0,08	0,04
35	N.I.18	0,95	0,66	0,66	0,33	-	1	0,93	0,06	0,15	-

DAI = dias após a inoculação

Tabela II.3. Valores de *p* referentes ao teste de homocedasticidade realizado através do teste de Bartlett e de Wilcoxon para a análise de CLAE-EM-EM para a espécie *S. lycopersicum* 'VFNT' para os grupos C e T. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

	DAI	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
Nº	Provável subst.	Homocedasticidade					Teste de Wilcoxon				
1	ácido cafeoil hexárico 1	0,97	0,78	0,50	0,90	0,05	0,25	0,68	0,06	1	0,44
2	N,I,1	0,74	0,85	0,26	0,81	0,05	0,12	0,68	0,28	1	0,19
3	ácido cafeoil hexárico 2	0,85	0,92	0,84	0,69	0,13	0,44	0,63	0,39	1	0,50
4	ácido cafeoil hexárico 3	0,72	0,89	0,11	0,83	0,27	0,17	0,80	0,53	1	0,28
5	ácido cafeoil hexárico 4	0,74	0,37	0,73	0,70	0,08	0,32	0,53	0,39	1	0,32
6	ácido cafeoil hexárico 5	0,32	0,61	0,88	0,73	0,36	0,28	0,58	0,39	1	0,35
7	ácido neoclorogênico	0,09	0,27	0,17	0,69	0,36	0,28	0,74	0,85	0,85	0,17
8	ácido cafeoil hexárico 6	0,88	0,56	0,36	0,77	0,40	0,22	0,91	0,48	0,97	0,11
9	N,I,2	0,30	0,76	0,23	0,41	0,10	0,91	0,68	0,25	0,97	0,021 04
10	N,I,3	0,59	0,87	-	0,09	0,16	0,18	0,50	-	0,83	0,32
11	ácido gentísico	0,79	0,42	0,85	0,57	0,35	0,66	0,78	0,45	0,97	0,49
12	N,I,4	0,55	0,73	0,54	0,70	0,67	0,74	0,63	0,82	0,63	0,32
13	ácido clorogênico	0,13	0,85	0,46	0,81	0,63	0,74	0,80	0,35	0,68	0,74
14	isômero ác, clorogênico	0,17	0,13	0,13	0,78	0,13	0,28	0,91	1	0,08	0,53
15	ácido cafeico	0,36	0,06	0,07	0,13	0,46	0,74	0,08	0,28	0,80	1
16	derivado de feruloil	0,49	0,76	0,92	0,72	0,54	0,82	0,24	0,30	0,96	0,57
17	isômero ác, feruloil quínico	0,63	-	0,07	-	-	0,93	-	0,08	-	-
18	N,I,5	0,63	-	0,46	-	-	0,93	-	0,82	-	-
19	N,I,6	0,07	0,52	0,13	0,32	0,44	0,16	0,21	0,85	0,26	0,16
20	N,I,7	0,16	0,72	0,34	0,85	0,22	0,06	0,74	0,85	0,68	0,48
21	N,I,8	0,63	-	0,07	-	-	0,93	-	0,08	-	-
22	N,I,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	N,I,10	0,19	0,12	0,19	0,80	0,54	0,63	0,06	0,53	0,91	0,85
24	Ruti-	0,16	0,182	0,94	0,51	0,32	0,35	0,91	0,88	0,97	0,63
25	N,I,11	0,39	0,062	0,67	0,67	0,65	0,74	0,05	0,80	0,35	0,85
26	tirami- cumaroil	0,34	0,12	0,13	0,71	0,75	0,39	0,63	1	0,91	0,85
27	campferol 3-O-rutinosídeo	0,03	0,87	0,66	0,12	0,85	0,74	0,06	0,35	0,44	0,91
28	tirami- feruloil	0,53	0,77	0,21	0,95	0,79	0,68	0,31	0,19	0,94	0,57
29	N,I,12	0,85	0,86	0,82	0,68	0,98	0,72	0,30	0,28	0,97	0,44
30	N,I,13	0,05	0,64	0,58	0,30	0,83	0,91	0,65	0,97	0,91	0,38
31	N,I,14	0,21	0,20	0,79	0,52	0,34	0,91	0,39	0,63	0,85	0,74
32	N,I,15	-	0,62	0,31	0,77	0,84	-	0,90	0,51	0,71	0,55
33	N,I,16	0,03	0,26	0,52	0,36	0,69	1	0,97	0,21	0,32	0,52
34	N,I,17	0,71	0,83	0,72	0,32	0,40	1	0,58	0,33	0,62	0,19
35	N,I,18	0,78	0,66	-	0,99	-	0,15	0,49	-	0,56	-

DAI = dias após a inoculação

Tabela II.4. Valores de *p* referentes ao teste de homocedasticidade realizado através do teste de Bartlett e de Wilcoxon para a análise de CLAE-EM-EM para a espécie *S. lycopersicum* 'VFNT' para os grupos T e I. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

	DAI	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
Nº	Provável subst.	Homocedasticidade					Teste de Wilcoxon				
1	ácido cafeoil hexárico 1	0,53	0,56	0,48	0,95	0,42	0,11	1	0,04	0,44	0,44
2	N,I,1	0,62	0,86	0,36	0,92	0,87	0,08	0,91	0,05	0,39	0,53
3	ácido cafeoil hexárico 2	0,50	0,80	0,61	0,98	0,85	0,14	0,85	0,02	0,44	0,53
4	ácido cafeoil hexárico 3	0,60	0,98	0,53	0,97	0,94	0,06	0,91	0,06	0,38	0,74
5	ácido cafeoil hexárico 4	0,68	0,35	0,36	0,78	0,26	0,32	1	0,05	0,39	0,28
6	ácido cafeoil hexárico 5	0,89	0,59	0,23	0,78	0,55	0,23	0,97	0,12	0,35	0,14
7	ácido neoclorogênico	0,38	0,88	0,23	0,74	0,72	0,09	0,14	0,09	0,28	0,68
8	ácido cafeoil hexárico 6	0,29	0,99	0,25	0,73	0,82	0,03	0,58	0,08	0,35	0,97
9	N,I,2	0,51	0,66	0,15	0,40	0,65	0,15	0,74	0,12	0,39	0,28
10	N,I,3	0,85	0,32	-	-	0,81	0,05	0,11	-	-	0,39
11	ácido gentísico	0,34	0,36	0,60	0,39	0,71	0,15	0,94	0,46	0,21	0,57
12	N,I,4	0,37	0,06	0,18	0,44	0,64	0,91	0,11	0,53	0,28	1
13	ácido clorogênico	0,97	0,64	0,87	0,16	0,75	0,14	0,91	0,14	0,22	0,97
14	isômero ác, clorogênico	0,56	0,36	0,50	0,39	0,05	0,74	0,91	0,22	0,14	0,14
15	ácido cafeico	0,16	0,61	0,94	0,82	0,46	0,85	0,74	0,44	0,91	0,88
16	derivado de feruloil	0,64	0,77	0,91	0,84	0,66	0,42	0,82	0,09	0,82	0,78
17	isômero ác, feruloil quínico	-	0,36	0,44	0,36	-	-	0,21	0,48	0,73	-
18	N,I,5	-	0,38	0,83	0,06	-	-	0,21	0,62	0,11	-
19	N,I,6	0,88	0,56	0,14	0,50	0,11	0,16	0,21	0,91	0,53	0,32
20	N,I,7	0,75	0,07	0,34	0,95	0,39	0,14	0,11	0,391	0,48	0,11
21	N,I,8	-	0,36	0,44	0,36	-	-	0,21	0,48	0,73	-
22	N,I,9	0,64	0,05	0,40	0,11	0,51	0,91	0,22	1	0,22	0,80
23	N,I,10	0,11	0,75	0,79	0,46	0,25	0,12	0,25	0,41	0,34	0,44
24	Ruti-	0,50	0,18	0,22	0,28	0,56	0,97	0,25	1	0,226	0,68
25	N,I,11	0,70	0,41	0,81	0,17	0,93	0,91	0,91	0,85	0,39	0,91
26	tirami- cumaroil	0,05	0,12	0,13	0,96	0,54	0,58	1	0,91	0,91	0,35
27	campferol 3-O-rutinosídeo	0,75	0,96	0,66	0,29	0,82	0,02	0,38	0,08	0,97	0,85
28	tirami- feruloil	-	0,89	0,26	0,72	0,96	-	0,61	0,43	1	0,69
29	N,I,12	0,05	0,92	0,06	0,06	0,27	0,32	0,50	0,97	0,97	0,32
30	N,I,13	0,21	0,46	0,81	0,65	0,05	0,63	0,22	0,17	0,31	0,97
31	N,I,14	-	0,41	0,44	0,61	0,64	-	0,35	1	0,40	0,61
32	N,I,15	-	0,36	0,44	0,36	-	-	0,21	0,48	0,73	-
33	N,I,16	0,87	0,24	0,14	0,72	0,87	0,97	1	0,43	0,37	0,621
34	N,I,17	0,71	0,21	0,39	0,79	0,13	0,53	0,63	0,19	0,05	0,271
35	N,I,18	0,78	0,80	-	-	-	0,91	0,63	-	-	-

DAI = dias após a inoculação

Tabela II.5. Valores de p referentes ao teste de homocedasticidade realizado através do teste de Bartlett para a análise de CG-EM para a espécie *S. pimpinellifolium*. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

	DAI	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
	Prov. subst.	Controle-Tampão					Tampão-Infectadas				
36	Glicerol	0,25	0,20	-	0,04	-	0,89	0,55	-	0,25	0,47
37	Treonina	0,24	0,44	0,75	0,12	0,95	0,76	0,08	0,38	0,43	0,52
38	Glicina	0,38	0,45	0,68	0,11	-	0,54	0,12		0,68	-
39	Succinato	0,99	-	0,86	-	-	0,53	0,41	0,23	0,56	-
40	Glicerato	0,30	0,35	0,44	0,07	0,43	0,93	0,89	0,39	0,90	-
41	Aspartato	0,10	0,38	0,48	0,28	-	0,06	0,87	0,24	0,57	0,07
42	Malato	0,93	0,71	0,79	0,73	0,05	0,24	0,43	0,13	0,29	0,35
43	5-Oxoprolina	0,56	0,50	0,09	0,17	0,37	0,16	0,75	0,38	0,16	0,50
44	GABA	0,19	0,10	0,79	0,79	0,76	0,27	0,41	-	0,79	0,26
45	Glutamato	0,59	-	0,22	0,41	0,15	0,60	0,08	0,23	0,54	0,61
47	N.I.1	-	0,33	0,96	-	0,75	-	-	0,73	-	0,05
48	N.I.2	0,91	0,23	0,88	0,83	0,82	0,22	0,12	0,62	0,88	0,67
49	N.I.3	0,96	0,41	0,57	0,08	0,16	0,65	0,79	0,91	0,56	0,73
50	Chiquimato	0,94	-	0,37	-	0,20	0,45	-	0,62	-	-
51	Citrato	0,92	0,18	0,17	0,70	0,58	0,22	0,36	0,50	0,27	0,12
52	2-cetoglutarato	-	0,06	0,56	-	-	-	-	0,32	-	-
53	Quinato	0,31	0,04	0,43	0,52	0,73	0,59	0,16	0,18	0,16	0,57
54	Frutose 1	0,58	0,91	0,35	0,15	0,04	0,46	0,56	0,08	0,14	0,46
55	Frutose 2	0,58	0,99	0,27	0,17	0,06	0,44	0,62	0,16	0,08	0,44
56	Glicose 1	0,49	0,70	0,57	0,55	0,04	0,91	0,59	0,19	0,06	0,07
57	Glicose 2	0,99	0,62	0,76	0,14	0,20	0,92	0,90	0,61	0,50	0,99
59	2-ceto-gluconato	-	-	0,17	-	0,66	-	-	0,13	-	-
60	Glucarato	-	0,06	0,89	0,89	0,50	-	0,17	-	-	-
61	Inositol	0,37	0,37	0,96	0,07	0,12	0,88	0,08	0,47	0,20	0,87
63	Galactose	0,63	0,22	0,60	0,91	0,52	0,32	0,70	0,86	0,66	0,22
64	Sacarose	0,08	0,89	0,22	0,43	0,24	0,41	0,99	0,06	0,53	0,90

DAI = dias após a inoculação

Tabela II.6. Valores de *p* referentes ao teste de Wilcoxon para a análise de CG-EM para a espécie *S. pimpinellifolium*. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

	DAI	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Controle-Tampão					Tampão-Infectadas				
36	Glicerol	0,91	0,68	0,17	0,01	4,9.10 ⁻³	0,48	0,05	-	0,96	0,05
37	Treonina	0,09	0,21	1	0,52	0,59	0,13	0,02	0,03	0,87	0,22
38	Glicina	0,62	0,61	0,34	0,12	0,37	0,09	0,16	0,57	0,01	4,9.10 ⁻³
39	Succinato	0,84	0,14	1	0,37	0,37	0,73	0,33	0,87	1	0,04
40	Glicerato	0,90	0,31	0,59	0,02	0,51	0,54	0,04	0,97	0,06	0,01
41	Aspartato	0,29	0,79	0,15	0,61	6,3.10 ⁻³	0,97	0,21	4,8.10 ⁻³	3,6.10 ⁻³	0,02
42	Malato	0,68	0,85	0,53	0,14	0,57	0,09	0,85	0,22	1,5.10 ⁻³	3,2.10 ⁻⁴
43	5-Oxoprolina	0,02	0,20	0,32	0,17	0,81	0,91	0,19	0,25	3,2.10 ⁻⁴	5,3.10 ⁻⁴
44	GABA	0,85	0,34	0,77	0,22	0,62	0,16	0,05	0,15	0,71	0,53
45	Glutamato	1	NA	0,35	0,22	NA	0,85	-	0,02	0,62	1,9.10 ⁻³
47	N,I,1	NA	0,96	NA	NA	NA	-	-	0,35	NA	0,28
48	N,I,2	0,55	0,03	0,85	0,02	0,52	0,05	0,91	0,06	0,47	0,05
49	N,I,3	0,25	0,02	0,97	0,02	0,68	0,03	0,09	0,08	0,17	0,06
50	Chiquimato	0,67	0,23	0,62	0,37	0,50	1	0,2343	0,65	0,17	0,15
51	Citrato	0,52	0,05	0,22	0,25	0,24	0,31	2,9.10 ⁻³	0,58	2,1.10 ⁻⁴	2,9.10 ⁻³
52	2-cetoglutaratato	NA	0,50	1	NA	NA	-	0,37	0,97	-	0,08
53	Quinato	0,48	0,19	0,852	9,1.10 ⁻³	0,24	0,04	0,43	0,58	4,6.10 ⁻³	0,07
54	Frutose 1	0,85	0,17	0,91	0,08	0,09	0,48	0,58	0,06	0,63	0,10
55	Frutose 2	0,85	0,19	0,912	0,06	0,09	0,44	0,35	0,19	0,74	0,12
56	Glicose 1	0,97	0,05	1	0,02	0,06	0,14	0,19	0,01	0,80	0,85
57	Glicose 2	0,34	0,52	1	0,02	0,03	0,08	0,32	0,36	0,68	0,76
59	2-ceto-gluconato	0,37	0,17	0,80	NA	1	0,37	-	0,33	-	0,39
60	Glucarato	0,03	0,96	1	0,93	0,14	-	0,24	9,1.10 ⁻³	0,08	0,10
61	Inositol	0,48	0,32	0,53	0,44	0,12	0,02	0,04	0,28	0,06	0,06
63	Galactose	0,38	0,58	0,53	1	0,57	0,58	0,04	0,02	0,53	0,97
64	Sacarose	0,12	0,01	0,22	0,09	0,16	0,82	0,08	0,25	0,06	0,53

DAI = dias após a inoculação

Tabela II.7. Valores de *p* referentes ao teste de homocedasticidade realizado através do teste de Bartlett para a espécie *S. lycopersicum* 'VFNT' para a análise por CG-EM. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

	DAI	1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Provável Subst	Controle-Tampão					Tampão-Infectadas				
36	Glicerol	0,55	0,93	0,78	0,78	0,04	0,22	-	0,16	0,57	0,19
37	Treonina	0,88	-	0,31	-	-	0,12	-	0,07	-	-
38	Glicina	0,69	-	0,87	0,61	0,15	0,98	-	0,94	-	0,12
39	Succinato	0,53	-	0,63	-	0,16	0,98	-	0,76	-	0,28
40	Glicerato	0,84	0,46	0,61	0,16	0,18	0,47	-	0,97	0,82	0,77
41	Aspartato	0,38	-	0,99	-	0,37	0,29	-	0,47	-	-
42	Malato	0,30	0,40	0,08	0,80	0,26	0,59	0,76	0,22	0,76	0,44
43	5-Oxoprolina	0,68	0,33	0,31	0,16	0,51	0,11	0,69	0,85	0,67	0,09
44	GABA	-	-	0,42	0,19	0,21	-	0,29	0,29	0,90	0,64
45	Glutamato	0,35	-	0,20	0,75	0,53	0,69	0,25	0,72	0,15	0,72
47	N.I.1	0,54	-	0,17	-	0,55	0,58	-	0,45	-	0,96
48	N.I.2	0,96	0,91	0,06	0,74	0,13	0,20	0,37	0,24	0,40	0,70
49	N.I.3	0,28	0,39	0,28	0,42	0,19	0,05	0,08	0,79	0,15	0,37
50	Chiquimato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	Citrato	0,06	0,40	0,06	0,18	0,13	0,57	0,15	0,39	0,90	0,87
52	2-cetoglutarato	-	0,51	0,95	0,43	0,03	-	0,83	0,44	0,20	0,97
53	Quinato	0,81	0,38	0,32	0,05	0,10	0,09	0,70	0,17	0,17	0,27
54	Frutose 1	0,09	0,33	0,10	0,46	0,13	0,24	0,61	0,52	0,02	0,21
55	Frutose 2	0,09	0,30	0,10	0,46	0,10	0,23	0,55	0,12	0,10	0,26
56	Glicose 1	0,22	0,27	0,20	0,47	0,37	0,17	0,48	0,77	0,65	0,11
57	Glicose 2	0,72	0,49	0,34	0,25	0,07	0,05	0,61	0,81	0,66	0,52
58	Tirosina	-	-	-	-	0,38	-	0,81	-	-	0,84
59	2-ceto-gluconato	0,15	-	0,08	-	0,22	-	0,13	-	-	0,22
60	Glucarato	-	-	-	-	-	-	0,69	-	-	-
61	Palmitato	-	-	-	-	0,21	-	-	-	0,11	0,57
62	Inositol	0,34	0,36	0,87	0,36	0,43	0,08	0,97	0,34	0,25	0,46
63	Galactose	0,23	0,56	0,36	0,55	0,20	0,54	0,60	0,56	0,84	0,15
64	Sacarose	0,27	0,38	0,19	0,93	0,85	0,07	0,78	0,69	0,44	0,07

DAI = dias após a inoculação

Tabela II.8. Valores de *p* referentes ao teste de Wilcoxon para a análise de CG-EM para a espécie *S. lycopersicum* "VFNT". Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

DAI		1	7	14	21	28	1	7	14	21	28
Nº	Subst.	Valores de p (C e T)					Valores de p (T e I)				
36	Glicerol	0,01	0,73	0,62	0,38	0,24	0,20	NA	0,52	0,48	0,04
37	Treonina	0,73	NA	0,65	NA	0,06	6,3.10 ⁻³	NA	0,41	0,37	NA
38	Glicina	0,52	NA	0,74	0,39	1	0,12	NA	0,44	0,08	0,63
39	Succinato	0,49	NA	0,02	NA	0,81	0,48	NA	1	0,08	0,84
40	Glicerato	0,88	0,11	0,68	0,40	0,39	0,33	NA	0,17	0,38	0,80
41	Aspartato	0,43	0,37	0,35	NA	0,33	0,16	NA	0,65	NA	NA
42	Malato	0,10	0,63	0,73	0,30	0,25	0,85	0,80	0,73	0,36	0,63
43	5-Oxoprolina	0,04	0,02	0,03	0,37	0,63	0,22	0,97	0,12	0,27	0,17
44	GABA	NA	NA	0,11	0,90	0,19	NA	0,74	0,31	0,04	0,80
45	Glutamato	4,2.10 ⁻⁴	NA	0,37	0,90	0,91	0,91	0,63	0,49	0,44	0,15
47	N.I.1	0,91	-	0,31	-	0,57	0,30	NA	0,09	NA	0,85
48	N.I.2	0,80	0,85	0,25	0,76	0,91	0,43	0,73	0,97	0,82	0,09
49	N.I.3	0,97	0,74	0,97	0,65	0,91	0,62	0,91	0,39	0,65	0,80
50	Chiquimato	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
51	Citrato	0,34	0,19	0,73	0,66	0,85	0,4212	0,28	1	0,24	0,73
52	2-cetoglutarato	2,8.10 ⁻⁴	1,0.10 ⁻³	0,18	0,61	0,25	NA	0,17	1	0,05	0,91
53	Quinato	3,2.10 ⁻⁴	0,04	0,27	0,51	0,44	0,04	1	0,79	0,02	0,12
54	Frutose 1	0,80	0,91	0,09	0,03	0,48	0,31	0,80	0,40	0,02	0,28
55	Frutose 2	0,80	0,97	0,08	0,03	0,48	0,31	0,74	0,22	0,01	0,19
56	Glicose 1	0,53	0,44	0,12	0,03	0,97	0,62	0,80	0,49	0,02	0,53
57	Glicose 2	0,22	0,12	0,10	0,11	0,91	0,12	0,48	0,42	5,0.10 ⁻³	0,38
58	Tirosina	NA	NA	NA	0,17	0,76	NA	0,40	NA	0,20	0,55
59	2-ceto-gluconato	6,0.10 ⁻⁴	0,01	0,88	0,37	0,58	NA	0,55	NA	4,9.10 ⁻³	0,04
60	Glucarato	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA	0,37	NA
61	Palmitato	NA	NA	NA	0,03	0,20	NA	NA	NA	0,02	1
62	Inositol	2,1.10 ⁻⁴	0,04	0,24	0,65	0,74	0,62	0,14	0,76	6,3.10 ⁻³	0,08
63	Galactose	NA	1	0,06	0,52	0,68	0,17	0,91	2,1.10 ⁻³	0,47	0,97
64	Sacarose	2,1.10 ⁻⁴	0,43	0,97	0,13	0,22	0,34	0,97	0,82	9,9.10 ⁻³	0,05

DAI = dias após a inoculação.

Tabela II.9. Tempo de retenção, nome da provável substância e fragmentos das substâncias analisadas por CG-EM com abundâncias relativas mostradas em parênteses

Nº do pico	TR (min)	Provável substância	Fragmentos com abundâncias relativas
36	16,62	Glicerol (TMS)	73 (99); 147 (57); 205 (39); 117 (26); 103 (25); 133 (17); 218 (14); 75 (13); 148 (9); 59 (9)
37	17,29	Treonina (TMS)	73 (99); 117 (52); 75 (29); 130 (29); 147 (22); 57 (21); 219 (20); 146 (15); 74 (11); 131 (10)
38	17,55	Glicina (TMS)	174 (99); 73 (54); 147 (25); 175 (18); 248 (16); 86 (13); 133 (9); 59 (8); 100 (8); 176 (8)
39	17,80	Succinato (TMS)	147 (99); 73 (69); 75 (31); 148 (16); 247 (11); 55 (11); 149 (8); 129 (7); 56 (7); 74 (7)
40	18,20	Glicerato (TMS)	73 (99); 147 (51); 189 (30); 292 (20); 103 (18); 133 (17); 75 (12); 205 (10); 117 (10); 74 (9)
41	20,70	Aspartato (TMS)	73 (99); 160 (51); 75 (31); 130 (25); 117 (19); 116 (17); 147 (13); 74 (11); 161 (6); 245 (5)
42	22,24	Malato (TMS)	73 (99); 147 (48); 233 (16); 75 (11); 133 (10); 74 (9); 245 (8); 55 (8); 148 (8); 101 (6)
43	23,09	5 - Oxoprolina (TMS)	156 (99); 73 (60); 147 (16); 157 (14); 75 (8); 230 (8); 258 (8); 74 (5); 158 (4); 59 (3)
44	23,21	GABA (TMS)	174 (99); 73 (66); 147 (26); 175 (18); 304 (18); 75 (14); 86 (11); 59 (10); 176 (8); 74 (6)
45	23,37	Glutamato (TMS)	84 (99); 75 (79); 73 (72); 174 (59); 56 (39); 159 (30); 156 (22); 158 (18); 147 (15); 121 (14)
46	27,60	Ribitol (TMS) - (padrão interno)	73 (99); 217 (47); 147 (37); 103 (32); 205 (27); 319 (17); 129 (15); 218 (13); 204 (11); 307 (11)
47	27,83	N.I. 1 (TMS)	73 (99); 133 (19); 89 (18); 147 (14); 75 (12); 59 (10); 74 (9); 392 (9); 172 (9); 217 (7)
48	27,90	N.I. 2 (TMS)	73 (99); 89 (20); 147 (16); 75 (12); 392 (12); 59 (10); 74 (9); 133 (7); 103 (7); 163 (6)
49	28,45	N.I. 3 (TMS)	73 (99); 89 (16); 147 (16); 392 (11); 75 (9); 59 (9); 74 (8); 109 (7); 276 (6); 133 (5)
50	29,51	Chiquimato (TMS)	73 (99); 204 (99); 147 (27); 205 (19); 75 (15); 74 (9); 206 (8); 133 (6); 255 (5); 148 (4)
51	29,65	Citrato (TMS)	79 (99); 147 (51); 273 (48); 75 (15); 274 (11); 363 (10); 74 (9); 347 (9); 149 (8); 148 (8)
52	30,23	2-cetoglutarato (TMS)	73 (99); 173 (29); 157 (28); 55 (23); 147 (20); 75 (18); 316 (13); 245 (10); 74 (9); 129 (9)
53	30,39	Quinato (TMS)	73 (99); 345 (54); 147 (38); 255 (22); 346 (18); 204 (10); 75 (9); 191 (9); 347 (8); 74 (8)
54	30,674	Frutose, O-metiloxima (TMS)	73 (99); 103 (70); 217 (48); 307 (37); 147 (29); 133 (11); 308 (10); 218 (10); 74 (9); 277 (8)
55	30,862	Frutose, O-metiloxima (TMS)	73 (99); 103 (60); 217 (42); 307 (31); 147 (30); 218 (9); 308 (9); 74 (9); 133 (7); 277 (6)

Continua Tabela II.9

Continuação Tabela II.9

Nº do pico	TR (min)	Provável substância	Fragmentos com abundâncias relativas
56	31.168	Glicose, O-metoxima, (1E)- (TMS)	73 (99); 319 (53); 205 (48); 147 (36); 160 (28); 217 (18); 320 (16); 103 (15); 206 (9); 117 (9)
57	31.537	Glicose, O-metoxima, (1Z)- (TMS)	73 (99); 205 (34); 319 (34); 147 (29); 103 (20); 160 (17); 217 (12); 320 (10); 74 (9); 133 (8)
58	32.095	Tirosina (TMS)	218 99 73 80 219 20 147 12 179 12 280 11 75 10 100 10 220 9 74 8
59	33.085	2-ceto-gluconato (TMS)	73 (99); 147 (35); 292 (26); 217 (20); 205 (18); 319 (15); 103 (14); 305 (10); 75 (9); 74 (9)
60	33.372	Glucarato (TMS)	73 (99); 333 (30); 147 (29); 292 (14); 75 (12); 74 (9); 334 (9); 305 (5); 217 (5); 335 (5)
61	34.214	Palmitato (TMS)	73 (99); 117 (91); 75 (78); 313 (49); 132 (45); 129 (41); 55 (26); 145 (26); 57 (14); 314 (13)
62	34.859	Inositol (TMS)	73 (99); 217 (60); 147 (50); 305 (47); 191 (32); 318 (26); 204 (14); 306 (13); 265 (12); 218 (12)
63	35.203	Galactose, O-metiloxima, (1E)- (TMS)	73 (99); 319 (45); 205 (32); 147 (30); 103 (17); 217 (14); 320 (13); 75 (11); 74 (9); 117 (7)
64	43.785	Sacarose (TMS)	73 (99); 361 (56); 217 (42); 147 (28); 103 (21); 362 (18); 129 (15); 218 (10); 437 (10); 169 (10)
TR = tempo de retenção; DAI = dias após a inoculação.			Conclusão Tabela II.9

Tabela II.10. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CLAE-EM-EM referente ao grupo Controle da espécie *S. pimpinellifolium*.

		DAI	1	7	14	21	28
Nº subst.	Provável subst.	Controle					
1	ácido cafeoil hexárico 1	294,6 $\pm$ 117,5	332,5 $\pm$ 88,4	418,7 $\pm$ 130,2	392,0 $\pm$ 124,1	214,9 $\pm$ 100,1	
2	N.I.1	424,2 $\pm$ 161,7	496,8 $\pm$ 140,5	626,0 $\pm$ 190,6	586,3 $\pm$ 188,5	324,6 $\pm$ 159,4	
3	ácido cafeoil hexárico 2	703,9 $\pm$ 167,0	761,3 $\pm$ 113,6	1020,9 $\pm$ 140,9	933,8 $\pm$ 219,0	594,5 $\pm$ 239,4	
4	ácido cafeoil hexárico 3	1161,6 $\pm$ 259,4	1331,3 $\pm$ 249,4	1765,7 $\pm$ 254,3	1644,4 $\pm$ 423,9	1059,9 $\pm$ 421,9	
5	ácido cafeoil hexárico 4	676,8 $\pm$ 210,2	682,8 $\pm$ 139,1	872,9 $\pm$ 153,2	768,0 $\pm$ 176,7	505,0 $\pm$ 184,6	
6	ácido cafeoil hexárico 5	1172,5 $\pm$ 350,3	1222,4 $\pm$ 244,6	1541,5 $\pm$ 235,3	1375,9 $\pm$ 321,0	891,3 $\pm$ 346,6	
7	ácido neoclorogênico	512,1 $\pm$ 114,5	512,8 $\pm$ 123,2	974,9 $\pm$ 147,9	864,5 $\pm$ 231,5	584,3 $\pm$ 249,9	
8	ácido cafeoil hexárico 6	1018,4 $\pm$ 221,5	1112,5 $\pm$ 280,8	2067,9 $\pm$ 267,1	1911,0 $\pm$ 536,1	1300,5 $\pm$ 540,2	
9	N.I.2	71,5 $\pm$ 38,2	67,6 $\pm$ 35,9	92,6 $\pm$ 6,5	81,9 $\pm$ 36,3	23,9 $\pm$ 38,5	
10	N.I.3	-	32,9 $\pm$ 42,6	88,4 $\pm$ 43,5	95,6 $\pm$ 54,4	71,5 $\pm$ 38,0	
11	ácido gentísico	40,0 $\pm$ 44,8	74,6 $\pm$ 41,5	133,3 $\pm$ 28,6	148,7 $\pm$ 100,6	83,7 $\pm$ 47,2	
12	N.I.4	-	102,3 $\pm$ 95,9	51,4 $\pm$ 57,1	93,5 $\pm$ 64,8	57,8 $\pm$ 51,0	
13	ácido clorogênico	852,9 $\pm$ 327,5	1195,5 $\pm$ 204,6	1782,8 $\pm$ 639,1	1527,8 $\pm$ 1001,5	1083,1 $\pm$ 699,0	
14	isômero ác. Clorogênico	-	10,5 $\pm$ 33,2	52,5 $\pm$ 58,3	75,7 $\pm$ 136,0	50,8 $\pm$ 68,4	
15	ácido cafeico	111,1 $\pm$ 53,2	153,1 $\pm$ 30,2	122,2 $\pm$ 25,9	112,0 $\pm$ 45,8	93,6 $\pm$ 35,7	
16	derivado de feruloil	8,2 $\pm$ 26,0	7,4 $\pm$ 23,4	66,7 $\pm$ 63,9	50,3 $\pm$ 53,9	90,8 $\pm$ 51,8	
17	isômero ác. feruloil quínico	10,7 $\pm$ 33,8	44,5 $\pm$ 47,0	100,4 $\pm$ 82,5	139,1 $\pm$ 30,6	74,4 $\pm$ 55,9	
18	N.I.5	9,0 $\pm$ 28,4	8,3 $\pm$ 26,4	63,1 $\pm$ 61,7	48,5 $\pm$ 64,6	27,9 $\pm$ 47,1	
19	N.I.6	22,5 $\pm$ 47,4	155,1 $\pm$ 51,6	115,8 $\pm$ 69,5	222,7 $\pm$ 72,4	183,2 $\pm$ 133,2	
20	N.I.7	38,4 $\pm$ 49,7	154,8 $\pm$ 55,4	233,1 $\pm$ 123,4	176,6 $\pm$ 50,9	254,6 $\pm$ 155,7	
21	N.I.8	-	74,8 $\pm$ 41,4	82,8 $\pm$ 60,4	67,3 $\pm$ 48,8	86,1 $\pm$ 66,2	
22	N.I.9	-	-	-	-	-	

Continua Tabela II.10

Continuação Tabela II.10

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Controle				
23	N.I.10	45,2±58,5	92,5±4,7	144,4±23,0	133,0±26,5	80,9±45,8
24	Rutina	-	43,7±58,8	83,8±69,1	116,7±55,5	127,4±77,1
25	N.I.11	124,5±31,0	77,4±59,2	71,0±62,8	88,0±66,5	104,4±41,0
26	tiramina cumaroil	21,7±45,8	143,2±33,7	92,4±52,3	124,8±52,3	90,4±50,8
27	campferol 3-O-rutinosídeo	95,7±40,2	180,0±52,0	196,0±83,3	185,6±84,4	209,7±110,3
28	tiramina feruloil	-	-	-	-	69,3±60,9
29	N.I.12	-	127,6±80,4	206,1±122,0	351,4±138,3	288,6±179,4
30	N.I.13	40,9±53,2	205,2±98,6	322,3±170,8	470,2±156,9	449,4±203,0
31	N.I.14	-	-	-	-	38,8±41,0
32	N.I.15	-	-	27,9±45,2	45,2±39,2	37,1±39,3
33	N.I.16	111,6±22,3	116,0±12,7	121,2±17,9	111,0±12,6	87,9±31,9
34	N.I.17	32,4±41,8	54,9±37,9	50,2±34,8	50,0±35,0	56,6±39,8
35	N.I.18	49,0±42,2	47,7±41,0	29,7±38,3	29,3±38,3	28,6±37,0

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.10

Tabela II.11. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CLAE-EM-EM referente ao grupo Tampão da espécie *S. pimpinellifolium*.

		DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Tampão					
1	ácido cafeoil hexárico 1	337,3 $\pm$ 109,5	423,7 $\pm$ 140,2	335,3 $\pm$ 103,1	285,8 $\pm$ 86,8	253,9 $\pm$ 80,8	
2	N.I.1	502,8 $\pm$ 179,1	636,6 $\pm$ 212,9	516,0 $\pm$ 161,7	448,9 $\pm$ 141,6	382,2 $\pm$ 117,8	
3	ácido cafeoil hexárico 2	796,7 $\pm$ 145,6	1010,6 $\pm$ 236,1	822,3 $\pm$ 155,9	671,6 $\pm$ 148,2	683,6 $\pm$ 127,1	
4	ácido cafeoil hexárico 3	1377,3 $\pm$ 314,9	1733,4 $\pm$ 409,3	1482,1 $\pm$ 297,1	1263,1 $\pm$ 313,6	1168,9 $\pm$ 242,1	
5	ácido cafeoil hexárico 4	760,5 $\pm$ 159,8	880,5 $\pm$ 233,6	631,5 $\pm$ 111,1	533,0 $\pm$ 101,7	598,7 $\pm$ 61,7	
6	ácido cafeoil hexárico 5	1385,6 $\pm$ 326,4	1562,8 $\pm$ 417,3	1171,5 $\pm$ 236,1	1040,4 $\pm$ 226,9	1070,1 $\pm$ 172,7	
7	ácido neoclorogênico	568,1 $\pm$ 132,3	788,0 $\pm$ 201,7	700,8 $\pm$ 122,5	550,0 $\pm$ 159,9	714,8 $\pm$ 126,1	
8	ácido cafeoil hexárico 6	1236,6 $\pm$ 318,8	1690,9 $\pm$ 434,3	1590,4 $\pm$ 282,0	1345,8 $\pm$ 426,9	1518,0 $\pm$ 302,9	
9	N.I.2	64,6 $\pm$ 64,2	112,1 $\pm$ 32,1	87,0 $\pm$ 7,4	46,8 $\pm$ 40,4	8,8 $\pm$ 27,9	
10	N.I.3	7,8 $\pm$ 24,8	59,9 $\pm$ 41,5	7,6 $\pm$ 24,0	17,7 $\pm$ 37,5	101,6 $\pm$ 30,6	
11	ácido gentísico	37,9 $\pm$ 49,3	79,6 $\pm$ 42,9	54,8 $\pm$ 47,7	50,8 $\pm$ 54,3	148,2 $\pm$ 40,4	
12	N.I.4	43,8 $\pm$ 76,7	96,3 $\pm$ 56,3	131,6 $\pm$ 31,4	73,3 $\pm$ 54,4	40,9 $\pm$ 55,7	
13	ácido clorogênico	1074,0 $\pm$ 524,2	1596,3 $\pm$ 327,3	705,7 $\pm$ 216,6	696,1 $\pm$ 583,4	1851,3 $\pm$ 946,5	
14	isômero ác. clorogênico	66,2 $\pm$ 72,2	32,5 $\pm$ 52,8	-	-	21,6 $\pm$ 46,5	
15	ácido cafeico	103,1 $\pm$ 57,2	135,2 $\pm$ 33,9	80,0 $\pm$ 30,0	73,5 $\pm$ 39,5	120,0 $\pm$ 25,4	
16	derivado de feruloil	16,5 $\pm$ 34,9	125,5 $\pm$ 29,6	147,3 $\pm$ 60,2	42,1 $\pm$ 55,0	28,1 $\pm$ 46,1	
17	isômero ác. feruloil quínico	19,2 $\pm$ 41,0	111,2 $\pm$ 26,8	91,8 $\pm$ 6,3	114,1 $\pm$ 26,8	108,3 $\pm$ 62,9	
18	N.I.5	7,8 $\pm$ 24,8	26,8 $\pm$ 43,4	-	10,7 $\pm$ 33,9	88,6 $\pm$ 71,7	
19	N.I.6	84,4 $\pm$ 61,6	136,9 $\pm$ 18,6	127,5 $\pm$ 23,4	119,3 $\pm$ 93,9	308,3 $\pm$ 151,5	
20	N.I.7	68,4 $\pm$ 61,1	172,2 $\pm$ 45,3	113,4 $\pm$ 12,4	124,0 $\pm$ 67,4	402,6 $\pm$ 142,1	
21	N.I.8	8,6 $\pm$ 27,2	117,1 $\pm$ 22,0	24,4 $\pm$ 39,3	13,0 $\pm$ 41,3	150,2 $\pm$ 26,6	

Continua Tabela II.11

Continuação Tabela II.11

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Tampão				
22	N.I.9	-	-	-	-	-
23	N.I.10	75,0±68,5	150,0±23,7	107,3±23,8	106,4±24,4	123,6±34,9
24	Rutina	-	41,0±44,3	99,4±27,7	151,9±50,0	171,0±51,1
25	N.I.11	108,6±24,2	97,7±41,4	64,5±56,4	93,7±55,8	117,6±16,8
26	tiramina cumaroil	193,5±106,4	124,1±12,2	109,1±18,0	39,8±68,3	93,9±52,1
27	campferol 3-O-rutinosídeo	257,2±98,5	218,1±19,4	189,8±25,5	93,1±110,0	285,2±87,9
28	tiramina feruloil	-	-	-	45,1±60,3	144,6±36,7
29	N.I.12	-	145,6±51,5	127,9±55,2	260,3±156,8	590,2±168,0
30	N.I.13	58,9±52,3	196,9±31,9	298,1±68,7	518,1±177,8	711,8±108,7
31	N.I.14	9,4±29,6	-	-	63,0±34,1	78,8±32,5
32	N.I.15	8,5±26,9	16,3±34,4	73,9±27,9	8,6±27,3	55,0±39,3
33	N.I.16	123,9±15,4	120,6±23,7	108,8±12,0	102,0±10,8	95,8±8,9
34	N.I.17	56,3±39,0	55,1±38,0	55,9±39,7	55,0±38,6	56,3±39,9
35	N.I.18	24,1±38,9	22,2±35,8	43,9±37,9	41,4±45,4	40,9±43,7

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.11

Tabela II.12. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CLAE-EM-EM referente ao grupo Infectadas da espécie *S. pimpinellifolium*.

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Infectadas				
1	ácido cafeoil hexárico 1	323,6 $\pm$ 113,2	442,2 $\pm$ 100,4	444,5 $\pm$ 143,0	310,1 $\pm$ 170,8	325,3 $\pm$ 131,1
2	N.I.1	486,9 $\pm$ 150,8	666,3 $\pm$ 119,7	660,8 $\pm$ 202,2	448,9 $\pm$ 242,7	477,9 $\pm$ 162,8
3	ácido cafeoil hexárico 2	811,8 $\pm$ 133,0	986,2 $\pm$ 144,8	1044,5 $\pm$ 214,9	698,2 $\pm$ 331,5	781,6 $\pm$ 154,4
4	ácido cafeoil hexárico 3	1429,2 $\pm$ 266,7	1745,8 $\pm$ 257,8	1787,3 $\pm$ 349,5	1187,6 $\pm$ 538,4	1318,5 $\pm$ 210,0
5	ácido cafeoil hexárico 4	764,4 $\pm$ 133,0	923,5 $\pm$ 200,0	921,5 $\pm$ 258,6	657,5 $\pm$ 329,7	721,7 $\pm$ 218,1
6	ácido cafeoil hexárico 5	1429,2 $\pm$ 266,7	1677,9 $\pm$ 309,3	1593,4 $\pm$ 430,2	1136,3 $\pm$ 543,3	1228,1 $\pm$ 316,1
7	ácido neoclorogênico	644,3 $\pm$ 140,3	769,3 $\pm$ 128,1	985,8 $\pm$ 179,9	779,8 $\pm$ 401,6	876,0 $\pm$ 241,0
8	ácido cafeoil hexárico 6	1401,4 $\pm$ 301,1	1723,4 $\pm$ 230,6	2060,4 $\pm$ 349,0	1665,4 $\pm$ 790,8	1861,3 $\pm$ 409,3
9	N.I.2	97,4 $\pm$ 15,5	97,8 $\pm$ 6,6	100,2 $\pm$ 8,8	53,1 $\pm$ 46,3	79,1 $\pm$ 30,7
10	N.I.3	7,5 $\pm$ 23,7	30,9 $\pm$ 39,9	39,3 $\pm$ 41,5	16,7 $\pm$ 35,3	91,0 $\pm$ 39,8
11	ácido gentísico	93,9 $\pm$ 44,3	114,9 $\pm$ 30,2	114,9 $\pm$ 26,9	113,9 $\pm$ 57,8	151,6 $\pm$ 46,8
12	N.I.4	64,8 $\pm$ 94,5	-	123,7 $\pm$ 90,0	13,2 $\pm$ 41,6	83,0 $\pm$ 59,2
13	ácido clorogênico	1513,1 $\pm$ 414,0	2820,1 $\pm$ 886,9	6602,2 $\pm$ 2823,5	4332,5 $\pm$ 3372,1	4698,8 $\pm$ 2757,3
14	isômero ác. clorogênico	64,6 $\pm$ 56,4	69,7 $\pm$ 66,9	299,4 $\pm$ 169,2	305,3 $\pm$ 222,4	368,4 $\pm$ 222,4
15	ácido cafeico	140,9 $\pm$ 37,5	191,1 $\pm$ 27,0	162,2 $\pm$ 42,7	105,6 $\pm$ 70,5	151,4 $\pm$ 40,0
16	derivado de feruloil	61,4 $\pm$ 55,2	-	49,4 $\pm$ 55,2	-	63,5 $\pm$ 87,9
17	isômero ác. feruloil quínico	53,7 $\pm$ 46,6	113,8 $\pm$ 21,0	249,4 $\pm$ 76,8	140,6 $\pm$ 91,4	170,1 $\pm$ 47,6
18	N.I.5	27,5 $\pm$ 44,5	110,2 $\pm$ 15,1	360,6 $\pm$ 137,4	226,1 $\pm$ 103,9	330,3 $\pm$ 148,6
19	N.I.6	59,4 $\pm$ 63,9	79,6 $\pm$ 57,4	238,0 $\pm$ 107,7	21,7 $\pm$ 45,8	162,4 $\pm$ 110,8
20	N.I.7	125,2 $\pm$ 30,7	183,0 $\pm$ 54,4	402,5 $\pm$ 115,8	176,4 $\pm$ 108,5	382,8 $\pm$ 57,1
21	N.I.8	50,5 $\pm$ 53,4	102,5 $\pm$ 42,2	156,3 $\pm$ 32,9	89,4 $\pm$ 54,1	174,4 $\pm$ 61,1

Continua Tabela II.12

Continuação Tabela II.12

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Infectadas				
22	N.I.9	49,7±53,2	-	59,7±52,5	-	82,2±44,3
23	N.I.10	188,8±123,4	174,3±56,7	144,7±27,7	211,5±75,9	265,1±107,0
24	Rutina	-	-	72,6±54,2	86,4±48,4	131,7±47,3
25	N.I.11	87,8±36,7	74,8±54,7	71,4±50,9	53,5±49,1	133,5±37,8
26	tiramina cumaroil	193,0±89,7	65,6±46,2	137,1±26,5	-	86,1±48,8
27	campferol 3-O-rutinosídeo	300,6±66,3	136,8±34,7	350,8±78,7	114,7±68,7	365,0±115,8
28	tiramina feruloil	-	-	-	-	82,5±73,4
29	N.I.12	27,8±44,9	27,5±44,3	289,2±194,0	166,0±165,1	373,9±252,0
30	N.I.13	71,5±67,0	98,0±54,0	330,4±169,7	310,2±211,1	489,8±231,2
31	N.I.14	-	-	15,1±31,7	-	8,5±27,0
32	N.I.15	14,2±29,9	-	41,9±44,2	50,2±43,5	95,0±15,3
33	N.I.16	124,2±12,6	119,8±17,0	101,4±13,5	145,6±17,8	110,8±11,8
34	N.I.17	53,3±37,5	52,5±36,3	46,8±32,3	40,5±34,9	47,3±32,7
35	N.I.18	29,4±38,0	22,1±35,5	20,2±32,6	20,1±32,3	13,2±27,8

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.12

Tabela II.13. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CLAE-EM-EM referente ao grupo Controle da espécie *S. lycopersicum* 'VFNT'.

		DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Controle					
1	ácido cafeoil hexárico 1	1039,5 $\pm$ 227,5	906,3 $\pm$ 237,4	735,2 $\pm$ 318,8	605,1 $\pm$ 283,3	544,0 $\pm$ 210,2	
2	N.I.1	1173,7 $\pm$ 295,9	1072,4 $\pm$ 313,7	861,6 $\pm$ 353,2	690,5 $\pm$ 294,2	672,7 $\pm$ 241,0	
3	ácido cafeoil hexárico 2	2630,7 $\pm$ 471,5	2274,2 $\pm$ 576,6	1853,9 $\pm$ 387,6	1544,2 $\pm$ 626,9	1419,0 $\pm$ 370,5	
4	ácido cafeoil hexárico 3	3353,7 $\pm$ 786,1	3072,0 $\pm$ 884,7	2631,3 $\pm$ 883,2	2052,8 $\pm$ 844,7	1978,9 $\pm$ 525,0	
5	ácido cafeoil hexárico 4	1735,7 $\pm$ 517,6	1416,1 $\pm$ 417,1	1242,5 $\pm$ 370,9	1007,3 $\pm$ 528,4	1002,6 $\pm$ 311,5	
6	ácido cafeoil hexárico 5	2267,8 $\pm$ 877,0	1938,6 $\pm$ 717,2	1606,2 $\pm$ 476,8	1332,6 $\pm$ 724,4	1412,1 $\pm$ 406,1	
7	ácido neoclorogênico	1966,1 $\pm$ 222,8	1766,0 $\pm$ 552,7	1579,4 $\pm$ 617,1	1196,8 $\pm$ 539,0	1014,6 $\pm$ 316,1	
8	ácido cafeoil hexárico 6	3116,0 $\pm$ 621,7	2934,1 $\pm$ 896,1	2487,9 $\pm$ 804,4	1979,4 $\pm$ 915,3	1865,0 $\pm$ 549,5	
9	N.I.2	238,9 $\pm$ 90,9	234,3 $\pm$ 95,6	183,9 $\pm$ 77,7	173,5 $\pm$ 66,1	156,0 $\pm$ 63,5	
10	N.I.3	69,7 $\pm$ 52,4	50,8 $\pm$ 61,2	15,9 $\pm$ 33,6	47,4 $\pm$ 74,5	59,6 $\pm$ 92,3	
11	ácido gentísico	67,0 $\pm$ 83,6	90,7 $\pm$ 119,1	92,6 $\pm$ 120,8	256,9 $\pm$ 117,8	119,3 $\pm$ 90,6	
12	N.I.4	380,5 $\pm$ 160,9	380,2 $\pm$ 175,5	355,4 $\pm$ 159,5	342,2 $\pm$ 138,6	267,9 $\pm$ 96,0	
13	ácido clorogênico	7733,6 $\pm$ 4201,3	6305,0 $\pm$ 4335,3	7964,9 $\pm$ 3749,5	4956,1 $\pm$ 4101,6	6900,7 $\pm$ 2928,9	
14	isômero ác. clorogênico	459,2 $\pm$ 208,2	432,0 $\pm$ 403,7	448,0 $\pm$ 317,8	275,7 $\pm$ 219,2	323,1 $\pm$ 192,0	
15	ácido cafeico	481,7 $\pm$ 172,7	349,8 $\pm$ 109,4	465,1 $\pm$ 141,4	463,8 $\pm$ 186,5	471,8 $\pm$ 238,9	
16	derivado de feruloil	82,8 $\pm$ 61,3	53,6 $\pm$ 59,5	51,8 $\pm$ 46,8	30,8 $\pm$ 50,3	44,9 $\pm$ 48,1	
17	isômero ác. feruloil quínico	33,0 $\pm$ 55,6	22,0 $\pm$ 46,5	82,4 $\pm$ 81,1	21,9 $\pm$ 46,8	7,5 $\pm$ 23,7	
18	N.I.5	419,3 $\pm$ 294,0	195,2 $\pm$ 121,4	258,8 $\pm$ 161,5	283,3 $\pm$ 267,8	328,6 $\pm$ 178,6	
19	N.I.6	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	
20	N.I.7	245,2 $\pm$ 61,9	169,6 $\pm$ 80,0	200,2 $\pm$ 103,9	199,4 $\pm$ 106,3	172,5 $\pm$ 35,2	
21	N.I.8	33,0 $\pm$ 55,6	22,0 $\pm$ 46,5	82,4 $\pm$ 81,1	21,9 $\pm$ 46,8	7,5 $\pm$ 23,7	

Continua Tabela II.13

Continuação Tabela II.13

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Controle				
22	N.I.9	-	-	-	-	-
23	N.I.10	1508,6±881,9	770,9±487,5	695,6±199,0	995,7±691,1	1864,8±1060,3
24	Rutina	-	-	-	-	-
25	N.I.11	131,0±35,5	102,7±45,8	101,9±42,2	104,0±62,9	115,6±44,7
26	tiramina cumaroil	662,3±390,9	307,7±227,4	300,3±153,5	224,2±110,2	348,5±174,4
27	campferol 3-O-rutinosídeo	425,5±130,5	283,4±145,9	323,8±233,9	420,9±217,0	379,9±162,5
28	tiramina feruloil	-	-	-	-	-
29	N.I.12	-	-	-	-	-
30	N.I.13	-	-	-	-	-
31	N.I.14	-	-	-	-	-
32	N.I.15	-	-	-	-	-
33	N.I.16	177,6±33,0	152,1±44,9	148,1±32,1	193,9±37,6	159,3±35,4
34	N.I.17	87,0±11,3	86,4±11,9	76,6±30,0	98,3±15,0	88,7±12,9
35	N.I.18	27,8±35,9	20,8±33,6	29,4±38,0	58,8±31,5	28,3±36,5

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.13

Tabela II.14. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CLAE-EM-EM referente ao grupo Tampão da espécie *S. lycopersicum* 'VFNT'.

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Tampão				
1	ácido cafeoil hexárico 1	1154,2 $\pm$ 224,2	974,2 $\pm$ 261,5	780,0 $\pm$ 202,8	583,4 $\pm$ 271,0	646,4 $\pm$ 81,2
2	N.I.1	1350,6 $\pm$ 264,4	1141,7 $\pm$ 335,2	932,8 $\pm$ 239,2	687,2 $\pm$ 319,8	807,3 $\pm$ 119,2
3	ácido cafeoil hexárico 2	2839,7 $\pm$ 502,3	2394,8 $\pm$ 556,0	2010,3 $\pm$ 362,0	1501,5 $\pm$ 546,2	1561,8 $\pm$ 217,1
4	ácido cafeoil hexárico 3	3784,0 $\pm$ 695,3	3222,5 $\pm$ 841,7	2721,5 $\pm$ 501,7	2003,6 $\pm$ 783,3	2239,7 $\pm$ 356,9
5	ácido cafeoil hexárico 4	1942,1 $\pm$ 462,0	1633,2 $\pm$ 569,7	1342,2 $\pm$ 330,2	997,1 $\pm$ 463,5	1090,6 $\pm$ 168,1
6	ácido cafeoil hexárico 5	2593,6 $\pm$ 620,9	2192,4 $\pm$ 853,6	1824,9 $\pm$ 503,0	1319,2 $\pm$ 644,3	1576,5 $\pm$ 296,8
7	ácido neoclorogênico	2129,3 $\pm$ 407,1	1773,8 $\pm$ 378,2	1501,9 $\pm$ 383,6	1237,7 $\pm$ 469,4	1164,5 $\pm$ 230,4
8	ácido cafeoil hexárico 6	3470,6 $\pm$ 655,3	2925,9 $\pm$ 733,6	2546,6 $\pm$ 586,3	2032,8 $\pm$ 828,6	2194,8 $\pm$ 411,0
9	N.I.2	227,6 $\pm$ 63,5	261,5 $\pm$ 106,2	248,8 $\pm$ 118,2	162,2 $\pm$ 87,8	222,5 $\pm$ 30,2
10	N.I.3	41,1 $\pm$ 43,6	64,0 $\pm$ 57,8	15,7 $\pm$ 33,4	31,6 $\pm$ 41,1	77,0 $\pm$ 56,6
11	ácido gentísico	91,9 $\pm$ 91,6	124,5 $\pm$ 90,0	130,8 $\pm$ 113,2	232,0 $\pm$ 143,4	161,4 $\pm$ 125,3
12	N.I.4	436,3 $\pm$ 197,4	411,3 $\pm$ 156,0	331,0 $\pm$ 129,2	384,3 $\pm$ 158,0	315,2 $\pm$ 111,2
13	ácido clorogênico	7081,7 $\pm$ 2466,9	6887,5 $\pm$ 4624,2	6449,6 $\pm$ 2907,4	5163,6 $\pm$ 3770,9	7558,5 $\pm$ 3454,3
14	isômero ác. clorogênico	360,8 $\pm$ 129,0	354,4 $\pm$ 236,2	408,3 $\pm$ 186,2	426,4 $\pm$ 199,0	334,8 $\pm$ 113,0
15	ácido cafeico	559,2 $\pm$ 237,1	540,3 $\pm$ 281,9	626,2 $\pm$ 270,1	522,3 $\pm$ 318,4	451,5 $\pm$ 184,8
16	derivado de feruloil	87,6 $\pm$ 48,2	86,2 $\pm$ 66,0	68,5 $\pm$ 48,4	34,2 $\pm$ 44,4	54,1 $\pm$ 59,3
17	isômero ác. feruloil quínico	29,2 $\pm$ 47,1	67,1 $\pm$ 63,8	26,6 $\pm$ 42,9	80,6 $\pm$ 47,8	8,3 $\pm$ 26,3
18	N.I.5	375,6 $\pm$ 165,7	257,9 $\pm$ 163,4	210,4 $\pm$ 124,9	354,0 $\pm$ 268,0	329,3 $\pm$ 213,6
19	N.I.6	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
20	N.I.7	331,8 $\pm$ 101,4	161,2 $\pm$ 70,7	185,4 $\pm$ 74,6	226,0 $\pm$ 113,6	188,0 $\pm$ 53,9
21	N.I.8	29,2 $\pm$ 47,1	67,1 $\pm$ 63,8	26,6 $\pm$ 42,9	80,6 $\pm$ 47,8	8,3 $\pm$ 26,3

Continua Tabela II.14

Continuação Tabela II.14

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Tampão				
22	N.I.9	-	-	-	-	-
23	N.I.10	1272,3±558,5	1693,9±1145,0	664,7±314,1	1058,6±752,4	1815,6±1306,5
24	Rutina	-	-	-	-	-
25	N.I.11	116,6±21,7	111,2±28,8	97,2±41,1	113,8±50,1	130,8±19,2
26	tiramina cumaroil	575,9±290,4	633,2±442,8	281,7±177,7	253,5±127,8	355,0±203,9
27	campferol 3-O-rutinosídeo	506,1±181,6	226,8±84,5	307,0±136,7	418,1±246,8	395,2±180,9
28	tiramina feruloil	-	-	-	-	-
29	N.I.12	-	-	-	-	-
30	N.I.13	-	-	-	-	-
31	N.I.14	-	-	-	-	-
32	N.I.15	-	-	-	-	-
33	N.I.16	203,2±71,1	192,5±42,4	166,1±37,2	207,5±21,8	152,5±33,2
34	N.I.17	89,7±9,0	91,6±13,1	90,5±11,6	97,3±15,3	89,0±11,8
35	N.I.18	20,9±33,7	41,4±35,7	50,8±35,2	52,2±36,3	42,1±36,2

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.14

Tabela II.15. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CLAE-EM-EM referente ao grupo Infectadas da espécie *S. lycopersicum* 'VFNT'.

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Infectadas				
1	ácido cafeoil hexárico 1	1015,4 $\pm$ 181,0	957,4 $\pm$ 319,0	621,2 $\pm$ 158,9	490,1 $\pm$ 95,2	610,1 $\pm$ 107,3
2	N.I.1	1170,0 $\pm$ 222,4	1116,9 $\pm$ 356,5	766,3 $\pm$ 174,1	580,7 $\pm$ 129,3	732,9 $\pm$ 126,0
3	ácido cafeoil hexárico 2	2507,2 $\pm$ 397,9	2290,5 $\pm$ 509,1	1641,5 $\pm$ 303,5	1281,5 $\pm$ 243,9	1517,7 $\pm$ 231,8
4	ácido cafeoil hexárico 3	3314,2 $\pm$ 581,5	3189,9 $\pm$ 833,9	2267,2 $\pm$ 405,3	1714,7 $\pm$ 389,1	2081,1 $\pm$ 348,3
5	ácido cafeoil hexárico 4	1740,9 $\pm$ 400,8	1569,8 $\pm$ 413,3	1069,1 $\pm$ 241,1	858,0 $\pm$ 188,9	992,0 $\pm$ 247,5
6	ácido cafeoil hexárico 5	2268,2 $\pm$ 592,4	2219,5 $\pm$ 708,7	1480,6 $\pm$ 332,5	1132,5 $\pm$ 303,2	1369,0 $\pm$ 365,2
7	ácido neoclorogênico	1859,0 $\pm$ 301,5	1557,5 $\pm$ 359,1	1206,4 $\pm$ 253,2	1006,4 $\pm$ 257,8	1196,2 $\pm$ 203,4
8	ácido cafeoil hexárico 6	2966,0 $\pm$ 454,0	2767,0 $\pm$ 731,7	2115,8 $\pm$ 393,1	1662,1 $\pm$ 470,6	2107,3 $\pm$ 379,4
9	N.I.2	271,5 $\pm$ 79,5	249,3 $\pm$ 123,7	169,0 $\pm$ 71,3	210,2 $\pm$ 47,3	184,3 $\pm$ 78,5
10	N.I.3	80,5 $\pm$ 46,4	25,2 $\pm$ 40,9	8,5 $\pm$ 26,8	14,9 $\pm$ 62,3	54,5 $\pm$ 61,5
11	ácido gentísico	38,2 $\pm$ 66,0	110,8 $\pm$ 123,7	99,3 $\pm$ 94,3	176,8 $\pm$ 130,5	185,7 $\pm$ 142,4
12	N.I.4	412,6 $\pm$ 145,1	300,6 $\pm$ 67,5	279,4 $\pm$ 80,6	324,9 $\pm$ 116,6	306,6 $\pm$ 94,9
13	ácido clorogênico	5888,9 $\pm$ 2496,1	6561,6 $\pm$ 3930,2	4499,4 $\pm$ 3078,7	2977,6 $\pm$ 3130,4	7902,5 $\pm$ 3850,9
14	isômero ác. clorogênico	324,2 $\pm$ 157,3	372,9 $\pm$ 324,1	298,5 $\pm$ 235,2	282,7 $\pm$ 136,1	465,4 $\pm$ 225,5
15	ácido cafeico	554,5 $\pm$ 144,5	534,8 $\pm$ 236,3	692,2 $\pm$ 263,1	566,8 $\pm$ 176,4	434,6 $\pm$ 143,0
16	derivado de feruloil	63,8 $\pm$ 56,7	79,7 $\pm$ 59,6	28,8 $\pm$ 46,5	29,1 $\pm$ 58,5	57,0 $\pm$ 51,0
17	isômero ác. feruloil quínico	-	35,9 $\pm$ 46,6	42,2 $\pm$ 56,1	60,4 $\pm$ 26,3	93,4 $\pm$ 54,9
18	N.I.5	402,8 $\pm$ 188,3	227,0 $\pm$ 120,8	175,6 $\pm$ 115,9	165,3 $\pm$ 205,7	425,5 $\pm$ 233,7
19	N.I.6	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,3
20	N.I.7	253,8 $\pm$ 113,2	250,5 $\pm$ 133,7	173,0 $\pm$ 103,8	182,7 $\pm$ 60,0	241,1 $\pm$ 72,4
21	N.I.8	-	35,9 $\pm$ 46,6	42,2 $\pm$ 56,1	60,4 $\pm$ 26,3	93,4 $\pm$ 54,9

Continua Tabela II.15

Continuação Tabela II.15

	DAI	1	7	14	21	28
Subst.	Provável subst.	Infectadas				
22	N.I.9	-	-	-	-	-
23	N.I.10	1179,2±475,5	1022,2±576,5	828,9±620,2	641,6±1225,9	1905,6±1039,4
24	Rutina	-	-	-	-	-
25	N.I.11	95,4±37,9	99,0±32,1	87,1±37,5	95,2±18,9	140,5±28,6
26	tiramina cumaroil	570,3±229,8	385,0±190,5	259,1±116,0	199,7±193,8	369,3±167,2
27	campferol 3-O-rutinosídeo	524,9±206,9	222,3±63,8	256,7±33,3	304,4±199,0	411,7±175,3
28	tiramina feruloil	-	-	-	-	-
29	N.I.12	-	-	-	-	-
30	N.I.13	-	-	-	-	-
31	N.I.14	-	-	-	-	-
32	N.I.15	-	-	-	-	-
33	N.I.16	195,1±29,5	206,0±73,1	170,1±22,1	202,1±34,6	139,8±27,0
34	N.I.17	78,6±8,1	97,4±12,9	102,5±13,6	98,4±11,2	88,6±12,7
35	N.I.18	13,6±28,6	43,3±37,4	66,4±23,9	59,3±36,0	35,0±36,9

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.15

Tabela II.16. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CG-EM referente ao grupo Controle da espécie *S. pimpinellifolium*.

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Controle				
36	Glicerol	18,6 $\pm$ 4,8	9,3 $\pm$ 8,0	-	9 $\pm$ 7,2	33,1 $\pm$ 31,6
37	Treonina	6,0 $\pm$ 10,6	15,3 $\pm$ 5,9	21,8 $\pm$ 11,2	4,8 $\pm$ 8	17,2 $\pm$ 18,8
38	Glicina	21,4 $\pm$ 11,9	9,5 $\pm$ 10,3	15,9 $\pm$ 12,5	7,3 $\pm$ 8,1	-
39	Succinato	6,9 $\pm$ 9,1	6,2 $\pm$ 8,0	-	-	-
40	Glicerato	3,9 $\pm$ 5,1	5,9 $\pm$ 6,6	3,5 $\pm$ 4,9	11,1 $\pm$ 7,2	5,5 $\pm$ 5,2
41	Aspartato	19,5 $\pm$ 30,0	32,7 $\pm$ 35,0	42,2 $\pm$ 37,2	15,7 $\pm$ 19,7	-
42	Malato	268,2 $\pm$ 141,4	355,0 $\pm$ 178,7	474,0 $\pm$ 144,9	349,8 $\pm$ 179,9	150,7 $\pm$ 130,8
43	5-oxoprolina	25,8 $\pm$ 42,0	39,4 $\pm$ 35,1	59,9 $\pm$ 40,6	28,5 $\pm$ 21	11,6 $\pm$ 10,0
44	GABA	24,8 $\pm$ 24,4	17,1 $\pm$ 7,4	8,2 $\pm$ 9,8	36,3 $\pm$ 19,7	34,1 $\pm$ 27,3
45	Glutamato	8,7 $\pm$ 16,8	31,3 $\pm$ 41,8	66,4 $\pm$ 59,5	39,6 $\pm$ 32,9	-
47	NI1	-	-	6731,5 $\pm$ 7730,2	-	-
48	NI2	9669,9 $\pm$ 11425,2	24585,7 $\pm$ 7382,0	40602,3 $\pm$ 11546,4	31045,2 $\pm$ 10315,4	15669,9 $\pm$ 9082,6
49	NI3	23982,7 $\pm$ 13793,3	41905,3 $\pm$ 12839,0	71065,6 $\pm$ 16343,6	47024,9 $\pm$ 17099,5	28078,7 $\pm$ 19458,7
50	Chiquimato	-	3,4 $\pm$ 6,0	10,4 $\pm$ 12,9	-	-
51	Citrato	26,2 $\pm$ 26,3	33,2 $\pm$ 17,5	44,0 $\pm$ 27,2	87,4 $\pm$ 67,9	29,7 $\pm$ 30,8
52	2-cetoglutarato	-	-	79,8 $\pm$ 45,8	-	-
53	Quinato	37,9 $\pm$ 26,0	43,5 $\pm$ 27,7	288,3 $\pm$ 229,8	32,9 $\pm$ 27,7	289,0 $\pm$ 218,2
54	Frutose 1	357,4 $\pm$ 355,5	102,1 $\pm$ 53,8	194,2 $\pm$ 156,5	196,7 $\pm$ 136,8	198,2 $\pm$ 152,5
55	Frutose 2	247,8 $\pm$ 263,8	66,2 $\pm$ 35,1	177,9 $\pm$ 172,2	131,5 $\pm$ 89,2	247,2 $\pm$ 179,1
56	Glicose 1	309,8 $\pm$ 334,8	62,0 $\pm$ 30,0	465,7 $\pm$ 440,8	180,4 $\pm$ 142,7	621727,6 $\pm$ 437488,5
57	Glicose 2	671,9 $\pm$ 994,5	148,5 $\pm$ 87,8	54,1 $\pm$ 126,3	398 $\pm$ 330,8	9861,3 $\pm$ 31184,2

Continua Tabela II.16

Continuação Tabela II.16

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Controle				
59	2-cetogulonato	-	-	-	-	-
60	Glucarato	63,7±83,1	71,0±117,7	152,4±192,5	50,8±97,3	135279,4±115818,1
62	Inositol	117,8±77,5	154,1±50,2	396,9±171,6	277,4±98,4	355,4±207,8
63	Galactose	7,9±6,9	4,3±7,2	5,3±6,8	8,4±9,1	14,2±8,3
64	Sacarose	32,1±24,8	54,1±27,9	180,7±80,6	171,9±75,6	303,2±207,7

DAI = dias após a inoculação.

Conclusão Tabela II.16

Tabela II.17. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CG-EM referente ao grupo Tampão da espécie *S. pimpinellifolium*.

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Tampão				
36	Glicerol	17,3 $\pm$ 7,2	8,0 $\pm$ 5,1	-	-	-
37	Treonina	12,3 $\pm$ 7,0	10,1 $\pm$ 7,7	19,4 $\pm$ 12,4	-	10,8 $\pm$ 19,3
38	Glicina	32,5 $\pm$ 27,6	12,8 $\pm$ 13,3	21,1 $\pm$ 14,5	-	-
39	Succinato	7,7 $\pm$ 9,1	-	-	-	-
40	Glicerato	4,0 $\pm$ 3,6	7,9 $\pm$ 4,8	5,4 $\pm$ 6,4	4,2 $\pm$ 3,8	4,2 $\pm$ 3,9
41	Aspartato	24,8 $\pm$ 16,8	22,2 $\pm$ 13,4	53,7 $\pm$ 29,2	6,9 $\pm$ 7,5	9,9 $\pm$ 7,8
42	Malato	293,9 $\pm$ 145,8	327,7 $\pm$ 157,5	537,6 $\pm$ 132,4	256,1 $\pm$ 202,9	169,3 $\pm$ 65,5
43	5-oxoprolina	32,3 $\pm$ 15,8	18,2 $\pm$ 8,7	60,4 $\pm$ 22,3	16,1 $\pm$ 13,1	11,2 $\pm$ 13,6
44	GABA	26,3 $\pm$ 15,5	11,4 $\pm$ 13,2	15,4 $\pm$ 34,3	25,9 $\pm$ 18,0	30,9 $\pm$ 30,3
45	Glutamato	7,8 $\pm$ 13,9	-	70,6 $\pm$ 38,9	24,6 $\pm$ 24,8	13,5 $\pm$ 21,1
47	NI1	-	-	7387,1 $\pm$ 7851,4	-	-
48	NI2	13138,7 $\pm$ 11875,9	12210,7 $\pm$ 11217,9	38526,6 $\pm$ 12172,0	17754,2 $\pm$ 11112,1	14109,8 $\pm$ 9541,5
49	NI3	31362,8 $\pm$ 13529,2	29342,9 $\pm$ 9652,6	68112,1 $\pm$ 19906,2	30442,4 $\pm$ 9288,2	25129,1 $\pm$ 14458,5
50	Chiquimato	-	-	10,8 $\pm$ 9,4	-	-
51	Citrato	33,3 $\pm$ 27,3	18,0 $\pm$ 11,0	55,2 $\pm$ 16,9	60,9 $\pm$ 59,5	49,3 $\pm$ 37,3
52	2-cetoglutarato	-	-	11,8 $\pm$ 11,8	-	-
53	Quinato	43,8 $\pm$ 18,3	28,1 $\pm$ 13,4	73,5 $\pm$ 34,8	16,3 $\pm$ 22,2	117,6 $\pm$ 137,6
54	Frutose 1	252,2 $\pm$ 130,3	131,9 $\pm$ 51,7	330,4 $\pm$ 318,1	284,4 $\pm$ 532,3	105,9 $\pm$ 106,2
55	Frutose 2	166,3 $\pm$ 87,6	86,4 $\pm$ 35,2	225,0 $\pm$ 228,6	200,4 $\pm$ 391,8	69,4 $\pm$ 70,0
56	Glicose 1	221,3 $\pm$ 88,2	80,8 $\pm$ 26,3	189,9 $\pm$ 209,6	177,8 $\pm$ 332,7	86,0 $\pm$ 73,5
57	Glicose 2	519,1 $\pm$ 195,0	172,0 $\pm$ 74,1	496,9 $\pm$ 489,8	424,0 $\pm$ 834,0	99538,0 $\pm$ 143439,7

Continuação Tabela II.17

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Tampão				
59	2-cetogulonato	-	-	46,3±78,0	-	-
60	Glucarato	-	45,0±60,3	112,1±86,2	54,8±92,7	43177,2±91832,4
62	Inositol	103,5±22,0	129,9±36,9	371,2±174,6	270,4±187,4	253,7±120,9
63	Galactose	4,9±8,2	2,0±4,7	7,5±8,2	8,6±9,5	13,6±3,3
64	Sacarose	15,9±13,4	26,1±11,2	133,0±52,7	108,4±57,5	153,2±138,5

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.17

Tabela II.18. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CG-EM referente ao grupo Infectadas da espécie *S. pimpinellifolium*.

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Infectadas				
36	Glicerol	16,9 $\pm$ 10,0	3,0 $\pm$ 4,2	-	-	-
37	Treonina	7,1 $\pm$ 7,8	2,6 $\pm$ 4,2	8,0 $\pm$ 9,2	-	14,5 $\pm$ 15,4
38	Glicina	12,2 $\pm$ 7,1	9,3 $\pm$ 5,3	15,4 $\pm$ 11,5	-	-
39	Succinato	6,9 $\pm$ 11,2	-	-	-	-
40	Glicerato	2,7 $\pm$ 3,7	4,3 $\pm$ 4,6	4,7 $\pm$ 4,7	1,2 $\pm$ 3,6	0,2 $\pm$ 0,8
41	Aspartato	29,7 $\pm$ 33,1	13,4 $\pm$ 12,7	13,7 $\pm$ 19,4	20,1 $\pm$ 9,1	29,0 $\pm$ 25,5
42	Malato	192,6 $\pm$ 97,0	309,2 $\pm$ 120,2	477,0 $\pm$ 225,6	553,1 $\pm$ 141,1	410,2 $\pm$ 142,0
43	5-oxoprolina	31,3 $\pm$ 25,9	37,0 $\pm$ 51,8	41,8 $\pm$ 30,3	65,7 $\pm$ 21,5	92,4 $\pm$ 152,9
44	GABA	20,1 $\pm$ 22,6	24,9 $\pm$ 17,5	1,6 $\pm$ 5,0	57,3 $\pm$ 67,1	33,1 $\pm$ 20,5
45	Glutamato	9,7 $\pm$ 14605,0	-	24,1 $\pm$ 22424,5	61,0 $\pm$ 10125,5	56,5 $\pm$ 21967,7
47	NI1	-	-	4313,9 $\pm$ 6,3	-	-
48	NI2	3651,4 $\pm$ 7,9	12870,3 $\pm$ 5,3	27032,6 $\pm$ 14,7	21761,7 $\pm$ 10,8	21830,6 $\pm$ 9,9
49	NI3	17991,8 $\pm$ 11,8	23317,6 $\pm$ 10,8	51881,9 $\pm$ 21,1	36950,0 $\pm$ 11,6	37614,0 $\pm$ 10,8
50	Chiquimato	-	-	13,2 $\pm$ 11,1	-	-
51	Citrato	19,0 $\pm$ 17,9	54,3 $\pm$ 36,2	79,8 $\pm$ 38,1	225,6 $\pm$ 86,9	117,6 $\pm$ 64,5
52	2-cetoglutarato	-	-	13,3 $\pm$ 16,6	-	-
53	Quinato	27,8 $\pm$ 15,2	38,9 $\pm$ 40,7	68,3 $\pm$ 55,6	33,1 $\pm$ 13,5	251,1 $\pm$ 167,2
54	Frutose 1	201,7 $\pm$ 101,0	115,8 $\pm$ 63,2	799,0 $\pm$ 589,4	266,5 $\pm$ 317,8	316,2 $\pm$ 343,7
55	Frutose 2	132,4 $\pm$ 67,1	74,2 $\pm$ 41,8	606,7 $\pm$ 478,8	174,9 $\pm$ 209,7	213,5 $\pm$ 242,5
56	Glicose 1	165,8 $\pm$ 84,7	66,6 $\pm$ 31,6	567,9 $\pm$ 473,9	149,1 $\pm$ 170,7	211,0 $\pm$ 289,0

Continua Tabela II.18

Continuação Tabela II.18

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Infectadas				
57	Glicose 2	373,4±202,1	154,2±71,1	1439,2±1752,3	311,4±388,0	525,9±800,0
59	2-cetogulonato	-	-	14,5±45,9	-	-
60	Glucarato	-	17,1±37,5	19,1±41,1	0,0±0,0	3,7±11,7
62	Inositol	76,2±20,9	125,8±91,1	453,2±224,2	341,1±119,6	388,0±128,0
63	Galactose	2,7±5,8	5,6±4,1	17,2±3,5	6,1±8,1	13,0±5,1
64	Sacarose	17,4±10,0	17,4±11,2	174,8±115,0	148,0±46,5	170,1±58,8

DAI = dias após a inoculação.

Conclusão Tabela II.18

Tabela II.19. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CG-EM referente ao grupo Controle da espécie *S. lycopersicum* 'VFNT'.

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Controle				
36	Glicerol	-	4,0 $\pm$ 6,9	4,5 $\pm$ 4,6	6,9 $\pm$ 9,6	7,3 $\pm$ 11,3
37	Treonina	7,6 $\pm$ 5,3	-	5,1 $\pm$ 7,0	-	6,7 $\pm$ 9,8
38	Glicina	4,9 $\pm$ 4,3	-	8,0 $\pm$ 5,7	3,0 $\pm$ 4,9	9,3 $\pm$ 6,6
39	Succinato	5,4 $\pm$ 4,3	-	1,9 $\pm$ 2,5	-	3,9 $\pm$ 3,2
40	Glicerato	3,3 $\pm$ 4,2	6,6 $\pm$ 5,9	10,5 $\pm$ 3,1	5,2 $\pm$ 7,1	4,2 $\pm$ 3,1
41	Aspartato	15,6 $\pm$ 10,8	-	3,1 $\pm$ 3,3	-	1,8 $\pm$ 2,9
42	Malato	139,1 $\pm$ 74,3	75,8 $\pm$ 48,2	73,6 $\pm$ 32,4	49,9 $\pm$ 39,4	37,5 $\pm$ 24,1
43	5-oxoprolina	43,1 $\pm$ 17,9	6,1 $\pm$ 9,1	21,6 $\pm$ 12,3	5,9 $\pm$ 9,7	17,7 $\pm$ 6,9
44	GABA	2,4 $\pm$ 2,7	-	3,5 $\pm$ 3,5	5,2 $\pm$ 7,0	8,8 $\pm$ 4,1
45	Glutamato	49,9 $\pm$ 17,7	-	13,9 $\pm$ 4,9	7,1 $\pm$ 9,3	10,6 $\pm$ 8,4
47	NI1	9876,6 $\pm$ 6103,7	-	8814,8 $\pm$ 3005,9	1340,5 $\pm$ 4239,2	8843,5 $\pm$ 3774,5
48	NI2	8868,9 $\pm$ 4951,0	-	6221,4 $\pm$ 4858,6	2644,5 $\pm$ 5598,9	7281,8 $\pm$ 4638,0
49	NI3	5568,0 $\pm$ 5998,2	-	10676,2 $\pm$ 3737,7	-	7086,9 $\pm$ 4556,0
50	Chiquimato	13,3 $\pm$ 12,2	-	-	-	-
51	Citrato	36,1 $\pm$ 37,9	18,7 $\pm$ 15,4	25,6 $\pm$ 38,3	11,4 $\pm$ 14,3	28,1 $\pm$ 41,3
52	2-cetoglutarato	30,9 $\pm$ 16,3	-	15,4 $\pm$ 11,4	7,3 $\pm$ 9,7	12,9 $\pm$ 5,1
53	Quinato	274,2 $\pm$ 134,2	29,3 $\pm$ 34,6	38,9 $\pm$ 25,5	27,9 $\pm$ 54,8	36,7 $\pm$ 34,9
54	Frutose 1	153,7 $\pm$ 138,2	183,8 $\pm$ 105,8	196,6 $\pm$ 139,5	167,7 $\pm$ 121,1	172,7 $\pm$ 113,9
55	Frutose 2	102,1 $\pm$ 92,0	121,8 $\pm$ 70,2	129,9 $\pm$ 90,5	108,9 $\pm$ 79,4	113,3 $\pm$ 76,1
56	Glicose 1	69,9 $\pm$ 70,7	184,3 $\pm$ 118,0	150,1 $\pm$ 109,7	135,3 $\pm$ 95,9	120,4 $\pm$ 82,1
57	Glicose 2	23,7 $\pm$ 10,9	32,8 $\pm$ 23,5	31,5 $\pm$ 21,2	24,5 $\pm$ 19,5	27,7 $\pm$ 16,1

Continua Tabela II.19

Continuação Tabela II.19

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Controle				
58	Tirosina	3,3±3,4	-	2,1±3,7	0,0±0,0	3,9±7,7
59	2-cetogulonato	4,4±4,8	-	1,3±2,0	-	-
60	Glucarato	0,9±1,5	-	-	-	-
61	Palmitato	-	-	-	-	39,7±73,1
62	Inositol	300,3±105,7	141,6±50,0	149,0±36,5	149,3±81,1	291,0±91,3
63	Galactose	9,0±7,1	16,5± 6,3	15,1± 5,5	19,5± 13,0	19,8± 5,2
64	Sacarose	62,3± 21,1	57,0± 9,7	46,8± 13,2	53,5± 32,8	82,0± 24,4

DAI = dias após a inoculação

Conclusão Tabela II.19

Tabela II.20. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CG-EM referente ao grupo Tampão da espécie *S. lycopersicum* 'VFNT'.

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Tampão				
36	Glicerol	13,4 $\pm$ 11,1	-	5,6 $\pm$ 5,0	-	12,6 $\pm$ 23,1
37	Treonina	8,4 $\pm$ 5,6	-	3,5 $\pm$ 5,0	-	-
38	Glicina	6,2 $\pm$ 5,0	-	8,5 $\pm$ 5,4	-	7,5 $\pm$ 4,0
39	Succinato	6,7 $\pm$ 5,4	-	5,0 $\pm$ 3,0	-	4,4 $\pm$ 5,2
40	Glicerato	2,9 $\pm$ 4,5	2,7 $\pm$ 4,6	12,6 $\pm$ 10,1	2,7 $\pm$ 4,4	5,2 $\pm$ 1,9
41	Aspartato	20,2 $\pm$ 14,7	-	-	-	-
42	Malato	76,8 $\pm$ 52,0	95,8 $\pm$ 64,4	76,1 $\pm$ 68,1	32,5 $\pm$ 36,2	63,9 $\pm$ 49,2
43	5-oxoprolina	23,0 $\pm$ 20,6	16,6 $\pm$ 6,5	9,7 $\pm$ 17,5	6,4 $\pm$ 5,9	16,9 $\pm$ 5,5
44	GABA	0,0 $\pm$ 0,0	-	2,2 $\pm$ 4,7	-	5,8 $\pm$ 2,7
45	Glutamato	14,0 $\pm$ 12,9	18,1 $\pm$ 10,6	7,7 $\pm$ 12,8	6,0 $\pm$ 8,3	9,1 $\pm$ 6,8
47	NI1	-	-	7387,1 $\pm$ 7851,4	-	-
48	NI2	13138,7 $\pm$ 11875,9	12210,7 $\pm$ 11217,9	38526,6 $\pm$ 12172,0	17754,2 $\pm$ 11112,1	14109,8 $\pm$ 9541,5
49	NI3	31362,8 $\pm$ 13529,2	29342,9 $\pm$ 9652,6	68112,1 $\pm$ 19906,2	30442,4 $\pm$ 9288,2	25129,1 $\pm$ 14458,5
50	Chiquimato	-	-	-	-	-
51	Citrato	73,9 $\pm$ 73,6	46,5 $\pm$ 47,6	55,4 $\pm$ 74,2	16,0 $\pm$ 22,7	26,1 $\pm$ 24,2
52	2-cetoglutarato	3,6 $\pm$ 7,6	-	8,8 $\pm$ 11,6	8,3 $\pm$ 7,4	19,3 $\pm$ 10,9
53	Quinato	57,8 $\pm$ 57,6	68,3 $\pm$ 46,7	28,1 $\pm$ 36,0	24,4 $\pm$ 27,6	61,1 $\pm$ 61,9
54	Frutose 1	101,4 $\pm$ 75,9	179,8 $\pm$ 75,6	91,2 $\pm$ 78,0	55,1 $\pm$ 54,0	134,2 $\pm$ 66,6
55	Frutose 2	66,2 $\pm$ 50,3	117,9 $\pm$ 48,9	58,8 $\pm$ 50,8	36,0 $\pm$ 34,9	87,8 $\pm$ 43,0
56	Glicose 1	81,3 $\pm$ 46,1	126,1 $\pm$ 56,3	78,8 $\pm$ 70,1	43,9 $\pm$ 44,3	113,1 $\pm$ 60,1
57	Glicose 2	16,3 $\pm$ 9,6	28,1 $\pm$ 8,6	15,9 $\pm$ 15,2	10,7 $\pm$ 9,0	25,4 $\pm$ 8,5

Continua Tabela II.20

Continuação Tabela II.20

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Tampão				
58	Tirosina	-	4,7±7,0-	-	-	2,9±5,7
59	2-cetogulonato	-	2,6±3,0	-	-	1,6±2,8
60	Glucarato	-	-	-	-	-
61	Palmitato	-	-	-	62,2±87,0	130,3±153,5
62	Inositol	134,9±52,0	206,4±68,7	195,9±151,8	132,4±111,0	289,9±119,6
63	Galactose	9,4±4,6	18,0± 7,7	20,3± 4,0	14,6± 10,6	19,3± 8,0
64	Sacarose	41,3± 14,4	60,2± 12,4	47,4± 36,0	32,9± 31,8	68,3± 22,9

DAI = dias após a inoculação.

Conclusão Tabela II.20

Tabela II.21. Média (μg de substância/ g planta) $\pm$ desvio padrão das substâncias analisadas por CG-EM referente ao grupo Infectadas da espécie *S. lycopersicum* 'VFNT'.

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Infectadas				
36	Glicerol	7,4 $\pm$ 7,3	-	7,8 $\pm$ 8,2	5,0 $\pm$ 10,6	1,8 $\pm$ 2,4
37	Treonina	2,0 $\pm$ 3,2	-	6,5 $\pm$ 9,4	-	2,6 $\pm$ 3,1
38	Glicina	2,7 $\pm$ 4,9	-	10,1 $\pm$ 5,5	6,2 $\pm$ 8,8	6,7 $\pm$ 2,3
39	Succinato	4,8 $\pm$ 5,3	-	5,2 $\pm$ 3,3	1,5 $\pm$ 2,6	3,6 $\pm$ 3,6
40	Glicerato	3,0 $\pm$ 5,8	-	20,1 $\pm$ 10,0	3,7 $\pm$ 4,0	6,3 $\pm$ 3,4
41	Aspartato	12,0 $\pm$ 10,2	-	2,4 $\pm$ 4,2	-	-
42	Malato	67,8 $\pm$ 62,6	111,5 $\pm$ 71,5	68,6 $\pm$ 44,3	42,1 $\pm$ 32,5	51,6 $\pm$ 37,8
43	5-oxoprolina	14,2 $\pm$ 11,7	33,2 $\pm$ 49,3	21,4 $\pm$ 18,7	9,6 $\pm$ 6,9	12,7 $\pm$ 7,8
44	GABA	-	-	5,4 $\pm$ 6,8	5,9 $\pm$ 2,9	7,0 $\pm$ 2,3
45	Glutamato	14,6 $\pm$ 14,8	19,4 $\pm$ 15,9	11,1 $\pm$ 14,5	3,4 $\pm$ 5,0	4,9 $\pm$ 6,0
47	NI1	-	-	4313,9 $\pm$ 6,3	-	-
48	NI2	3651,4 $\pm$ 7,9	12870,3 $\pm$ 5,3	27032,6 $\pm$ 14,7	21761,7 $\pm$ 10,8	21830,6 $\pm$ 9,9
49	NI3	17991,8 $\pm$ 11,8	23317,6 $\pm$ 10,8	51881,9 $\pm$ 21,1	36950,0 $\pm$ 11,6	37614,0 $\pm$ 10,8
50	Chiquimato	0,0 $\pm$ 0,0	-	-	-	-
51	Citrato	51,1 $\pm$ 60,6	36,7 $\pm$ 50,0	54,3 $\pm$ 99,5	24,1 $\pm$ 21,7	29,1 $\pm$ 25,7
52	2-cetoglutarato	0,0 $\pm$ 0,0	-	6,5 $\pm$ 8,9	18,2 $\pm$ 11,6	20,4 $\pm$ 11,1
53	Quinato	16,6 $\pm$ 15,0	75,2 $\pm$ 41,0	12,8 $\pm$ 12,8	98,7 $\pm$ 80,9	116,9 $\pm$ 90,9
54	Frutose 1	157,9 $\pm$ 114,0	266,2 $\pm$ 213,3	139,2 $\pm$ 97,2	176,9 $\pm$ 122,2	190,1 $\pm$ 102,6
55	Frutose 2	104,3 $\pm$ 76,3	177,3 $\pm$ 144,5	108,6 $\pm$ 87,5	103,0 $\pm$ 62,4	126,9 $\pm$ 63,5
56	Glicose 1	156,0 $\pm$ 118,0	206,3 $\pm$ 185,1	101,0 $\pm$ 63,4	125,7 $\pm$ 94,2	153,0 $\pm$ 106,0
57	Glicose 2	27,2 $\pm$ 20,0	46,9 $\pm$ 35,2	21,1 $\pm$ 14,1	31,3 $\pm$ 20,8	28,3 $\pm$ 6,8

Continua Tabela II.21

Continuação Tabela II.21

	DAI	1	7	14	21	28
Nº Subst.	Subst.	Infectadas				
58	Tirosina	-	3,6±7,7-	-	1,9±2,0-	2,1±2,3
59	2-cetogulonato	-	4,4±5,0	-	4,1±3,8	5,3±4,3-
60	Glucarato	-	-	-	-	-
61	Palmitato	-	-	-	24,7±27,1	37,3±30,3
62	Inositol	129,2±96,6	159,0±67,7	187,5±109,3	356,3±166,1	410,1±154,5
63	Galactose	5,1±5,7	16,2± 9,2	14,4± 3,3	17,9± 11,4	19,3± 4,8
64	Sacarose	46,1± 27,1	76,9± 28,4	56,6± 41,3	85,2± 41,4	99,1± 43,4

DAI = dias após a inoculação.

Conclusão Tabela II.21

Figura II.1. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo Ion trap com ionização por eletrospray no modo negativo (4500 V) a partir de extrato hidrometanólico. As substâncias foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência. **a.** ácido cafeoil hexárico 1; **b.** ácido cafeoil hexárico 2; **c.** ácido cafeoil hexárico 3.

Figura II.2. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo Ion trap com ionização por eletrospray no modo negativo (4500 V) a partir de extrato hidrometanólico. As substâncias foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência. **a.** ácido cafeoil hexárico 4; **b.** ácido cafeoil hexárico 5; **c.** ácido neoclorogênico (ácido 3-cafeoilquínico).

porção cafeoil

Os isômeros do ácido cafeoil hexárico são formados pela ligação da porção cafeoil com as hidroxilas da porção do ácido hexárico, as quais estão designadas como R₂ a R₅.

O isômero do ácido clorogênico, provavelmente, seja o ácido 4-cafeoilquínico

Figura II.3. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo Ion trap com ionização por eletrospray no modo negativo (4500 V) a partir de extrato hidrometanólico. As substâncias foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência. **a.** ácido cafeoil hexárico 6; **b.** ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico); **c.** isômero do ácido clorogênico; **d.** ácido cafeico.

Figura II.4. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo Ion trap com ionização por eletrospray no modo negativo (4500 V) a partir de extrato hidrometanólico. As substâncias foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência. **a.** derivado de feruloil; **b.** isômero do ácido feruloil quínico; **c.** rutina.

Figura II.5. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo ion trap com ionização por eletrospray no modo negativo (4500 V) a partir de extrato hidrometanólico. As substâncias foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência. **a.** tiramina cumaroil; **b.** campferol 3-O-rutinosídeo; **c.** tiramina feruloil; **d.** o espectro de massas dessa substância foi acrescentado, pois ele apareceu por três vezes ao longo da análise, mas infelizmente não foi possível identificá-lo.

Figura II.6. . Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com ionização por impacto de elétrons (70 eV) a partir de substâncias derivatizadas com hidrocloreto de metoxiamina e MSTFA. **a.** glicerol (TMS); **b.** treonina (TMS); **c.** glicina (TMS); **d.** succinato (TMS); **e.** glicerato (TMS); **f.** aspartato (TMS); **g.** malato (TMS).

Figura II.7. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com ionização por impacto de elétrons (70 eV) a partir de substâncias derivatizadas com hidrócloridrato de metoxiamina e MSTFA. **a.** 5-oxoprolina (TMS); **b.** GABA (TMS); **c.** glutamato (TMS); **d.** ribitol (TMS); **e.** N.I. 1 (TMS); **f.** N.I. 2 (TMS); **g.** N.I. 3 (TMS).

Figura II.8. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com ionização por impacto de elétrons (70 eV) a partir de substâncias derivatizadas com hidrocloreto de metoxiamina e MSTFA. **a.** chiquimato (TMS); **b.** citrato (TMS); **c.** 2-cetogutarato (TMS); **d.** quinato (TMS); **e.** frutose, O-metiloxima (TMS); **f.** frutose, O-metiloxima (TMS).

Figura II.9. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com ionização por impacto de elétrons (70 eV) a partir de substâncias derivatizadas com hidrocloreto de metoxiamina e MSTFA. **a.** glicose, O-metiloxima (1E) (TMS); **b.** glicose, O-metiloxima (1Z) (TMS); **c.** tirosina, N, O – bis (TMS); **d.** 2- cetogluconato (TMS); **e.** glucarato (TMS).

Figura II.10. Espectros de massas obtidos por espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com ionização por impacto de elétrons (70 eV) a partir de substâncias derivatizadas com hidrócloridrato de metoxiamina e MSTFA. **a.** palmitato (TMS); **b.** inositol (TMS); **c.** galactose O – metiloxima (1E) (TMS); **d.** sacarose (TMS).