



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS GENES DE
SUSCETIBILIDADE EM INTERAÇÕES ENTRE TOMATEIRO
(*Solanum lycopersicum*) E *Sclerotinia sclerotiorum* E
*Verticillium dahliae***

ABNER REURISSON DE MEDEIROS PALHARES

Dissertação de Mestrado

Brasília - DF

Fevereiro/2025

ABNER REURISSON DE MEDEIROS PALHARES

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS GENES DE SUSCETIBILIDADE EM
INTERAÇÕES ENTRE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) E *Sclerotinia
sclerotiorum* E *Verticillium dahliae***

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador: Luiz Eduardo Bassay Blum

Co-orientadora: Angela Mehta dos Reis

Brasília – DF

Distrito Federal - Brasil

Fevereiro/2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Palhares, A. R. M. **IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS GENES DE SUSCETIBILIDADE EM INTERAÇÕES ENTRE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) E *Sclerotinia sclerotiorum* E *Verticillium dahliae***/ Abner Reurisson de Medeiros Palhares

Brasília - DF, 2025.

p. 97

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília – UnB.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, RT-qPCR, Expressão diferencial

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS GENES DE SUSCETIBILIDADE EM INTERAÇÕES ENTRE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) E *Sclerotinia sclerotiorum* E *Verticillium dahliae*.

AGRADECIMENTOS

Durante esta etapa da minha vida, contraí uma enorme dívida com várias boas pessoas, sem as quais este trabalho nunca teria sido concluído. Para elas expresso minha eterna gratidão. Inicialmente devo agradecer aos meus orientadores, Luiz Eduardo Bassay Blum e Angela Mehta dos Reis, aos quais expresso o mais profundo respeito e agradeço pela orientação, paciência e incentivo. A Angela, em especial agradeço ainda por me enxergar melhor do que eu mesmo. Agradeço também ao Dr. Ailton Reis e ao Dr. Ivonaldo Reis Santos, que mesmo não oficialmente, também me orientaram em meus experimentos e possuem a minha profunda admiração profissional.

Aos meus bons colegas do Laboratório de Genômica e Proteômica (LGP-CENARGEN) -em especial a Ana, a Bruna, a Isabela, ao Ivonaldo, ao Lucas e a Ruth -, agradeço profundamente pela ajuda, pelo aprendizado e pela camaradagem desprendida durante todo o tempo em que pude conviver neste espaço. Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Fitopatologia (CNPH) - em especial a Atháise, Ellen, a Fabiana, a Gabriela, ao Gabriel, ao Guilherme, ao Iran, a Ruthe e a Val. -, onde também tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis, que além de contribuírem na minha vida profissional, também me proporcionaram os melhores momentos de descontração em épocas difíceis.

Devo também mencionar àqueles que, mesmo não participando diretamente deste trabalho, contribuíram para minha formação, me ensinando sobre técnicas que certamente me serão úteis, como a Dra. Alice Maria Quezado Duval, a Ma. Bruna Medeiros Pereira, a Dra. Maria Esther Boiteux e Dr. Leonardo Boiteux.

Ainda é importante mencionar meus colegas e professores do Programa de Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília, aos quais sou grato pela convivência e base teórica que me proporcionaram.

Também preciso agradecer as instituições que me proporcionaram os recursos para o desenvolvimento deste projeto. Destaco a CAPES, pelo fornecimento da bolsa, a FAP-DF, pelo suporte financeiro ao projeto, a UnB, pelo fornecimento da experiência universitária e da infraestrutura para os meus estudos, e mais ainda ao suporte da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), especificamente das unidades Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e da Embrapa

Hortaliças (CNPH), as quais forneceram toda a infraestrutura para o desenvolvimento do projeto.

Por fim, quero agradecer a todas as pessoas que formaram o meu círculo social durante estes anos e me deram o suporte emocional que precisei, assim como aos membros da banca examinadora, aos quais agradeço por aceitarem o convite e por suas valiosas contribuições.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, e co-orientação da pesquisadora Dra. Angela Mehta dos Reis da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF.

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS GENES DE SUSCETIBILIDADE EM
INTERAÇÕES ENTRE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) E *Sclerotinia
sclerotiorum* E *Verticillium dahliae***

ABNER REURISSON DE MEDEIROS PALHARES

DISSERTAÇÃO APROVADA em __/__/____ por:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum
Orientador
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia – UnB

Dra. Angela Mehta dos Reis
Co-orientadora
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa/Cenargen

Dra. Patrícia Messenberg Guimaraes
Examinador (a) externo
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa/Cenargen

Prof. Dr. Maurício Rossato
Examinador interno
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia – UnB

Brasília – DF
2025

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	i
	LISTA DE FIGURAS.....	ii
	ANEXOS.....	iii
	RESUMO GERAL.....	iv
	GENERAL ABSTRACT.....	v
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	O tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	3
2.2	Doenças fúngicas que afetam o tomate	5
2.2.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5
2.2.2	<i>Verticillium dahliae</i>	7
2.3	Interação planta-patógeno.....	10
2.4	O papel dos fitormônios na interação suscetível	13
2.5	Os genes de suscetibilidade (genes-S).	15
2.6	Estudo da expressão diferencial de genes por RT-qPCR.....	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo geral	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1	Seleção de potenciais genes-S e genes referência.....	21
4.2	Desenho dos <i>primers</i>	22
4.3	Bioensaios e extração de RNA total	27
4.3.1	<i>Solanum lycopersicum</i> (var. Santa Cruz) X <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	27
4.3.1.1	Extração de RNA total (Método Trizol).....	28
4.3.2	<i>Solanum lycopersicum</i> (var. Ponderosa) X <i>Verticillium dahliae</i>	29
4.3.2.1	Extração de RNA total (Método Concert™ -> Trizol)	31
4.4	Quantificação e verificação de qualidade de ácidos nucleicos	33

4.5	Tratamento com DNase, verificação de qualidade do RNA tratado por eletroforese e RT-qPCR	33
4.6	Síntese de DNA complementar (cDNA).....	34
4.7	Procedimentos para RT-qPCR	35
4.7.1	<i>Solanum lycopersicum</i> (var. Santa Cruz) X <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	35
4.7.2	<i>Solanum lycopersicum</i> (var. Ponderosa) X <i>Verticillium dahliae</i>	35
4.8	Coleta e análise de dados	36
5	RESULTADOS.....	36
5.1	Interação entre tomate (var. Santa Cruz) e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	36
5.2	Interação entre tomate (var. Ponderosa) e <i>V. dahliae</i>	42
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS:.....	58
	ANEXOS.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes-S selecionados	23
---	----

Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a análise de RT-qPCR	25
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de interações “ <i>Cross talk</i> ” de fitormônios na resposta ao estresse biótico em plantas. Fonte: Checker et al. (2018).....	15
Figura 2. Inoculação e evolução dos sintomas em plantas de tomate (var. Sta. Cruz) com <i>S. sclerotiorum</i> . A) Placa com micélios; B) Corte de discos; C&D) Plantas acomodadas em caixas plásticas; E) Evolução de sintomas em 0, 6, 12 e 48 hpi....	37
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Avaliação da integridade de amostras do RNA total extraído a partir da interação tomate (var. Santa Cruz) e <i>S. sclerotiorum</i>	38
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Avaliação da integridade do RNA total extraído a partir da interação de tomate (var. Santa Cruz) e <i>S. sclerotiorum</i> , após tratamento com DNase.....	38
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Validação por RT-PCR dos cDNAs (diluídos 1:20) da interação tomate (var. Santa Cruz) com <i>V. dahliae</i> , utilizando <i>primers</i> para o gene referência SIPHD.	39
Figura 6. Expressão relativa dos potenciais genes-S na interação suscetível entre Tomate (var. Santa. Cruz) e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , As cores das barras correspondem aos tempos analisados e o “*” valores significativos ($p\text{-value} \leq 0.05$) da expressão relativa ao controle (0hpi).	40
Figura 7. Análise da expressão relativa dos genes ao longo do tempo (Time-course), usando o ponto de tempo 0 horas pós a inoculação (hpi) como uma condição controle durante a interação suscetível entre tomate (var. Santa. Cruz) e <i>S. sclerotiorum</i> . Os marcadores destacados em verde e vermelho correspondem, respectivamente, a expressão estatisticamente significativa ($p\text{-value} \leq 0.05$) regulada positivamente e negativamente tratamento controle, enquanto o azul não difere do tratamento controle.	42
Figura 8. Inoculação e evolução dos sintomas em plantas de tomate (var. Ponderosa) com <i>V. dahliae</i> A) Placa completamente colonizada; B) “Escovação” da placa; C) Filtragem da suspensão de esporos; D) Esporos em câmara de Neubauer; E) Plantas com 21 dias após a germinação; F) Imersão das raízes em solução de esporos; G) Sintomas em plantas aos 25 dias após a inoculação; & H) Sintomas em plantas aos 52 dpi.....	43

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Avaliação da integridade do RNA total extraído a partir da interação tomate (var. Ponderosa) e <i>V. dahliae</i>	44
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Avaliação da integridade de amostras de RNA total extraído a partir da interação tomate (var. Ponderosa) e <i>V. dahliae</i> , após tratamento com DNase.....	45
Figura 11. qPCR de amostras de RNA total tratadas com DNase para confirmar a ausência de contaminação com DNA genômico, utilizando <i>primers</i> para o gene SILSM7.....	45
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Validação por RT-PCR dos cDNAs (diluídos 1:20) da interação tomate (var. Ponderosa), com <i>V. dahliae</i> , utilizando <i>primers</i> para o gene referência SILSM7.....	46
Figura 13. Classificação de estabilidade dos genes medido pelo RefFinder. Fonte: RefFinder.....	47
Figura 14. Expressão relativa dos genes alvos associados à suscetibilidade na interação suscetível entre Tomate (var. Ponderosa) e <i>V. dahliae</i> . As cores das barras correspondem aos tempos analisados e o “*” a expressão estatisticamente significativa (p-value ≤ 0.05) regulada positivamente ou negativamente.	48
Figura 15. Análise da expressão relativa dos genes alvos ao longo do tempo (Time-course), tendo tempo 0h como controle, durante a interação suscetível entre tomate (var. Ponderosa) e <i>V. dahliae</i> . Os marcadores destacados em verde e vermelho correspondem, respectivamente, a expressão estatisticamente significativa (p-value ≤ 0.05) regulada positivamente e negativamente tratamento controle, enquanto o azul não difere do tratamento controle.....	49

ANEXOS

Relative Expression Results -TOMATE SC X SCLEROTINIA 6H.....	71
Relative Expression Results -TOMATE SC X SCLEROTINIA 12H.....	73
Relative Expression Results -TOMATE SC X SCLEROTINIA 48H.....	75
Relative Expression Results-TOMATE P X VERT 8H.....	77
Relative Expression Results -TOMATE P X VERT 24H.....	79
Relative Expression Results-TOMATE P X VERT 52H.....	81

RESUMO GERAL

Palhares, A. R. M. **IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS GENES DE SUSCETIBILIDADE EM INTERAÇÕES ENTRE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) E *Sclerotinia sclerotiorum* E *Verticillium dahliae***/ Abner Reurisson de Medeiros Palhares

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) destaca-se globalmente como uma das principais culturas hortícolas, tanto em termos econômicos quanto nutricionais. No entanto, enfrenta diversos problemas fitossanitários, incluindo uma ampla gama de patógenos, como os ascomicetos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium dahliae*, causadores do mofo-branco e da murcha de verticílio, respectivamente. O melhoramento genético tradicional para combater esses patógenos foca na introgressão de genes de resistência (genes-R) no genoma do tomate. Porém, essa abordagem tem se mostrado limitada devido à baixa disponibilidade de fontes de resistência no germoplasma dessa cultura e a grande variabilidade desses patógenos, o que aumenta o risco de quebra de resistência. É essencial portanto, a busca por novas estratégias de melhoramento para desenvolver variedades com resistência mais durável e de amplo espectro. Uma alternativa promissora é explorar a diversidade de genes de suscetibilidade (genes-S), que ao contrário dos genes de resistência, são genes que podem auxiliar os patógenos, facilitando a infecção ou mantendo a compatibilidade da interação. A perda da função dos genes-S, seja naturalmente ou pela aplicação de engenharia genética utilizando técnicas de silenciamento ou nocaute gênico, pode conferir resistência duradoura e de amplo espectro às doenças, sendo, portanto, alvos ideais para programas de melhoramento. Neste contexto, este estudo teve como objetivo identificar genes potencialmente envolvidos na suscetibilidade do tomateiro a *S. sclerotiorum* e *V. dahliae* para posterior uso em programas de melhoramento. Para tal, potenciais genes-S foram selecionados a partir da literatura, e seus homólogos identificados no genoma do tomateiro. Para verificar a expressão relativa diferencial, uma análise de RT-qPCR foi realizada utilizando RNA de amostras de plantas de tomate suscetíveis inoculadas com *S. sclerotiorum* ou *V. dahliae*. Para o bioensaio com *S. sclerotiorum*, as folhas de plantas de tomateiro (var. Santa Cruz) foram inoculadas com discos de meio BDA contendo micélios do patógeno, e coletadas em 0, 6, 12 e 48 horas após inoculação (hpi). Para *V. dahliae*, as raízes de tomateiro (var. Ponderosa) foram inoculadas por imersão e coletadas em 0, 8, 24 e 52 hpi. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e submetido a extração de RNA total para análise por RT-qPCR. Ao todo, 14 genes foram analisados. Observou-se um padrão de regulação positiva para a maioria dos genes testados, o que é consistente com o perfil esperado para genes-S. No patossistema tomate-*S. sclerotiorum*, 6 dos 7 genes analisados mostraram regulação positiva em ao menos um tempo, tomate-*V. dahliae* 6 dos 10 genes analisados tiveram este perfil. Os genes SIDMR6, SIGST e SILIN6 foram validados em ambos os patossistemas, enquanto os genes SIEDR, LSD1 e SITFIIAγ, foram validados apenas na interação tomate-*S. sclerotiorum* e SIGR-RBP, SIMC7 e SITPK1 apenas em *V. dahliae*. A identificação desses genes representa um avanço significativo para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético visando à obtenção de cultivares de tomateiro com resistência eficiente e duradoura contra esses patógenos.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, RT-qPCR, Expressão diferencial

Co-orientadora – Angela Mehta dos Reis - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

GENERAL ABSTRACT

Palhares, A. R. M. **Identification of potential susceptibility genes (S-genes) in compatible interactions between susceptible tomato varieties (*Solanum lycopersicum*) and the Fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Verticillium dahliae* /**
Abner Reurisson de Medeiros Palhares

The tomato plant (*Solanum lycopersicum*) is globally one of the main horticultural crops, due to its economical and nutritional value. However, the culture faces several phytosanitary problems, including a wide range of pathogens, including the ascomycetes *Sclerotinia sclerotiorum* and *Verticillium dahliae*, causative agents of white mold and verticillium wilt, respectively. To date, genetic breeding strategies to combat these pathogens focus on the introgression of resistance genes (R-genes) into the tomato plant genome. However, this approach has been limited due to low availability of resistance sources in the crop germplasm and the rapid evolution of these pathogens. Therefore, the search for improved strategies essential to develop varieties with more durable and broad-spectrum resistance are necessary. A promising alternative is to explore the susceptibility genes (S-genes), which unlike resistance genes, are genes that can assist pathogens by facilitating infection or maintaining the disease compatibility. The loss of function of S-genes, either naturally or through genetic engineering techniques, such as gene silencing or knockout, can confer long-lasting and broad-spectrum resistance to diseases, thereby rendering ideal targets for breeding programs. In this context, this study aimed to identify genes potentially involved in the susceptibility of tomato to *S. sclerotiorum* and *V. dahliae* with potential use in breeding programs. To this end, potential S-genes were selected from the literature, and their orthologous and homologous were identified in the tomato genome. To verify relative differential expression, an RT-qPCR analysis was performed using RNA samples from susceptible tomato plants inoculated with *S. sclerotiorum* or *V. dahliae*. For the bioassay with *S. sclerotiorum*, the leaves of tomato plants (var. Santa Cruz) were inoculated with BDA medium discs containing pathogen mycelia collected at 0, 6, 12, and 48 hours post-inoculation (hpi). For *V. dahliae*, tomato roots (var. Ponderosa) were inoculated by immersion and collected at 0, 8, 24, and 52 hpi. In total, 14 potential S genes were analyzed. A pattern of positive regulation was observed for most of the genes tested, consistent with the expected profile for S-genes. In the tomato-*S. sclerotiorum* pathosystem, 6 of the 7 analyzed genes showed positive regulation at least at one time point; in tomato-*V. dahliae*, 6 of the 10 analyzed genes had this profile. The genes SIDMR6, SIGST, and SILIN6 were validated in both pathosystems, while the genes SIEDR, LSD1, and SITFIIA γ were validated only in the tomato-*S. sclerotiorum* interaction, and SIGR-RBP, SIMC7, and SITPK1 only in *V. dahliae*. The identification of these genes represent a significant advance in the development of breeding strategies aimed at obtaining tomato cultivars with more efficient and durable resistance against these pathogens.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, RT-qPCR, Differential expression

Advisor – Luiz Eduardo Bassay Blum - University of Brasília

Co-advisor – Angela Mehta dos Reis - Embrapa Genetic Resources and Biotechnology

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é um dos membros mais importantes da família Solanaceae, que possui cerca de 3.000 espécies. Este fruto é notável não só pela sua relevância econômica global, mas também pelos seus benefícios à saúde. Rico em vitaminas, carotenoides, compostos fenólicos e licopeno, o tomate apresenta propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antimicrobianas, cardioprotetoras e antioxidantes. Originário da América do Sul, o tomate é mundialmente cultivado, estando presente em ao menos 166 países, adaptando-se a diversos climas e solos. No Brasil, é produzido principalmente em Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Paraná (BERGOUGNOUX, 2014; FAOSTAT, 2023; QUINET et al., 2019).

Entre os principais desafios à cultura do tomate estão os fatores abióticos e bióticos. Entre os fatores bióticos que mais impactam a cultura, destacam-se insetos, nematoides, vírus, bactérias, fungos e oomicetos, que podem causar severas perdas de produtividade. Doenças fúngicas como o mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, e a murcha de verticílio, causada por *Verticillium dahliae*, são especialmente preocupantes. Esses fitopatógenos são ascomicetos hemibiotróficos com ampla gama de hospedeiros e produzem estruturas de resistência, como escleródios (*S. sclerotiorum*) e microescleródios (MS) (*V. dahliae*), o que dificulta o seu controle. Atualmente, diversos métodos culturais, químicos e biológicos são utilizados para o controle destes patógenos. Ainda assim, o melhoramento genético é crucial para aumentar a produtividade e a qualidade dos frutos, além da resistência das plantas. Recentemente, o sequenciamento completo do genoma do tomateiro, revelou uma constituição de cerca de 30.000 genes, abrindo possibilidades para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e resistentes a estes patógenos (EINSPANIER et al., 2024; KUMAR; SRINIVASULU; BABU, 2018; SINGH; SINGH, 2018).

Apesar dos esforços no melhoramento do tomateiro, alguns desafios persistem. Um dos principais entraves é a baixa variabilidade genética entre os indivíduos da espécie. Esse fenômeno é uma consequência direta do intenso processo de seleção e melhoramento ao qual o tomate foi submetido ao longo do tempo, resultando em uma erosão significativa da sua diversidade genética. Essa redução na variabilidade limita a disponibilidade de fontes de resistência a doenças e pragas dentro da própria espécie cultivada. Outro desafio importante é a dinâmica evolutiva dos patógenos. *S.*

sclerotiorum e *V. dahliae*. Estes fungos possuem alta capacidade de adaptação e evolução, o que lhes permite superar as resistências rapidamente das plantas dependendo do tipo de resistência introduzida (CHAVARRO-CARRERO et al., 2021; DE WIT, 2024).

O sistema de defesa das plantas é extremamente complexo e multifacetado, envolvendo uma intrincada rede de vias de defesa. Nos programas de melhoramento genético, um dos focos principais é a busca por resistências genéticas, com destaque para as resistências qualitativas, também conhecidas como resistências monogênicas ou verticais. Estas são determinadas por um único gene de resistência, denominado gene-R. A maior parte destes genes-R codificam proteínas denominadas de *NOD-like receptors* (NLRs), que atuam intracelularmente no reconhecimento efetores patogênicos. Estes efetores são moléculas secretadas pelo patógeno para suprimir as defesas da planta e facilitar a infecção. Com o reconhecimento destas moléculas, a via conhecida como *effector-triggered immunity* (ETI) é ativada. Por vezes, pequenas alterações na sequência dos genes que codificam esses efetores podem modificar as estruturas das moléculas, impedindo seu reconhecimento por estes genes-R e, conseqüentemente, inibindo as respostas de defesa da planta (VAN SCHIE; TAKKEN, 2014). Por isso, a busca por resistências de espectro mais amplo é essencial.

Os genes de suscetibilidade (genes-S), ao contrário dos genes-R, são genes que podem auxiliar os patógenos, facilitando a infecção ou suportando sua compatibilidade. Isto indica que em uma interação compatível, quando o patógeno tem sucesso na sua infecção, a suscetibilidade não é resultado unicamente de uma falta de uma resposta de defesa, mas também de uma regulação positiva de fatores que favorecem o desenvolvimento do patógeno. Hoje sabe-se que além de se utilizarem destes fatores, estes patógenos podem ainda modulá-los para aumentar sua expressão e terem uma maior disponibilidade destes “ajudantes”. Outra característica importante de alguns destes genes é que eles são relativamente conservados entre as diversas espécies vegetais e são utilizados por uma ampla gama de patógenos (GORSHKOV; TSERS, 2022; VAN SCHIE; TAKKEN, 2014).

A perda da função destes genes-S, seja naturalmente ou por técnicas biotecnológicas, como nocaute (via CRISPR/Cas9) e silenciamento (via RNA de interferência, *Virus-Induced Gene Silencing* ou *Antisense oligonucleotides*), pode

conferir resistência duradoura, pois codificam fatores limitantes e de difícil superação; e de amplo espectro às doenças, visto que podem ser utilizados por mais de um patógeno, sendo, portanto, alvos ideais para programas de melhoramento (PATIL; JANGRA; GHOSH, 2024; SUN et al., 2016; TÁVORA et al., 2021).

A primeira etapa no melhoramento é a identificação destes genes, que pode ser realizada por análises RT-qPCR, quantificando a expressão gênica com alta precisão. Isto posto, o objetivo desse trabalho é prospectar genes-S em tomateiro com potencial para uso em programas de melhoramento. Os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar em estratégias de controle *S. sclerotiorum* e *V. dahliae*, visando à redução do uso de agroquímicos na produção de culturas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O tomate (*Solanum lycopersicum*)

A família Solanaceae reúne cerca de 3.000 espécies, incluindo várias com valor econômico, como batatas, beringelas, tabaco, petúnias, os representantes do gênero *Capsicum* e o tomate. Nesta família, o gênero *Solanum* destaca-se pela sua importância econômica e diversidade, podendo englobar até 1.700 espécies, que são igualmente diversas quanto as características morfológicas e ecológicas. Dentre essas espécies, destaca-se o tomate (*S. lycopersicum*) por apresentar relevância econômica global e por seus benefícios à saúde (BERGOUNOUX, 2014).

Seus frutos são extremamente versáteis na cozinha, sendo utilizados tanto *in natura*, quanto em produtos processados como em sopas, sucos e molhos. O tomate também apresenta diversos benefícios nutricionais, uma vez que possui diversos compostos importantes em sua composição, como vitaminas, carotenoides (sendo a principal fonte de licopeno) e compostos fenólicos. Estes compostos conferem ao tomate efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos, antimicrobianos, vasodilatadores, antitrombóticos, cardioprotetores e antioxidantes (QUINET et al., 2019).

Atualmente o tomate encontra-se amplamente distribuído pelo globo, sendo cultivado em ao menos 166 países, distribuídos em todos os continentes, com os mais diversos tipos climáticos e solos. Sendo a hortaliça mais importante em termos econômicos e a segunda mais produzida, considerando área de produção e quantidade produzida (atrás apenas da batata), possuindo, portanto, uma imensa

importância econômica (FAOSTAT, 2023). No Brasil, o tomate figura como uma das hortícolas mais importantes em termos de valor de produção e área plantada, tendo sua produção concentrada nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Paraná, que detêm juntos 73% da área plantada e 78% da produção (IBGE, 2022).

As espécies selvagens de tomate são originárias da região oeste da América do Sul, abrangendo uma área que vai do Equador, incluindo o centro e Galápagos, passando pelo Peru e indo até o norte do Chile, sendo encontradas desde a costa (ao nível do mar), até o alto dos Andes (3.330 m), estando adaptadas, portanto, a diversas condições climáticas e tipos de solo (BERGOUNOUX, 2014; RAMÍREZ-OJEDA et al., 2021).

Evidências genômicas sugerem que a evolução e domesticação do tomate cultivado se deu por meio de um processo complexo, envolvendo uma domesticação prévia, reversões em frequências alélicas e, finalmente, uma re-domesticação (RAZIFARD et al., 2020). Este processo deu origem a plantas herbáceas, com caule flexível e piloso, sistema radicular vigoroso, com raízes concentradas nos primeiros 20 cm de solo, e possuem diferentes hábitos de crescimento - indeterminado, semi-determinado e determinado (NICK; SILVA, 2018; THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012; VICENTE et al., 2015). Como resultado adverso deste processo, o tomate cultivado perdeu vários genes de interesse agrônomo, em razão de uma seleção intensiva e uma grande dispersão global, fazendo com que por volta de 1960 o pangenoma deste vegetal fosse quase geneticamente uniforme, havendo menos de 5% de variabilidade genética. Por outro lado, seus 12 parentes selvagens da seção *Lycopersicon* são geneticamente diversos, principalmente os que possuem polinização cruzada, e vêm sendo utilizados como linhagens doadoras em programas de melhoramento. Variedades de *Solanum pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. hirsutum* e *S. chilense* vêm sendo frequentemente explorados como boas fontes para doação de características organolépticas e de resistência a fatores bióticos e abióticos (BERGOUNOUX, 2014; DE WIT, 2024; PERALTA; SPOONER, 2001).

O sequenciamento completo do genoma, revelou um genoma diploide (2n) com 900 Mb e mais de 30.000 genes codificando proteínas, e se constituiu como um marco na pesquisa e no melhoramento genético dessa espécie. A compreensão detalhada da estrutura e função do genoma permite identificar genes associados a

características de interesse agrônomo, abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento de cultivares com melhores características (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012).

Os programas de melhoramento genético do tomate têm como objetivo principal aumentar a produtividade e a qualidade dos frutos incorporando características desejadas e removendo fatores que possam contribuir negativamente no fenótipo desejado. Neste contexto, faz-se necessário que se desenvolvam plantas resistentes aos fatores bióticos e abióticos que afetam negativamente a produtividade desta cultura (KISSOUDIS et al., 2015). Dentre os fatores bióticos destacam-se insetos, nematoides, vírus, bactérias, fungos e oomicetos que podem promover enormes danos à cultura e reduzir substancialmente sua produção (CARUSO et al., 2022; JONES et al., 2004; LANGE; BRONSON, 1981; SEID et al., 2015; SINGH; SINGH; KUMAR, 2017). Atualmente são descritos mais de 200 pragas e doenças causadas por estes agentes infecciosos. Dentre estes agentes, os fungos fitopatogênicos, como os ascomicetos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium dahliae*, são certamente o maior fator limitante no cultivo destes vegetais, visto que em condições favoráveis e na presença de um hospedeiro suscetível estes organismos podem causar severas reduções na produtividade e, conseqüentemente, enormes danos econômicos (KUMAR; SRINIVASULU; BABU, 2018).

2.2 Doenças fúngicas que afetam o tomate

Doenças fúngicas do solo e foliares são um fator limitante na produção de tomate. Dentre estas destacam-se doenças causadas pelos patógenos *S. sclerotiorum* e *V. dahliae* (KUMAR; SRINIVASULU; BABU, 2018; SINGH; SINGH; KUMAR, 2017).

2.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

O ascomiceto *S. sclerotiorum* (Lib.) De Bary é um fitopatógeno hemibiotrófico, responsável pela doença denominada como mofo-branco, ou podridão de esclerotínia, uma das doenças mais destrutivas em tomateiro. Esta doença pode causar tombamento em plântulas, mas é especialmente danosa em estágios mais avançados

da cultura, principalmente durante a floração. Estes danos estão relacionados a uma rápida degradação dos tecidos das plantas após o estabelecimento da infecção, que inicialmente ficam encharcados e cobertos de micélios cotonosos, e, após a necrose completa, tornam-se secos, descoloridos e murchos. Naturalmente este patógeno é transmitido pelo solo, principalmente através de suas estruturas de resistência, os escleródios, que podem germinar de forma miceliogênica (forma assexuada) ou carpogênica (forma sexuada), dependendo das condições ambientais. Os escleródios germinados de forma miceliogênica produzem hifas que atacam os tecidos logo acima do solo, onde, presumivelmente, a área do colo é mais afetada, causando sintomas reflexos, como murcha e amarelecimento das plantas. Já quando germinam de forma carpogênica, os ascósporos, produzidos em apotécios, são dispersados pelo ar e germinam quando depositados na superfície da planta, principalmente em flores ou partes florais. Apesar destas preferências por tecidos ou regiões específicas, o fitopatógeno pode colonizar basicamente qualquer tecido da planta (HAMMAMI et al., 2013; MAZUMDAR, 2021; ZHU et al., 2024).

Fatores como variabilidade genética relativamente alta, ampla gama de hospedeiros (mais de 450, com preferência por dicotiledônias) e falta de boas fontes de resistência natural no germoplasma de tomate fazem com que o controle deste fitopatógeno se torne um enorme desafio (DERBYSHIRE et al., 2022; LEHNER; MIZUBUTI, 2017; MAZUMDAR, 2021; SILVA et al., 2021). Diversas estratégias como, sanitização de implementos e ferramentas, solarização do solo, rotação de culturas, adição de matéria orgânica ao solo etc., vêm sendo empregadas no seu controle. Entretanto o controle químico ainda se apresenta como a alternativa mais utilizada no campo (MAZUMDAR, 2021).

A obtenção de variedades de tomate resistentes é um dos pilares dos programas de manejo de doenças. A exploração do germoplasma de tomate, combinada com o conhecimento dos mecanismos de virulência do patógeno e de resistência ou suscetibilidade das plantas permite com que se identifique fatores de resistência ou suscetibilidade e os incorpore ou elimine, respectivamente, de novas cultivares. Essas plantas, além de serem mais tolerantes ou resistentes às doenças, podem ser integradas com outras estratégias de manejo.

A virulência de *S. sclerotiorum* é determinada por uma ampla gama de processos moleculares (DERBYSHIRE et al., 2022). Os principais fatores de patogenicidade conhecidos são o ácido oxálico, as enzimas degradadoras de parede celular e as proteínas efetoras. O ácido oxálico é uma fitotoxina inespecífica que se mostra um fator chave na patogênese de alguns fungos com fase necrotrófica, sendo secretado em grandes quantidades no início da infecção. Inicialmente este ácido pode bloquear o fechamento de estômatos, criar um ambiente redutor (garantindo um tempo precioso para o estabelecimento da interação inibindo as respostas de defesa, como a explosão oxidativa e a deposição de calose), além de evitar a morte por autofagia. Assim que a infecção é estabelecida o fungo transiciona para um novo estio de vida, e o ácido oxálico assume a função de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que desencadeia uma morte celular programada por apoptose. Além disso, a secreção de enzimas degradadoras de parede celular, como poligalacturonases, e efetores, como *SsITL*, *SsNEP1* e *SsCP1* podem ainda contribuir para a patogenicidade deste fungo (DERBYSHIRE et al., 2022; KABBAGE; WILLIAMS; DICKMAN, 2013; YANG et al., 2018).

Ainda não foram relatados genes de resistência contra *S. sclerotiorum* no germoplasma de tomate. Para outras culturas, são relatados casos em que a resistência é regulada por vários genes com efeitos aditivos, frequentemente localizados em *locus* de caracteres quantitativos (*quantitative trait locus* - QTLs), o que confere uma resistência parcial ao patógeno (MAZUMDAR, 2021). Em um estudo recente Einspani et al. (2024) encontraram fontes de resistência em *locus* de característica quantitativa (*quantitative trait locus*-QTLs) em alguns parentes selvagens de tomate. Estes QTLs podem ser utilizados em futuros programas de melhoramento, mas ainda assim os mecanismos envolvidos nesta resistência precisam ser mais bem compreendidos e o processo de melhoramento pode ser um pouco demorado, sendo necessário que se avaliem outras estratégias para o melhoramento.

2.2.2 *Verticillium dahliae*

O *V. dahliae* é um fungo aparentemente assexual, hemibiotrófico e de alcance global, responsável por murchas vasculares em mais de 200 espécies vegetais,

sobretudo em eudicotiledônias. As murchas causadas por *V. dahliae* se constituem como uma das doenças mais significativas em culturas anuais e plantas hortícolas, afetando várias plantas de importância econômica, incluindo muitas solanáceas, como o tomate (ACHARYA et al., 2020; BUHTZ et al., 2017; HU et al., 2019; INDERBITZIN; SUBBARAO, 2014).

O ciclo da doença inicia-se com os microescleródios (MS), estruturas de sobrevivência que podem permanecer viáveis no solo por mais de 10 anos, mesmo na ausência do hospedeiro. Esses MS germinam em resposta aos exsudatos radiculares, originando micélios germinativos, que penetram no córtex e na endoderme das raízes através das pontas radiculares ou das regiões de formação de raízes laterais. Durante o desenvolvimento do patógeno, os micélios se multiplicam e bloqueiam o fluxo de água no xilema. Esse bloqueio, junto com a secreção de micotoxinas, como o complexo ácido de proteína-lipopolissacarídeo, e enzimas degradadoras de parede, como polissacarídeo-liases, facilita a superação das defesas das plantas pelo patógeno, permitindo sua proliferação no xilema. Com a infecção estabelecida, o *V. dahliae* produz conídios, que são transportados acropetalmente pelo fluxo de transpiração através do xilema e depositados em locais mais distantes do local de infecção, onde irão germinar, infectar e colonizar novos tecidos, repetindo o ciclo até a percepção dos sintomas (ACHARYA et al., 2020; SONG et al., 2020; WITZEL; BUHTZ; GROSCH, 2017).

Em cultivares suscetíveis de tomate, a doença manifesta-se inicialmente nas folhas inferiores, com clorose e lesões necróticas em 'V' nas bordas, seguidas de halos amarelados que se expandem, escurecendo ou arroxeados as nervuras e culminando na morte foliar. A progressão da doença afeta o transporte de água e nutrientes pela planta, resultando em murcha, crescimento atrofiado e, em casos graves, na morte da planta. Esses sintomas são causados pela obstrução dos vasos condutores e pela ação de toxinas produzidas pelo patógeno (ACHARYA et al., 2020; SONG et al., 2020).

A gravidade dos sintomas, associada à ampla gama de hospedeiros e à persistência dos MS no solo, restringem as opções e tornam o controle dessa doença um desafio complexo. As estratégias de manejo podem ser direcionadas tanto ao solo quanto às plantas. No manejo do solo, destacam-se a desinfestação anaeróbica, a solarização, a fumigação, a adição de aditivos orgânicos e o uso de culturas de

cobertura. Já no manejo cultural, a enxertia, a rotação de culturas com plantas não hospedeiras e o uso de cultivares resistentes são práticas importantes. Idealmente, a melhor solução é a resistência genética, utilizando plantas que sejam resistentes ou tolerantes à doença. Apesar das fontes de resistência serem relativamente raras em outros hospedeiros, em tomate variedades resistentes já foram desenvolvidas para uma raça de *V. dahliae* (DEKETELAERE et al., 2017; HU et al., 2019).

A estrutura populacional de *V. dahliae* que infecta tomateiros é heterogênea, com a presença de pelo menos três raças distintas. Essas raças diferem em sua virulência e especificidade de hospedeiro, permitindo que sejam distinguidas pelo uso de variedades diferenciais. Algumas variedades possuem o gene *Ve1* funcional. Este gene foi inicialmente identificado em *Solanum pimpinellifolium* L. e posteriormente transferido por introgressão para as variedades comerciais de tomate. Sabe-se que seu produto é uma proteína transmembrana putativa que provavelmente pertence à classe das receptor-like proteins (RLPs) (CASTROVERDE et al., 2017; DEKETELAERE et al., 2017). Esta proteína transmembrana reconhece o efector *VdAve1*, sintetizado por isolados classificados como raça 1, e desencadeia a resposta de defesa (ACHARYA et al., 2020; DE JONGE et al., 2012).

Devido ao uso extensivo de cultivares resistentes, a resistência à raça 1 foi rapidamente superada no campo, permitindo que uma nova raça, inicialmente denominada “raça 2”, prevalecesse (KLOSTERMAN et al., 2009). Aparentemente os isolados da raça 2 perderam totalmente o locus *VdAve1* em eventos independentes (CHAVARRO-CARRERO et al., 2021). Isto possibilitou que indivíduos desta nova raça superassem a resistência, em variedades antes resistentes como a ‘Floradade’. Então, variedades como a variedade ‘Ponderosa’ (suscetível as raças 1 e 2) e ‘Floradade’ (resistente a raça 1, pois expressa o gene *Ve1*) puderam ser utilizadas para classificar isolados de *V. dahliae* (REIS; BOITEYX; COSTA, 2007; SUASTE-DZUL et al., 2023).

Desde a emergência da raça 2 alguns esforços vêm sendo empreendidos para identificação de fontes de resistência e desenvolvimento de variedades resistentes, entretanto ainda não há nenhuma variedade resistente disponível para os produtores. Uma das soluções encontradas foi o uso de porta-enxertos feitos a partir do *Solanum neorickii*, uma espécie em que se identificou uma fonte de resistência. A resistência

dessa variedade se deve a um único gene dominante, chamado V2. Esse gene detecta uma proteína específica do patógeno (Av2). Até agora, só são conhecidas duas versões ligeiramente diferentes desse gene do patógeno (com diferença em apenas um ácido nucleico). No entanto, a resistência mostrou-se instável em diferentes porta-enxertos, com alguns isolados superando-a, o que levou à proposição de uma nova raça, a 'raça 3' (CHAVARRO-CARRERO et al., 2021; TABAEIZADEH et al., 1999; USAMI et al., 2017).

Diante disso, conclui-se que: 1) A dinâmica evolutiva dos patógenos impacta diretamente o desenvolvimento de cultivares resistentes; 2) Resistências qualitativas, controladas por um único *locus* gênico, são suscetíveis à quebra por mutações nos patógenos; 3) É fundamental que se encontrem resistências de espectro mais amplo para o manejo sustentável da doença. Na busca por estas resistências é imprescindível que se conheça as relações estabelecidas entre os patógenos e seus hospedeiros em interações compatíveis e incompatíveis.

2.3 Interação planta-patógeno

A interação entre plantas e patógenos se constitui de um processo complexo e é condicionado a diversos fatores, o que possibilita diversas abordagens sobre o tema. Uma dessas abordagens envolve o modo de nutrição dos patógenos. Os patógenos podem ser considerados biotróficos, quando extraem seus nutrientes exclusivamente de células vivas, utilizando estruturas especializadas conhecidas como haustórios; necrotróficos, quando matam a célula produzindo fitotoxinas e/ou enzimas degradadoras de parede celular, para só então absorverem os nutrientes; ou ainda, hemibiotróficos, quando possuem uma fase inicial biotrófica, onde modulam a compatibilidade com a célula vegetal, e uma segunda fase necrotrófica, onde agem como patógenos necrotróficos. Esta abordagem permite perceber que os alvos moleculares dos patógenos são diferentes, e, portanto, os mecanismos de defesa das plantas também devem ser (MCCOMBE et al., 2022; OLIVER, 2024).

De fato, os mecanismos que tornam as plantas resistentes ou suscetíveis, e os patógenos virulentos ou avirulentos, decorrem de um processo complexo de coevolução, onde as plantas e os patógenos travam uma verdadeira guerra e evoluem

paralelamente buscando obter novas armas para combater o arsenal inimigo (BURDON; THRALL, 2009; KAZAN; LYONS, 2014).

Mas ainda assim, nesta guerra, as plantas normalmente ganham mais batalhas, visto que as doenças são encaradas como eventos quase excepcionais, uma vez que naturalmente as plantas são expostas a um grande número de patógenos, mas só são suscetíveis a poucos deles. Diferentes mecanismos de resistência pré e pós formados, estruturais ou bioquímicos, incluindo inclusive mesmo mecanismos de hipersensibilidade, garantem que os patógenos não tenham sucesso na sua infecção (OLIVER, 2024; SINGH; SINGH, 2018).

Para causar doença, os patógenos devem vencer diversas camadas de defesa das plantas. As defesas pré-formadas constituem a primeira camada a ser enfrentada. Essas defesas existem mesmo antes do contato do patógeno com a planta. A própria superfície dos tecidos vegetais já se apresenta como um impedimento a adesão e penetração dos patógenos. Dentre os fatores que podem ser impeditivos à infecção dos patógenos destacam-se a presença de ceras; a estrutura da cutícula e da célula; a quantidade, conformação e localização de estômatos e de outras células modificadas; etc. Mesmo assim alguns patógenos podem ser capazes de transpor estas defesas físicas, seja de modo passivo, se aproveitando de ferimentos e aberturas naturais como estômatos, ou de forma ativa, como no caso das hifas modificadas de fungos denominadas de apreensórios, que são capazes de exercer uma grande força e romper essa proteção. Quando isso acontece os patógenos ainda se deparam com um enorme arsenal de compostos químicos pré-formados, como enzimas extracelulares, que podem dificultar o desenvolvimento dos patógenos. (OLIVER, 2024).

Quando os patógenos entram em contato com a superfície das células, as plantas são capazes de induzir uma nova camada de defesa, que funciona molecularmente. Inicialmente, as células podem reconhecer alguns padrões relacionados a presença de patógenos, tais como: 1) *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), também conhecidas por *Microbe-Associated Molecular Patterns* (MAMPs), como lipopolissacarídeos, flagelina, peptidoglicanos, quitina fúngica, etc.; 2) *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), como fragmentos de parede celular, “*Systemin*”, peptídeos elicitores de plantas (Peps), ATP extracelular (eATP),

etc; ou ainda, 3) *Nematode-Associated Molecular Patterns* (NAMPs), que podem ser componentes da cutícula, secreções extracelulares, ou até a quitina presente nos ovos desses patógenos. Estes padrões, que são conservados nos grupos de patógenos, são reconhecidos por PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Alguns exemplos são os *receptor-like kinases* (RLKs) e os *receptor-like proteins* (RLPs), que estão dispostos nas superfícies celulares, prontos para reconhecer ameaças no espaço extracelular. Quando reconhecem alguma ameaça, uma resposta de defesa denominada de *PAMP-triggered immunity* (PTI) é ativada. A via da PTI ativa as defesas basais e de amplo espectro nas plantas, induzindo a produção de EROs, a secreção de compostos antimicrobianos, como quitinases e glucanases, que podem destruir as paredes das células dos patógenos, além de induzir a fortificação das paredes celulares das plantas. (CHOI; KLESSIG, 2016; HAN, 2019; KALOSHIAN; TEIXEIRA, 2019; KAZAN; LYONS, 2014; VAN SCHIE; TAKKEN, 2014).

Entretanto, para contrapor esta via de defesa, os patógenos adquiriram ferramentas que os dão a capacidade de suprimir a PTI. Essa supressão se deve em grande parte ao desenvolvimento de moléculas efetoras. Esses efetores têm a capacidade de interferir na detecção, na sinalização ou na defesa que seria desencadeada pela planta. As plantas, por outro lado, também desenvolveram mecanismos para contra-atacar os efetores, os genes de resistência (genes-R). A maior parte destes genes-R codificam proteínas denominadas de *NOD-like receptors* (NLRs) para o reconhecimento destes efetores patogênicos. Estes NLRs são receptores de local de ligação a nucleotídeos ricos em repetições de leucina, anteriormente conhecidos pela sigla NB-LRR (*nucleotide-binding site leucine-rich-repeat*). Estas proteínas agem ligando-se diretamente aos efetores ou ainda reconhecendo alterações mediadas pelos efetores em outros componentes celulares e ativam a via conhecida como *effector-triggered immunity* (ETI), que frequentemente desencadeia respostas de hipersensibilidade. Por ser ativada através do reconhecimento de efetores específicos por proteínas específicas, a ETI tende a ser mais raça específica, ou no máximo espécie específica (BARRAGAN; WEIGEL, 2021; HAN, 2019; KAZAN; LYONS, 2014; LOCCI; PARKER, 2024; VAN SCHIE; TAKKEN, 2014).

Essas duas vias ativam conjuntamente a Resistência Sistêmica Adquirida [*systemic acquired resistance* (SAR)] (GHOZLAN et al., 2020). E apesar de serem

tratadas como dois ramos distintos no sistema imunológico, evidências recentes sugerem que há uma interdependência e sobreposição entre os componentes da PTI e da ETI. Este fenômeno é confirmado em casos em que há o reconhecimento de derivados de proteínas efetoras por PRRs, e em constatações, como o fato de que algumas proteínas do hospedeiro têm função nas duas vias e que ambas as vias compartilham característica como a produção de EROs e o influxo de cálcio (BARRAGAN; WEIGEL, 2021; OLIVER, 2024). No entanto, quando ambas as vias são superadas, seja pela falta de componentes necessários ao reconhecimento dos patógenos, ou pela reprogramação do transcriptoma, proteoma ou o conjunto de hormônios da planta pelos efetores dos patógenos, a interação torna-se suscetível e, portanto, há doença (KAZAN; LYONS, 2014).

Este sistema multicamadas, apesar de ser bastante efetivo contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos, é facilmente superado por patógenos necrotróficos. Isso se deve principalmente aos mecanismos de virulência destes patógenos que, basicamente, se apoiam na produção de toxinas inespecíficas, toxinas específicas do hospedeiro (*Host-specific toxins* - HSTs), enzimas supressoras e degradadoras de parede celular e outros compostos tóxicos. Estes mecanismos de virulência funcionam, de modo geral, desprezando mecanismos das vias da PTI e da ETI. Algumas HSTs de patógenos necrotróficos podem ainda cooptar o reconhecimento de um NLR e induzir a morte celular, disponibilizando assim os nutrientes para serem consumidos (FRIESEN et al., 2008; MCCOMBE et al., 2022). Assim as respostas de defesa ficam limitadas a interações entre os fitormônios das plantas (GHOZLAN et al., 2020).

2.4 O papel dos fitormônios na interação suscetível

Os fitormônios são uma classe de pequenas moléculas que regulam diversos aspectos no crescimento, desenvolvimento, reprodução e resposta das plantas aos estresses (DENANCÉ et al., 2013). Hormônios, como ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ), auxinas, brassinosteroides (BRs), citocininas (CKs), etileno (ET) e giberelinas (GAs) respondem à estresses de forma sinérgica ou antagônica em uma rede complexa e intensamente integrada. Estas moléculas são capazes de desencadear mudanças morfológicas, fisiológicas e moleculares em

resposta aos estresses e podem inclusive serem transportados e distribuídas para regiões diferentes das que foram produzidos (CHECKER et al., 2018).

O papel das interações entre esses fitormônios na regulação das respostas planta-patógeno ainda não está totalmente claro. De modo geral, os principais fitormônios envolvidos nestas respostas são o AS, o AJ e o ET. O SA é fundamental na defesa contra patógenos (hemi)-biotróficos; enquanto a relação entre AJ/ET é fundamental na defesa contra patógenos necrotróficos e o AJ sozinho é importante na defesa contra herbívoros. Entretanto, está cada vez mais claro que a participação dos outros hormônios, diretamente ou indiretamente, são essenciais e podem modular a resposta das plantas aos patógenos. Essas interações cruzadas, conforme demonstrado na figura 1, inclusive são utilizadas pelos efetores dos patógenos para modular a resposta de defesa das plantas. (KAZAN; LYONS, 2014; MA; MA, 2016). Isto indica que os patógenos podem modular ou se aproveitar das vias de defesa da planta para terem sucesso no seu desenvolvimento. Os genes que podem de alguma forma ajudar os patógenos podem ser considerados genes de suscetibilidade (genes-S).

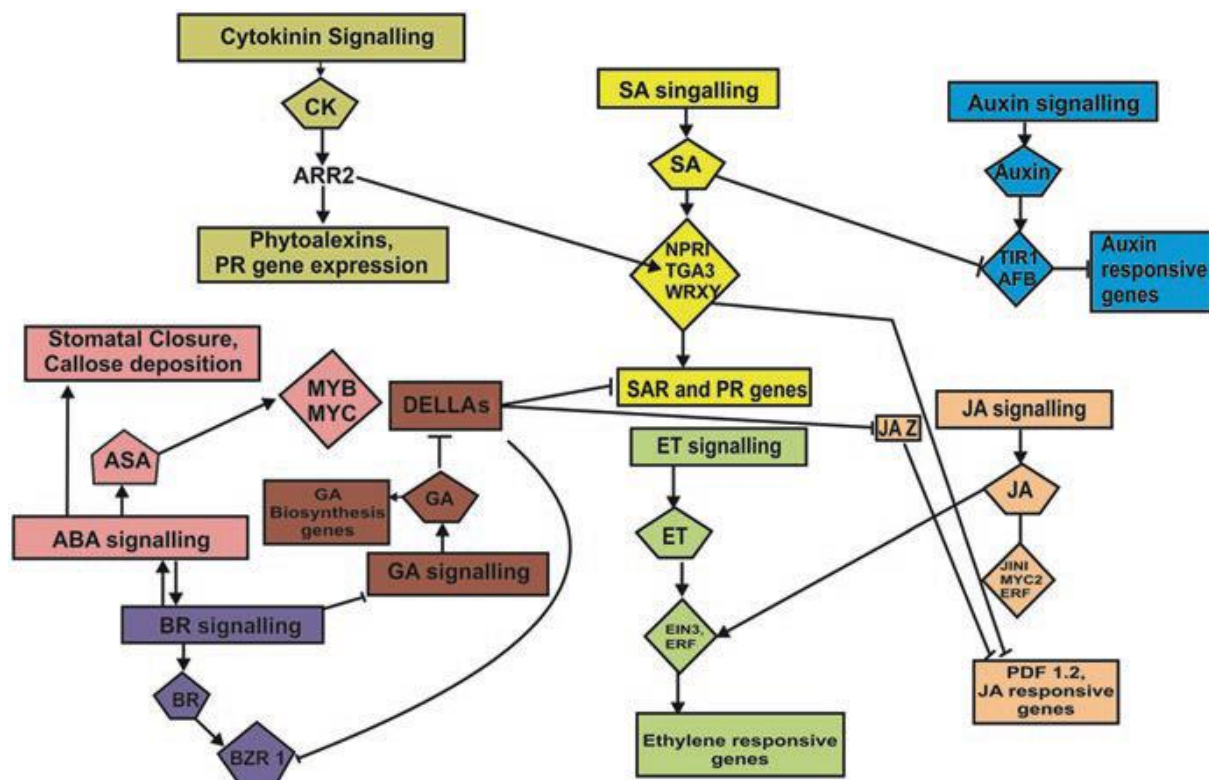


Figura 1. Esquema de interações “Cross talk” de fitormônios na resposta ao estresse biótico em plantas. Fonte: Checker et al. (2018)

2.5 Os genes de suscetibilidade (genes-S).

Os genes-S são aqueles genes em plantas que facilitam a infecção e promovem a compatibilidade com patógenos. Apesar destes genes pertencerem a diversas famílias e terem diversas funções, eles podem ser agrupados, com base nos processos nos quais estão envolvidos, em três principais categorias. A primeira reúne todos os genes que podem facilitar a penetração do patógeno, a segunda aqueles que podem suprimir respostas de defesa e o terceiro agrupa os que permitem a compatibilidade dos patógenos (GORSHKOV; TSERS, 2022; VAN SCHIE; TAKKEN, 2014).

Os genes da primeira categoria atuam no estágio de pré-invasão, não sendo, portanto, inicialmente modulados pelos patógenos, porém é possível que durante a colonização estes genes sejam modulados para permitir novos sítios de penetração. Genes que controlam funções como abertura estomática ou que se relacionam com a composição e organização das paredes celulares podem ser incluídos neste grupo. Os genes da segunda categoria são induzidos pelo patógeno para forçar a planta a

produzir proteínas que reprimem a resposta da planta, aqui genes podem ser ativados tanto para metabolizar, quanto para catabolizar substâncias químicas, ou ainda bloquear a expressão de genes envolvidos na resposta de defesa. Já os genes da terceira categoria também são induzidos pelos patógenos, mas aqui o objetivo é garantir o progresso e a propagação do patógeno, genes que podem ser utilizados para fornecer nutrientes, transportar água e nutrientes, induzir da morte celular programada, promover alterações nas células, transportar seus efetores, etc. (GORSHKOV; TSERS, 2022; KOSEOGLOU et al., 2022).

Estes genes da terceira categoria também são responsáveis pelo desenvolvimento de sintomas nas plantas, chamados de respostas suscetíveis. Esses sintomas podem ser resultado de uma tentativa do patógeno de alterar um processo fisiológico, criando um ambiente propício para seu desenvolvimento, ou ainda de um processo de defesa da planta. Isto implica dizer que a suscetibilidade é o resultado da regulação positiva de genes-S, sendo, portanto, mediada por patógenos que possuem a capacidade de modular estes genes (GORSHKOV; TSERS, 2022). Mutações ou edições que levem a perda de função de um gene-S podem, portanto, limitar a capacidade dos patógenos de causar doenças.

O fato de serem essenciais no desenvolvimento das doenças tornam estes genes fonte de interesse para programas de melhoramento. No melhoramento tradicional genes-R, em sua maioria NLR dominantes, são incorporados ao genoma de plantas suscetíveis através de cruzamentos entre parentais resistentes e parentais com características agronômicas adequadas. Apesar de ser uma metodologia consagrada e muito usual, plantas com este tipo de resistência estão muito propensas a perda de resistência, uma vez que estes genes reconhecem efetores muito específicos para o desencadeamento da ETI, bastando apenas pequenas modificações nos efetores dos patógenos para superação deste tipo de resistência. Por outro lado, a resistência mediada pelos genes-S é recessiva e sua superação tende a ser de amplo espectro, pois os fatores que são codificados por estes genes são conservados e utilizados da mesma forma por diversos patógenos, e duradora, pois para sua superação é necessário que o patógeno supere a dependência de algum fator do hospedeiro (VAN SCHIE; TAKKEN, 2014; ZAIDI; MUKHTAR; MANSOOR, 2018).

A primeira etapa para utilização destes genes no melhoramento é a sua identificação. Inicialmente os genes-S foram encontrados através da seleção de plantas resistentes com alelos recessivos em populações selvagens ou mutagênicas. Entretanto, esta estratégia exige uma grande carga de trabalho, o que pode limitar a sua utilização em alguns casos. Atualmente, a transcriptômica e a proteômica podem fornecer dados que indicam a presença de fatores de suscetibilidade, pois em interações compatíveis a tendência é que os patógenos possam induzir um aumento na produção de transcritos e consequentemente de proteínas nos tecidos infectados do vegetal. Outra forma possível de identificação destes genes se baseia na conservação destes genes entre as espécies, fazendo com que alguns destes genes possam ser encontrados de forma ortóloga em plantas geneticamente distantes (TÁVORA et al., 2021; VAN SCHIE; TAKKEN, 2014; ZAIDI; MUKHTAR; MANSOOR, 2018). A estratégia de buscar genes-S ortólogos é eficaz, porém condicionada à disponibilidade de um genoma completamente sequenciado ou com alta cobertura do organismo em estudo. Essa condição é essencial para realizar comparações robustas entre as sequências do gene-S e os genes presentes no genoma de referência (LI et al., 2023).

Após a identificação dos genes associados à suscetibilidade, técnicas de silenciamento gênico, como *antisense oligonucleotides* (ASOs), *virus induced gene silencing* (VIGS) e RNA interferente (RNAi), podem ser empregadas para validar experimentalmente suas funções. A confirmação de sua função em processos de suscetibilidade abre caminho para técnicas biotecnológicas para o controle dos patógenos, como o uso de ASOs para modular negativamente a expressão destes genes, ou mesmo com nocaute destes genes por meio de ferramentas como CRISPR-Cas9 (PATIL; JANGRA; GHOSH, 2024; SUN et al., 2016; TÁVORA et al., 2021). No entanto, a conservação evolutiva dessas sequências genéticas sugere papéis essenciais em processos fisiológicos, o que pode resultar em efeitos pleiotrópicos negativos ao serem inativados, o que configura um fator limitante na utilização destas ferramentas (VAN SCHIE; TAKKEN, 2014; ZAIDI; MUKHTAR; MANSOOR, 2018). Uma alternativa promissora para o manejo da resistência pode envolver a modulação das respostas de suscetibilidade, em vez da completa inativação gênica (GORSHKOV; TSERS, 2022).

Desta forma, o conhecimento das funções dos genes-S e a análise de sua expressão em interações suscetíveis é fundamental para o entendimento de quais estratégias podem ser utilizadas no controle dos patógenos.

2.6 Estudo da expressão diferencial de genes por RT-qPCR

A RT-qPCR é uma técnica altamente sensível e específica, que vem sendo empregada como uma ferramenta essencial para a compreensão de processos biológicos complexos, devido a sua capacidade de quantificar a expressão gênica com alta precisão. Esta técnica envolve três etapas básicas: 1) A transcriptase reversa (RT), onde converte-se moléculas de RNA em moléculas de cDNA (DNA complementar); 2) Amplificação do cDNA usando PCR (Reação em Cadeia da Polimerase); e 3) Detecção e quantificação dos produtos da amplificação em tempo real (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006).

A detecção e quantificação são possíveis graças à presença de um sistema de detecção óptica nos instrumentos de qPCR. Durante a reação, moléculas fluorescentes, ligadas especificamente às sequências de DNA alvo, emitem luz quando excitadas por uma fonte luminosa. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de moléculas de DNA no início da reação e ao número de ciclos de amplificação. Assim como na PCR convencional o número de moléculas deve dobrar a cada ciclo. A diferença entre o valor obtido e o valor esperado de amplificação entre os ciclos define a eficiência da reação, que pode ser utilizada para calcular mais precisamente a quantidade de DNA inicial (KUBISTA et al., 2006).

Neste contexto, a análise de expressão diferencial busca comparar os níveis de expressão gênica (mRNAs) entre dois ou mais grupos de amostras com diferentes condições, o que possibilita que se identifique a expressão de genes em um processo biológico específico ou ainda as respostas de um gene a diferentes tratamentos (ROSATI et al., 2024).

Por ser uma técnica muito sensível, alguns erros naturais podem ser facilmente agravados por variações no substrato inicial entre as amostras. Caso estes erros não sejam corrigidos, a precisão da quantificação será comprometida e os resultados serão mal interpretados (LØVDAL; LILLO, 2009). Um método muito utilizado para minimizar estes erros é o uso de genes normalizadores, que consiste na utilização de

genes que se expressam de forma relativamente constante em diferentes condições experimentais ou tipos de células, podendo, portanto, atuar como um controle interno, garantindo que as variações observadas na expressão dos genes de interesse não sejam devidas a variáveis técnicas, mas sim a diferenças biológicas reais (MÜLLER et al., 2015). Para isso diversas ferramentas vêm sendo empregadas para a quantificação da estabilidade destes genes.

Neste estudo, a análise da expressão diferencial tem o objetivo de analisar as possíveis alterações na expressão dos prováveis genes-S, para assim validar a sua função na suscetibilidade. Estudos para validação destes genes por RT-qPCR são amplamente utilizados, inclusive para a complementação de estudos proteômicos e genômicos e para a confirmação do silenciamento ou nocaute gênico (KOSEOGLOU et al., 2022; SUN et al., 2016; TÁVORA et al., 2021; ZAIDI; MUKHTAR; MANSOOR, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi validar genes potencialmente envolvidos na suscetibilidade em tomateiro suscetível nas interações compatíveis com *S. sclerotiorum* e *V. dahliae*.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar genes-S reportados na literatura em diferentes interações tomateiro-patógeno;
- Analisar expressão diferencial dos potenciais genes-S de tomate nas interações compatíveis com *S. sclerotiorum* e *V. dahliae*;
- Identificar genes a serem utilizados em estudos futuros de silenciamento gênico ou nocaute via CRISPR/Cas9.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de potenciais genes-S e genes normalizadores

Os genes-S candidatos foram selecionados a partir de estudos anteriores, disponíveis na literatura (Tabela 1), onde genes específicos foram atribuídos a suscetibilidade de plantas, ou onde transcritos e proteínas não relacionados a resistência ou a estresses foram regulados positivamente ou mais abundantes em interações compatíveis. Estes candidatos foram encontrados tanto em estudos com a interação entre tomate com outros patógenos, quanto através de genes ortólogos descritos para patossistemas com outros vegetais. Os genes ortólogos são genes em diferentes espécies que se originaram de um ancestral comum e foram separados por um evento de especiação. Tendo portanto similaridades nas sequências, e consequentemente nas proteínas.

Para isso, inicialmente encontrou-se genes homólogos utilizando programas de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponíveis nas plataformas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e do *Solanaceae Genomics Network*. Estes programas foram utilizados para comparação tanto de nucleotídeos com nucleotídeos, quanto de nucleotídeos para proteínas. Foram selecionados os genes que apresentaram similaridade superior a 50%, salvo em casos em que as proteínas resultantes destes genes, mesmo que com baixa similaridade, já haviam sido descritas em estudos prévios confirmando função na suscetibilidade. Em seguida todos os genes foram analisados individualmente para relacionar as proteínas codificadas por estes genes quanto a semelhança e funcionalidade em relação a proteína do gene original. Estes genes identificados foram nomeados ou renomeados com o prefixo "Sl", para *Solanum lycopersicum*, seguido da sigla referente ao nome mais usual do gene e de um número progressivo para genes proximalmente relacionados.

Os genes *Methylated histone binding (PHD)* e *Small nuclear ribonucleoprotein family protein (LSM7)*, são genes endógenos descritos como estáveis e foram utilizados como normalizadores da reação (MÜLLER et al., 2015; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002; SOUSA, 2020).

4.2 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados com auxílio da ferramenta *PrimerQuest™* (*Integrated DNA Technologies, Inc.*). Esta ferramenta permite a atribuição de parâmetros para os *primers*, que dentro de uma mesma análise devem possuir características semelhantes.

Para os parâmetros de condições de reação, definiu-se 50 mM para *Monovalent Salt* (Na⁺), 200 nM para *Primer DNA Concentration*, 3 mM para *Divalent Salt* (Mg⁺⁺) e 0,8 para *dNTP Concentration*. Nos parâmetros relativos aos critérios de *primer*, admitiu-se que a temperatura de *melting* (T_m) do *primer* ficasse entre 58 °C e 62 °C, tendo temperatura ótima em 60 °C; no conteúdo GC admitiu-se valores de 30% a 55%, com valores ótimos em 50%; para o tamanho do *primer* admitiu-se valores entre 18 e 22 pb, com valor ótimo em 20 pb. No tamanho de *amplicon* admitiu-se valores entre 130 e 150 pb.

A relação dos *primers* utilizados neste estudo está listada na Tabela 2.

4.3 Teste de estabilidade de genes de referência para raízes

Ambos os genes de referência selecionados, *SLPHD* e *SILSM7*, são bem validados como genes estáveis em folhas, porém a expressão destes genes em outros tecidos pode apresentar comportamento diferente do visualizado para os tecidos das folhas. Para confirmação da estabilidade dos genes de referência utilizou-se a ferramenta RefFinder << <https://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/>>>. Esta ferramenta recebe os valores de CT, obtidos a partir da ferramenta Real-time PCR Miner após a execução da RT-qPCR, quantifica a estabilidade dos genes e os classifica de acordo com esses resultados. Os genes de *housekeeping* devem ser mais estáveis que os alvos (XIE et al., 2012).

Tabela 1. Genes-S selecionados

Sigla em tomate (Acesso)	Descrição	Sigla original do gene	Espécie de origem do gene	Fonte	Interação
<i>SibHLH</i> (Solyc01g109700.3)	<i>Basic-Helix-Loop-Helix</i>	<i>StCHL1</i> (bHLH7)	<i>Solanum tuberosum</i>	(TURNBULL et al., 2017)	Tsc-Ss Tp-Vd
<i>SICPR5</i> (Solyc04g054170.4)	<i>Constitutive Expresser of Pathogenesis-Related Genes 5</i>	<i>AtCPR5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(GU et al., 2016; PENG et al., 2022)	Tsc-Ss
<i>SICTR2</i> (Solyc01g097980.3)	<i>Constitutive triple response 2</i>	<i>LeCTR2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(FRYE; TANG; INNES, 2001; LIN et al., 2008)	Tp-Vd
<i>SIDMR6</i> (Solyc03g080190.2)	<i>Downy Mildew Resistance 6</i>	<i>AtDMR6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(DE TOLEDO THOMAZELLA et al., 2021)	Tsc-Ss Tp-Vd
<i>SIDND1</i> (Solyc02g088560)	<i>Defense No Death 1</i>	<i>AtDND1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(LI et al., 2024b; SUN et al., 2017)	Tsc-Ss Tp-Vd
<i>SIEDR</i> (Solyc12g096050.2)	<i>Enhanced disease resistant</i>	<i>AtEDR2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(ZHAO et al., 2014)	Tsc-Ss Tp-Vd
<i>SIGR-RBP</i> (Solyc01g109660.2)	<i>Glycine-Rich RNA-Binding Proteins</i>	<i>NbRZ-1A/1B/1C & GmRZ</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> / <i>Glycine max</i>	(LU et al., 2023)	Tp-Vd
<i>SIGST</i> (Solyc09g011590.2)	<i>Glutathione S-Transferase</i>	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	(GULLNER et al., 2018; ISLAM et al., 2017)	Tsc-Ss Tp-Vd
<i>SIHDS</i> (Solyc11g069380.2)	<i>Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase</i>	<i>AtHDS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(KIEU et al., 2021)	Tp-Vd
<i>SILFG2</i> (Solyc06g084130.3)	<i>Lifeguard</i>	HvLFG / AtLFG	<i>Hordeum vulgare</i> L./ <i>Arabidopsis thaliana</i>	(WEIS; HÜCKELHOVEN; EICHMANN, 2013)	Tsc-Ss
<i>SILIN6</i> (Solyc10g083290)	<i>Invertase 6 (extracellular invertase)</i>	<i>AtLIN6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(KOCAL; SONNEWALD; SONNEWALD, 2008; LACRAMPE et al., 2021; SCHAARSCHMIDT; ROITSCH; HAUSE, 2006)	Tsc-Ss Tp-Vd
<i>SILSD1</i> (Solyc02g069720.3)	<i>Lesion simulating disease 1</i>	<i>AtLSD1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(PAVAN et al., 2009; WITUSZYŃSKA et al., 2015)	Tsc-Ss Tp-Vd
<i>SIMC7</i> (Solyc01g088710.2)	<i>Metacaspase 7 (type II)</i>	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	(BERNACKI et al., 2024; HOEBERICHTS; TEN HAVE; WOLTERING, 2003; LIU; LIU; WEI, 2016)	Tsc-Ss Tp-Vd

SIMC8 (Solyc10g081300.1)	Metacaspase 8 (type II)	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	(BERNACKI et al., 2024; HOEBERICHTS; TEN HAVE; WOLTERING, 2003; LIU; LIU; WEI, 2016)	Tsc-Ss Tp-Vd
SIRLCKVII (Solyc07g041940.3)	Receptor-like cytoplasmic kinase	TaPsIPK1 (família RLCK VII)	<i>Triticum aestivum</i>	(WANG et al., 2022)	Tsc-Ss
SISR1 (Solyc04g056270.4)	Signal-Responsive/Calmodulin-Binding Transcription Activator 1	AtSR1 / StSR4 / OsCbt	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Solanum tuberosum</i> / <i>Oryza sativa</i>	(LI et al., 2014)	Tp-Vd
SITFIIAγ (Solyc12g088030)	Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma)	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	(SOUSA et al., 2023; YUAN et al., 2016)	Tsc-Ss Tp-Vd
SITPK1b (Solyc07g041940.3)	Tomato protein kinase 1b	AtBIK1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(VERONESE et al., 2006)	Tp-Vd
SITTM2 (Solyc05g010340.3)	Triphosphate tunnel metalloenzyme	AtTTM2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(KIEU et al., 2021; UNG; MOEDER; YOSHIOKA, 2014)	Tp-Vd
SIVSP1 (Solyc06g062380.3)	Vegetative Storage Protein	AtCEV1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(ELLIS et al., 2002; ELLIS; TURNER, 2001; PAVAN et al., 2009)	Tp-Vd
SIPHD* (Solyc06g051420)	Methylated histone binding	-	-	(MÜLLER et al., 2015; SOUSA, 2024)	Tsc-Ss Tp-Vd
SILSM7* (Solyc09g009640)	Small nuclear ribonucleoprotein family protein	-	-	(MÜLLER et al., 2015; SOUSA, 2024)	Tsc-Ss Tp-Vd

Legenda:

*Genes normalizadores

Tsc-Ss – Genes utilizados para a análise na interação entre tomate (var. Santa Cruz) e *Sclerotinia sclerotiorum*

Tp-Vd – Genes utilizados para a análise na interação entre tomate (var. Ponderosa) e *Verticillium dahliae*

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados para a análise de RT-qPCR

Sigla em tomate (Acesso)	Sequência de <i>primer Forward</i> (5'-3')	Tm F (°C)	Sequência de <i>primer Reverse</i> (5'-3')	Tm R (°C)	Tamanho do amplicon
<i>SibHLH</i> (Soly01g109700.3)	TGTGACTCGGGCAATAAAG	59.8	TTCAGATGGGTGTGACATTC	59.9	130
<i>SICPR5</i> (Soly04g054170.4)	GAGTTCCAATCGGAGTCATT	59.7	TGTTGCCTTACTTGCCTATC	60	134
<i>SICTR2</i> (Soly01g097980.3)	CGGTGGATCTAGTGGGTATAA	60.4	CTAGTGAAGCAACCTCATC	59.8	141
<i>SIDMR6</i> (Soly03g080190.2)	TTGGGTGAACAAGGACAACA	62.2	GGCGTCAGGTTGAGGTTTTA	62.3	189
<i>SIDND1</i> (Soly02g088560)	CAACCTGATAACAGCGACGA	62	CAACTGGTGGAGTGGAAAAC	61	110
<i>SIEDR</i> (Soly12g096050.2)	GGGCTATGTCTCGTCATTTTC	60.1	GACTGAAGCGGATGTCATATT	60.1	145
<i>SIGR-RBP</i> (Soly01g109660.2)	TGGTCTCGTCTGAACTTACT	60.2	CAGGGTAACATCACGGTAAC	60	120
<i>SIGST</i> (Soly09g011590.2)	TTTGTGCTTGGAGAGATGAA	59.7	ATCAACAGGCTGAATGTAGG	59.7	101
<i>SIHDS</i> (Soly11g069380.2)	GATTGGCAGACCTTGGTAAA	60.2	GTCTACTTCATCACCTCCT	60.2	137
<i>SILFG2</i> (Soly06g084130.3)	GCAGCAGTTGTGCTTAGT	60.2	CCTACCCAGAGGAAACAGTA	60.2	147
<i>SILIN6</i> (Soly10g083290)	CAAGCCCGATAACAATCC	57.8	ATTCCTCACACTCCCAAC	58.7	91
<i>SILSD1</i> (Soly02g069720.3)	ACCACCTGGAATGGAAATG	59.9	GCAGTAGACATGAGCAAAC	60.2	148
<i>SIMC7</i> (Soly01g088710.2)	CCATACAGAACTCCGACTAAAC	60.2	TCCATCCACTTCATCTCCA	60	144

<i>SIMC8</i> (Solyc10g081300.1)	TACCACAAGGAGCAACATTC	60.2	ACTTGTTCTGGGACTGAGA	60	135
<i>SIRLCKVII</i> (Solyc07g041940.3)	GGTTATGCTGCTCCTGAAT	59.7	CTCTATGTGGACGACCTTTG	59.7	130
<i>SISR1</i> (Solyc04g056270.4)	AGTGCTGGAGATGGACTT	60.2	ATTTGCTGTGCTTGTTTC	60.1	132
<i>SITFIIAγ</i> (Solyc12g088030)	TGGGATGTGCTTGACTGAAA	62	CCTTGCTCTTTACTTGAGTCTC	60.4	133
<i>SITPK1b</i> (Solyc07g041940.3)	ATTGGTGAAGGAGGGTTTG	59.8	CGTACCAGCCATTCTCTATG	59.6	140
<i>SITTM2</i> (Solyc05g010340.3)	CTGAAAGTACGGAGCAAAC	60.1	CAGTTACCCACTCCTCAAAC	59.9	132
<i>SIVSP1</i> (Solyc06g062380.3)	GTGAGTATGTAGCCAAACAGG	60.4	CGTCAGATCGAGCGTAGTA	60.3	132
<i>SIPHD*</i> (Solyc06g051420)	ATTCGTGGCTGCTCTCTGTC	64	TAAAGGCTTCCTCCCTGTCA	62.7	128
<i>SILSM7*</i> (Solyc09g009640)	GGTGGAAGACAAGTGGTTGG	62.7	TTCAGGGGATCATCAGCAT	60.8	104

4.4 Bioensaios e extração de RNA total

4.4.1 *Solanum lycopersicum* (var. Santa Cruz) X *Sclerotinia sclerotiorum*

Sementes da cultivar de tomate da var. Santa Cruz, foram semeadas em sementeiras com células de 3 cm de diâmetro por 5 cm de profundidade, com substrato *Bioplant Plus* e acondicionadas em uma bandeja plástica até a germinação. Aos 7 dias após a germinação, as plantas foram transplantadas para copos plásticos de 400 mL. Todo o desenvolvimento dos tomateiros, desde a semeadura, foi realizado em câmara de crescimento, com temperatura (~25 °C) e luminosidade controlada (fotoperíodo de 12 h). As plantas foram regadas a cada dois dias.

O isolado de *S. sclerotiorum* (CMES 1795), foi coletado pela Dra. Claudine Dinali Santos Seixas em abril de 2018 em Palmeira, PR, Brasil, a partir da haste de soja (*Glycine max*). Posteriormente, o isolado, que está depositado no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG), foi gentilmente cedido para os experimentos do grupo de pesquisa do LPPIII e então para o grupo do LGP.

O cultivo do patógeno tem dois objetivos. O primeiro é produzir escleródios para o armazenamento, onde escleródios já formados são colocados no centro de uma placa com meio batata dextrose ágar (BDA), de 15 ou 9 cm de diâmetro, e acondicionada em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 20 °C no escuro até o aparecimento de escleródios. As placas ficam fechadas até que haja a necessidade de multiplicação do patógeno. Quando necessário, parte dos escleródios produzidos são depositados em novas placas para repetição do processo, enquanto a outra parte é coletada, com auxílio de uma pinça estéril, e armazenada em microtubos tipo eppendorf. Estes tubos são levados a geladeira (6 °C), o que garante a viabilidade dos escleródios por vários meses.

O segundo objetivo é a produção do inóculo, onde discos de meio BDA com micélios do patógeno, produzidas como descrito anteriormente, são depositados no centro de novas placas de BDA ($\varnothing=15$ cm) e acondicionada em BOD a 25 °C no escuro. Quatro dias após a semeadura da placa para produção de inóculo, coincidindo com os 30 dias de germinação das plantas de tomate, discos ($\varnothing=8,6$ mm) de meio BDA contendo micélios do patógeno foram cortados pressionando a base de ponteiras de 1000 μ L nas regiões às margens do limite de crescimento micelial. Estes discos foram dispostos na superfície de todos os folíolos do tomateiro, com área suficiente,

sendo levemente pressionados contra a folha para garantir maior aderência e contato dos micélios fúngicos com a planta.

Os tomateiros foram então acondicionados em uma caixa plástica (47x32x17 cm), que foi preenchida com cerca de 1 cm de água. Essa caixa foi sobreposta por outra caixa plástica idêntica, que desempenhou a função de tampa, criando assim uma câmara úmida. Não havendo mais necessidade de irrigação.

As coletas foram realizadas nos tempos 0 (imediatamente após a inoculação), 6, 12 e 48 horas pós a inoculação (hpi). Para tal, os discos com micélios foram retirados cuidadosamente da superfície dos folíolos, que foram então destacados e depositados imediatamente em tubos Falcon (50 mL) preenchidos com nitrogênio líquido. O nitrogênio foi então descartado do tubo, que foi imediatamente fechado e armazenado em um recipiente apropriado com nitrogênio, para que as amostras não descongelassem.

Cada tempo foi formado por três réplicas biológicas, onde cada réplica biológica continha todos os folíolos de três plantas. Dessa forma, 9 plantas foram analisadas em cada tempo e 36 plantas no total do experimento.

Ao fim da coleta, as amostras foram maceradas, em nitrogênio líquido com auxílio de um cadinho e pistilo, até a obtenção de pó fino verde claro. Este pó foi coletado para seus respectivos tubos Falcon para então serem armazenados no ultrafreezer (-80 °C).

4.4.1.1 Extração de RNA total (Método Trizol)

A extração de RNA total de folhas de tomateiros inoculadas com *S. sclerotiorum* foi realizada utilizando o método Trizol descrito por Simms et al. (1993), com modificações. Neste método um volume correspondente a aproximadamente 0,5 mL de material vegetal macerado foi adicionado a cada tubo tipo eppendorf de 1,5 mL (previamente resfriados em nitrogênio líquido), nos quais foram adicionados 1000 µL de Trizol e 10 µL de β-mercaptoetanol (1% do volume de Trizol), ambos reagentes à 4 °C. Esses tubos foram homogeneizados em um agitador vórtex durante 1 min e levados ao gelo por 5 min, só então foram centrifugados à 12.000 rpm e 4 °C por 10 min.

Após a centrifugação o conteúdo dos tubos foi dividido em duas fases. O sobrenadante foi coletado cuidadosamente, até o limite da interface entre as duas fases, e transferida para um novo tubo (previamente depositado em gelo) correspondente a cada amostra. Aos novos tubos, adicionou-se 300 µL de clorofórmio (-20 °C), e as amostras foram novamente homogeneizadas em agitador vórtex durante 1 min, deixando as amostras descansarem por 3 min no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 12.000 rpm e 4 °C por 15 min.

Novamente, o conteúdo dos tubos divide-se em duas fases, onde somente a fase superior (cerca de 700 µL) foi recuperada e transferida para novos tubos. Logo após, adicionou-se isopropanol mesmo volume coletado anteriormente (1:1, -20 °C). Os tubos foram então levemente invertidos e levados ao freezer à -20 °C por 1 h para a precipitação do RNA.

Passado o período de precipitação, as amostras foram centrifugadas à 12.000 rpm e 4 °C por 15 min. Nesta etapa é possível perceber a formação de um *pellet* hialino e gelatinoso, no fundo dos tubos, enquanto o sobrenadante, foi descartado.

Para lavar o *pellet*, adicionou-se 1.000 µL de Etanol 75%, e as amostras foram novamente centrifugadas à 10.000 rpm e 4 °C por 15 min. Após esta etapa o *pellet* fica mais visível e o sobrenadante é novamente descartado. O *pellet* foi então seco em fluxo laminar, em temperatura ambiente, por aproximadamente 10 min, e ressuspendido em 20 µL de água para injetáveis (Samtec®). Todas as amostras foram extraídas em duplicata e unidas ao final do processo.

4.4.2 *Solanum lycopersicum* (var. Ponderosa) X *Verticillium dahliae*

O bioensaio foi inteiramente realizado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa-CNPq (Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Brasil). Utilizando a infraestrutura do laboratório e as casas de vegetação. As etapas seguintes foram realizadas no LGP.

Sementes de tomateiros (var. Ponderosa) foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido em 20 de maio de 2024, sendo regados diariamente. Aos 21 dias após a semeadura, no dia 10 de junho de 2024, as plantas foram inoculadas e posteriormente transplantadas para vasos de 0,5 L, sendo irrigadas diariamente, 24 h depois do transplante, até a coleta. Algumas plantas adicionais foram mantidas em casa de vegetação até a visualização de sintomas.

O isolado de *V. dahliae* (Vert125) utilizado neste estudo foi obtido a partir da coleção de fungos fitopatogênicos do Embrapa-CNPq. Este isolado é proveniente de amostras de raízes de tomateiro, oriundos do Paraná. Tendo sido isolado pelo Dr. Ailton Reis em 2010. Estudos anteriores, utilizando cultivares diferenciais para raça e amplificação de regiões específicas, por PCR simplex, para determinação de raça, determinaram que este acesso pertence a raça 2, podendo também formar microescleródios em meio BDA (SUASTE-DZUL et al., 2023).

O isolado tinha sido preservado utilizando o método Castellani, onde fragmentos do meio de cultura com estruturas do patógeno foram adicionadas em um tubo com água destilada estéril. O tubo devidamente identificado foi então armazenado em câmara fria a 6 °C.

Para reativação do isolado, alguns fragmentos do meio de cultura preservados em água, como descrito anteriormente, foram retirados e depositados em papel filtro autoclavado para retirar o excesso de líquido, estes fragmentos foram depositados em placas de petri (9 cm), contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) + Tetraciclina (50 µg/mL), e espalhados com o auxílio de uma alça de platina, garantindo que as estruturas fúngicas estivessem em contato com uma área maior do meio. As placas foram então cultivadas a 23 °C, no escuro, por 7 dias.

Para a obtenção da suspensão de esporos, 20 mL de água destilada foram adicionados a cada placa. As placas foram então levemente “escovadas”, com o auxílio de escovas para os dentes de cerdas macias, para a “raspagem” de esporos e homogeneização da solução. Esta solução foi então filtrada com o auxílio de uma gaze estéril. A suspensão foi então ajustada para a concentração 2×10^6 esporos/mL, com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

As mudas de tomate foram removidas das células da bandeja, e suas raízes foram levemente golpeadas contra a superfície da própria bandeja, com objetivo de criar ferimentos. Em seguida, as raízes foram lavadas com água para remover o substrato aderido e novamente feridas, desta vez destacando as suas regiões apicais. Só então as raízes foram inoculadas por imersão na suspensão de esporos, mantendo-as submersas por 5 min. Após este período, as plantas foram imediatamente transplantadas para vasos de 0,5 L, adicionando duas plantas por vaso, e cerca de 5 mL da suspensão de esporos foi despejada em cada um dos colos das plantas.

Neste experimento somente as raízes foram coletadas em quatro tempos distintos, sendo 0, 8, 24 e 52 hpi. Cada tempo possui três réplicas biológicas, e cada réplica biológica foi formada por 6 plantas distintas. Portanto, 72 raízes foram coletadas no experimento, sendo 18 para formar cada tempo.

No tempo 0 hpi as plantas (condição controle) tiveram suas raízes enxaguadas e destacadas imediatamente após a inoculação, não tendo sido transplantadas para o solo. As raízes destacadas foram imediatamente depositadas em tubos Falcon (50 mL) preenchidos com nitrogênio líquido, que foi descartado assim que as raízes estavam totalmente congeladas, e só assim os tubos foram fechados. Estes tubos foram então imediatamente acomodados em recipiente adequado com mais nitrogênio líquido, mantendo a temperatura das amostras até o armazenamento. Nos demais tempos, as plantas estavam transplantadas no solo, então foram cuidadosamente removidas e tiveram suas raízes lavadas, em intervalos inferiores a 60 s, só então as raízes foram destacadas e congeladas.

Essas amostras foram depositadas em ultrafreezer (-80 °C) no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças até o final do experimento. Com o último tempo coletado, as amostras foram transportadas em recipiente hermético contendo nitrogênio líquido até a o LGP, no CENARGEN, onde foram maceradas, com o auxílio de cadinho e pistilo, e armazenadas novamente em ultrafreezer (-80 °C) até a extração do RNA total.

4.4.2.1 Extração de RNA total (Método Concert™ -> Trizol)

A extração de RNA total foi realizada utilizando um protocolo descrito por Sousa, (2020), que combina uma extração com o reagente Concert™ (Invitrogen), seguido por uma reextração com o reagente Trizol.

Primeiramente foi realizada a extração com Concert™. Para isso, transferiu-se um volume de material macerado de cerca de 0,5 mL para tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, previamente identificados e depositados em nitrogênio líquido (para garantir que as amostras não fossem submetidas a um aumento brusco de temperatura). A cada tubo, adicionam-se 500 µL de Concert™ (4 °C). Os tubos foram então homogeneizados em tubo agitador tipo vórtex por 5 min. Após a homogeneização, os tubos foram incubados em gelo por 5 min, e em seguida, centrifugadas a 12.000 rpm e 4 °C por 5 min. O sobrenadante formado foi cuidadosamente transferido até o limite

da interfase para um novo tubo tipo eppendorf de 1,5 mL, correspondente a cada amostra, previamente identificado e mantido em gelo. A este tubo adicionou-se 100 µL de NaCl (5 M e 4 °C) e 300 µL de clorofórmio (-20 °C). As amostras foram novamente homogeneizadas em agitador tipo vórtex e centrifugadas a 12.000 rpm e 4 °C por 30 min. Cerca de 600 µL do sobrenadante foi novamente coletado e transferido para um novo tubo tipo eppendorf de 1,5 mL, previamente mantido no gelo, ao qual adicionou-se um volume igual (1:1) de isopropanol (-20 °C). As amostras foram então levemente invertidas e levadas ao freezer a -20 °C por 30 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm e 4 °C por 30 min. Os sobrenadantes foram descartados, e adicionou-se a cada tubo 1000 µL de etanol (-20 °C), levando as amostras novamente à centrifuga, a 10.000 rpm e 4 °C por 5 min. O *pellet* foi seco por aproximadamente 10 min em fluxo laminar a temperatura ambiente e ressuspendido em 200 µL de H₂O para injetáveis (Samtec®).

Imediatamente após a ressuspensão, uma nova extração, agora com Trizol, foi realizada. Onde as amostras ressuspendidas na etapa anterior são utilizadas como ponto de partida. A cada tubo foram adicionados 500 µL de trizol e 5 µL de β-mercaptoetanol (1% do volume de trizol), que foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 1 min e deixadas no gelo por 5 min. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 rpm e 4 °C por 10 min. O sobrenadante formado foi transferido (cerca de 600 µL) para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL, previamente mantido no gelo, sendo incubado em gelo por 5 min. Após este período adicionou-se 300 µL de clorofórmio (-20 °C) e homogeneizou as amostras em agitador tipo vórtex por 1 min. As amostras foram então levadas a centrífuga a 12.000 rpm e 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL, onde adicionou-se um volume de isopropanol (-20 °C) e de acetato de sódio (3 M, pH 5 e 4 °C) nas proporções de 1:1 e 1:10 do volume da amostra, respectivamente. As amostras foram vertidas para homogeneização e incubadas no freezer a -20 °C por 40 min. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm e 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi descartado e, imediatamente após, adicionou-se 1000 µL de etanol 75% (-20 °C), para lavar o *pellet*. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm e 4 °C por 5 min, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco, por cerca de 10 min no fluxo laminar em temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de H₂O para injetáveis (Samtec®). Todas as amostras foram extraídas em duplicata e unidas ao final do processo.

4.5 Quantificação e verificação de qualidade de ácidos nucleicos

Ao fim da extração, as amostras foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop® 1000 UV/VIS (Thermo Scientific™) e analisadas quanto as relações entre as faixas 260/280 - onde valores abaixo de 1,8 indicam contaminação por proteínas -, e entre 260/230 – onde valores abaixo de 2 podem indicar contaminação com carboidratos, sais, fenóis e outros contaminantes orgânicos.

Para verificação da qualidade e integridade do RNA extraído, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel agarose [agarose 1%; Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X], pré-corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL). As amostras foram preparadas misturando 2 µL de amostra misturada com 3 µL de Blue/Orange Loading Dye (6X, Promega). O 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) foi utilizado como marcador de peso molecular. A cuba foi devidamente preenchida com TAE 1X e a eletroforese foi executada a 100 V por 40 min. Os géis foram observados e fotografados sob luz ultravioleta.

Uma vez constatada a presença de três fragmentos - referentes ao DNA genômico, a subunidade maior (28S) e a subunidade menor (18S) dos ribossomos, respectivamente – e que ambas estavam íntegras, as amostras seguiram para os próximos passos, com o tratamento com DNase, teste de degradação de DNA por RT-qPCR, a síntese de cDNA e o teste de qualidade de cDNA por RT-PCR. Estas etapas foram comuns, e serão discutidas em conjunto nos próximos tópicos.

4.6 Tratamento com DNase, verificação de qualidade do RNA tratado por eletroforese e RT-qPCR

O tratamento com DNase serve para purificar as amostras de RNA, eliminando o DNA genômico que foi extraído conjuntamente. Para isso utilizou-se o Kit TURBO DNA-free™ (Invitrogen™), realizando uma reação com volume final de 20 µL. Este volume foi preenchido por um volume de amostra correspondente a 4 µg de ácidos nucleicos, 2 µL de *10X TURBO™ DNase Buffer*, 0,125 µL de TURBO™ DNase (2 Units/µL) e completado para 20 µL com água para injetáveis (Samtec®). As amostras

foram então levadas ao termociclador e incubadas a 37 °C por 10 min, para o perfeito funcionamento da enzima, seguido por 65 °C por 10 min, a fim de inativar a enzima.

Ao fim do tratamento as amostras foram submetidas a eletroforese, assim como descrito anteriormente, para a verificação da completa eliminação do DNA genômico e integridade do RNA total. Esperando-se visualizar apenas dois fragmentos correspondentes a subunidade maior e menor dos ribossomos, sem o fragmento de DNA genômico. As amostras que apresentaram esse perfil com fragmentos íntegros foram levadas para as próximas etapas. Em outro teste, feito mais adiante, as amostras tratadas com DNase foram unidas em pools com 6 amostras e submetidas a uma RT-qPCR, executada como descrito mais a frente nos procedimentos para RT-qPCR, com objetivo de constatar a ausência de contaminação de DNA genômico.

4.7 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit *GoScript™ Reverse Transcriptase System (Promega)*. Que funciona em duas etapas distintas. Na primeira etapa, 4 µL de RNA tratado com DNase e 1 µL de Primer Oligo(dT) são adicionados a um microtubo de 0,5 mL, formando um mix, que foi levado ao termociclador por 5 min a 70 °C, compreendendo a etapa de anelamento a cauda de poli-A dos mRNAs maduros. Ao fim do processo as amostras são retiradas e centrifugadas em uma microcentrífuga por 10 s. Só então armazenadas em gelo até a adição do próximo mix.

Na segunda etapa, um novo mix, constituído por 4 µL de *Goscript 5x reaction buffer*, 3 µL de $MgCl_2$ (25 mM, concentração final 5 mM), 1 µL de *dNTP PCR nucleotide mix* (concentração final de 0,5 mM de cada dNTP), 1 µL de *Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor*, 1 µL de *GoScript™ Reverse Transcriptase* e 5 µL de *Nuclease-Free Water*, foi adicionado a cada um dos microtubos das amostras preparados na primeira etapa. Só então as amostras foram retiradas do gelo e levadas ao termociclador, programado para 3 etapas: 1) 25 °C por 5 min, etapa de anelamento; 2º) 42 °C por 60 min, etapa de extensão; e 70 °C por 15 min, etapa de inativação da enzima. As amostras foram então armazenadas no freezer a -20 °C.

Para testar a qualidade do cDNA, as amostras foram testadas por RT-PCR com os genes *PHD*, para tomate-*S. sclerotiorum*, e *LSM7*, para tomate-*V. dahlie*.

4.8 Procedimentos para RT-qPCR

4.8.1 *Solanum lycopersicum* (var. Santa Cruz) X *Sclerotinia sclerotiorum*

As reações de RT-qPCR para 18 genes, incluindo os genes de referência, foram realizadas em um instrumento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando placas de 96 poços (0,1 mL). Para cada reação utilizou-se 5 µL de *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), 0,2 µL de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*, diluídos para 1:10), 2 µL de cDNA diluído (1:20) e 2,6 µL de água para injetáveis (Samtec®), para completar o volume para 10 µL. O método de corrida utilizado contemplava um estágio inicial de “*Holding*” de 95 °C por 10 min; e um de “*Cycling*”, repetida 40 vezes, compreendendo 95 °C por 15 s, para desnaturação, e 60 °C por 60 s, para anelamento e extensão, respectivamente. Por fim, a máquina foi programada para encontrar a curva de desnaturação “*Melt Curve*”, utilizada para confirmar a especificidade da reação. Este programa compreende uma etapa de 95 °C por 15 s e outra que inicia em 60 °C por 1 min e sobe, com um acréscimo de 0,3 °C em função “*Step and Hold*”, até 95 °C, permanecendo nesta temperatura por 15 s. Para confirmar ausência de contaminações nas reações, controles negativos para cada gene amplificado em uma placa foram avaliados, substituindo os 2 µL de cDNA diluído, por água para injetáveis (Samtec®). Foram utilizadas três réplicas técnicas para cada amostra.

4.8.2 *Solanum lycopersicum* (var. Ponderosa) X *Verticillium dahliae*

Para este patossistema as reações de RT-qPCR foram realizadas em um aparelho QuantStudio™ 1 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando placas de 96 poços (0,2 mL). Em cada reação utilizou-se 5 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix* [(2X), Promega], 0,2 µL de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*, diluídos para 1:10), 2 µL de cDNA diluído (1:20) e 2,6 µL de *Nuclease-Free Water* (Promega), para completar o volume para 10 µL.

O estágio de “*Holding*” contemplou uma etapa a 50 °C por 2 min e uma de 95 °C por 10 min. O estágio de “*PCR*” foi repetido 40 vezes e contemplou uma etapa de 95 °C por 15 s, para desnaturação, e de 60 °C por 60 s, para anelamento e extensão. A

curva de desnaturação “*Melt Curve*” compreendeu uma etapa de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e 95 °C por 1 s. Os controles negativos de cada placa foram constituídos por 4 poços para cada gene com substituição do cDNA por água para injetáveis (Samtec®). Foram utilizadas três réplicas técnicas para cada amostra.

4.9 Coleta e análise de dados

Os dados de amplificação foram exportados dos *softwares* dos instrumentos de qPCR para formatos de trabalho em planilhas. Os valores de ΔRn foram organizados e importados para a ferramenta *Real-time PCR Miner* <<<http://miner.ewindup.cn/>>>, conforme o formato requerido.

Esta aplicação é uma Aplicação Baseada na *Web* que calcula a C_q (*cycle threshold*) e eficiência da reação. A quantificação destes parâmetros da RT-qPCR é realizada utilizando cálculos que se baseiam na cinética da reação de PCR individuais, não sendo necessário, portanto, uma curva padrão, que demanda um processo mais demorado e sensível (ZHAO; FERNALD, 2005).

Os dados gerados pelo *Real-time PCR Miner* foram baixados e importados para o aplicativo de planilhas, onde foram organizados por gene, tempo e eficiência. Os dados organizados foram importados para *software Relative Expression Software Tool* (REST, version 2009). Este programa utiliza os dados da expressão dos genes de referência para normalização das amostras e faz a quantificação relativa e a estatística dos dados. Para comparar as diferenças na expressão entre os grupos, utilizou-se o teste t com 4 graus de liberdade, $n = 9$ (3 repetições biológicas e 3 técnicas para cada replica biológica).

5 RESULTADOS

5.1 Interação entre tomate (var. Santa Cruz) e *Sclerotinia sclerotiorum*

A figura 2 mostra as etapas de inoculação de tomate e a evolução dos sintomas nos folíolos das plantas. Foi possível observar que o isolado de *S. sclerotiorum* utilizado era extremamente agressivo, pois em apenas 6 hpi alguns folíolos já haviam sido perfurados. Com 12 hpi foi possível visualizar micélios do patógeno crescendo a partir do disco de inoculação e um halo necrótico envolvendo a região de inoculação.

Com 48 hpi os folíolos já haviam sido quase totalmente consumidos. Alguns folíolos inclusive foram liquefeitos antes da coleta.

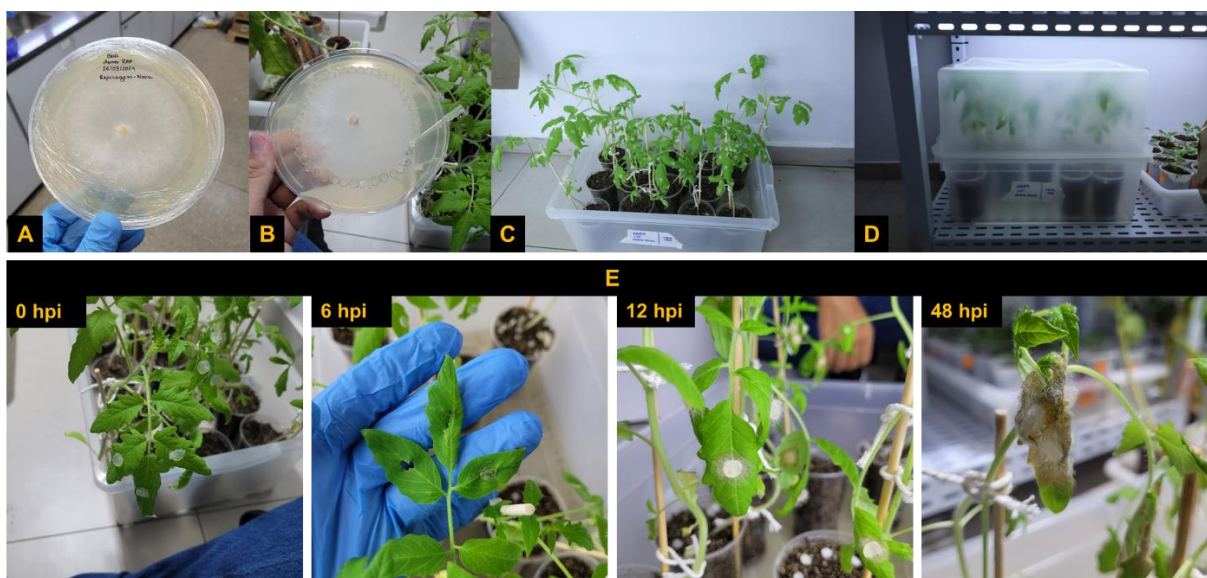


Figura 2. Inoculação e evolução dos sintomas em plantas de tomate (var. Sta. Cruz) com *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Placa com micélios; B) Corte de discos; C&D) Plantas acomodadas em caixas plásticas; E) Evolução de sintomas em 0, 6, 12 e 48 hpi.

A extração de RNA total foi realizada conforme descrito em material e métodos. O rendimento variou entre 1942 ng/ μ L a 240 ng/ μ L, com média de 924 ng/ μ L. As extrações de amostras dos tempos 0 e 6 hpi tiveram uma quantificação superior (em média 1398 ng/ μ L) quando comparado aos valores encontrados para os tempos 12 e 48 hpi (em média 449,6 ng/ μ L). Analisando mais detalhadamente, as amostras extraídas no tempo 12 hpi tiveram média superior (578 ng/ μ L) às encontradas para o tempo 48 hpi (321 ng/ μ L). Isso pode ser explicado pela severidade do ataque do patógeno nos folíolos, como demonstrado na figura 2, onde percebe-se que com a evolução dos sintomas, a quantidade de tecido vegetal diminui. Na Figura 3 é possível observar o perfil de fragmentos obtidos a partir da eletroforese em gel de agarose das amostras extraídas.

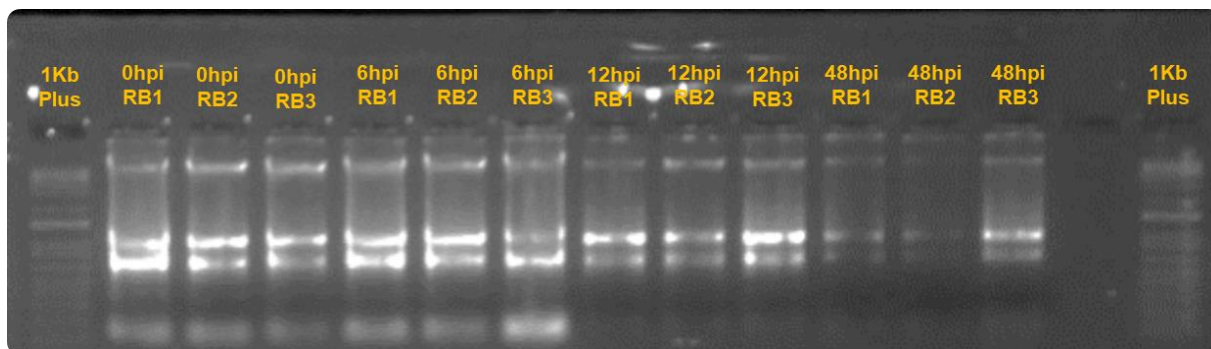


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Avaliação da integridade de amostras do RNA total extraído a partir da interação tomate (var. Santa Cruz) e *Sclerotinia sclerotiorum*.

O gel de agarose das amostras tratadas com DNase confirmou a ausência de contaminação com DNA genômico e a integridade dos fragmentos de RNA. Na Figura 4 é possível visualizar os fragmentos em gel de agarose. Em todas as amostras foi possível visualizar a presença dos dois fragmentos íntegros correspondentes às duas subunidades do ribossomo.

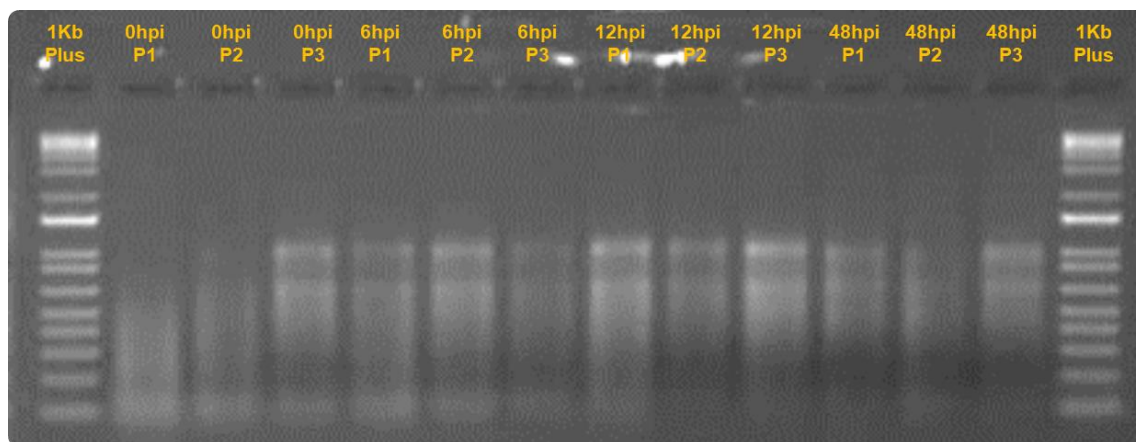


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Avaliação da integridade do RNA total extraído a partir da interação de tomate (var. Santa Cruz) e *Sclerotinia sclerotiorum*, após tratamento com DNase.

Posteriormente, foi realizada a síntese de cDNA, e, para confirmar o sucesso da síntese, as amostras foram submetidas a uma RT-PCR com os *primers* para o gene referência *PHD*, como apresentado na Figura 5, onde todas as amostras apresentaram amplificação.

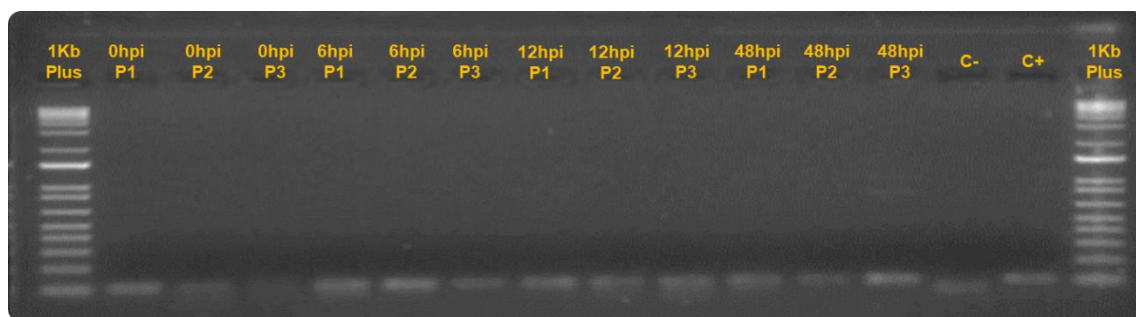


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Validação por RT-PCR dos cDNAs (diluídos 1:20) da interação tomate (var. Santa Cruz) com *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando *primers* para o gene referência *SIPHD*.

Para avaliar a resposta de suscetibilidade de plantas de tomate (var. Sta Cruz), durante a interação com *S. sclerotiorum*, utilizou-se RT-qPCR para analisar a expressão relativa de 16 genes potencialmente envolvidos na suscetibilidade. Para este patossistema foram avaliados os genes-*S* *SICTR2*, *SICPR5*, *SIDMR6*, *SIDND1*, *SIEDR*, *SIGST*, *SIHLH*, *SILFG2*, *SILIN6*, *SILSD1*, *SISR1*, *SIMC7*, *SIMC8*, *SIRLCKVII*, *SITFIIAγ* e *SITTM2* (Tabela 1). Os genes *SILSM7* e *SIPHD* foram utilizados como genes de referência. Dentre os genes alvo apenas *SIDMR6*, *SIDND1*, *SIEDR*, *SIGST*, *SILIN6*, *SILSD1* e *SITFIIAγ* foram devidamente amplificados em todos os tempos. A excessão foi o gene *SIDND1* que, quando analisado no Real-time PCR Miner, apresentou erros no ajuste da fase exponencial em várias amostras do tempo 48 hpi, tendo este tempo descartado, razão pela qual só foi possível analisar os dados para os tempos 6 e 12 hpi na avaliação. A análise das curvas de dissociação confirmou a especificidade dos produtos gerados para cada um dos genes em todos os tempos de coleta.

Dos genes que não amplificaram corretamente, o *SICPR5* apresentou contaminação nos controles negativos em mais de uma tentativa, diluindo os *primers* novamente, provando que houve uma contaminação do *primer* estoque. Os genes

SIHLH, *SICTR2*, *SICaM*, *SIMC7* e *SIMC8* apresentaram erros no ajuste da fase exponencial em mais de uma réplica biológica de um mesmo tempo e em mais de um tempo. Os genes *SIMC7*, *SIMC8* e *SICTR2* foram repetidos, mas os erros persistiram exatamente nas mesmas réplicas biológicas, indicando, portanto, a possibilidade de que para estes genes as amostras não funcionaram. Devido a consistência dos erros, estes e os outros genes que tiveram o mesmo problema foram descartados.

O gene *SILFG2* não apresentou amplificação em várias das réplicas técnicas e em várias réplicas biológicas e nas que amplificou, a amplificação foi tardia e irregular, indicando que ou o gene não é bem expresso neste patossistema ou que o desenho do *primer* não foi adequado para o gene em questão.

Conforme mostrado na Figura 6, todos os 7 genes alvo amplificados apresentaram, em ao menos dois tempos, diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$) em relação ao controle, 0 hpi. É possível observar também que todos os genes foram regulados positivamente em 48 hpi. Entretanto, os genes tiveram diferentes comportamentos na expressão ao longo do tempo (*time course*), Figura 7.

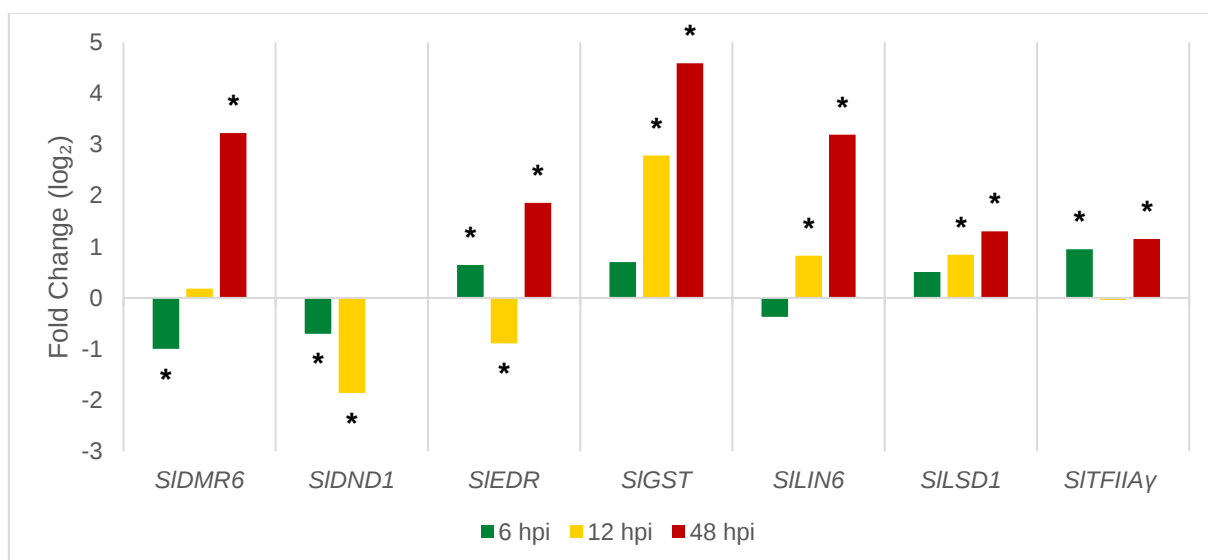


Figura 6. Expressão relativa dos potenciais genes-S na interação suscetível entre Tomate (var. Santa. Cruz) e *Sclerotinia sclerotiorum*, As cores das barras

correspondem aos tempos analisados e o “*” valores significativos ($p\text{-value} \leq 0.05$) da expressão relativa ao controle (0hpi)

Os experimentos em *time-course* consistem na análise da expressão gênica em múltiplos pontos no tempo (MARTÍNEZ, 2023). Isso permite com que se possa analisar como os genes se comportam com a evolução da infecção pelo patógeno. Neste caso, todos os valores de expressão em cada tempo foram comparados com a expressão inicial (0 hpi) para este mesmo tempo. Aqui foi possível diferenciar o comportamento dos genes em grupos distintos. O primeiro grupo de comportamento, que reúne os genes *SIGST*, *SILIN6* e *SILSD1* é demarcado por um acréscimo contínuo no valor de expressão, sendo significativamente aumentado a partir das 12 hpi. Um segundo grupo formado pelos genes *SIEDR* e *SITFIIAγ* possuem um comportamento oscilante, onde há regulação positiva no tempo 6 hpi, uma diminuição na expressão em 12 hpi, chegando a ser significativamente negativa em *SIEDR*, e novamente uma regulação positiva em 48 hpi. Os genes *SIDMR6* e *SIDND1* não possuem um comportamento que os agrupem a nenhum dos grupos já citados nem entre si. Enquanto o *SIDMR6* possui uma expressão onde possui regulação negativa no tempo 6 hpi e regulação positiva em 48 hpi, o gene *SIDND1* foi negativamente expresso para todos os tempos analisados (6 e 12 hpi).

Outra análise importante está na dimensão desta regulação. Destacam-se no tempo 6 hpi os genes *SITFIIAγ*, com a maior expressão (cerca de 2x mais), e *SIDMR6*, com a menor expressão (cerca de metade). No tempo 12 hpi destacam-se os genes *SIGST*, com uma expressão cerca de 7x maior, e o *SIDND1*, com uma expressão de cerca de $\frac{1}{4}$ do valor inicial. Em 48 hpi o gene *SIGST* novamente se destaca, com uma expressão 24x aumentada, seguido por *SIDMR6* (9,3x), *SILin6* (9,1x), *SIEDR*, cerca de 4x, *SILSD1* (2,5x), e, por fim *SITFIIAγ*, com 2,2x.

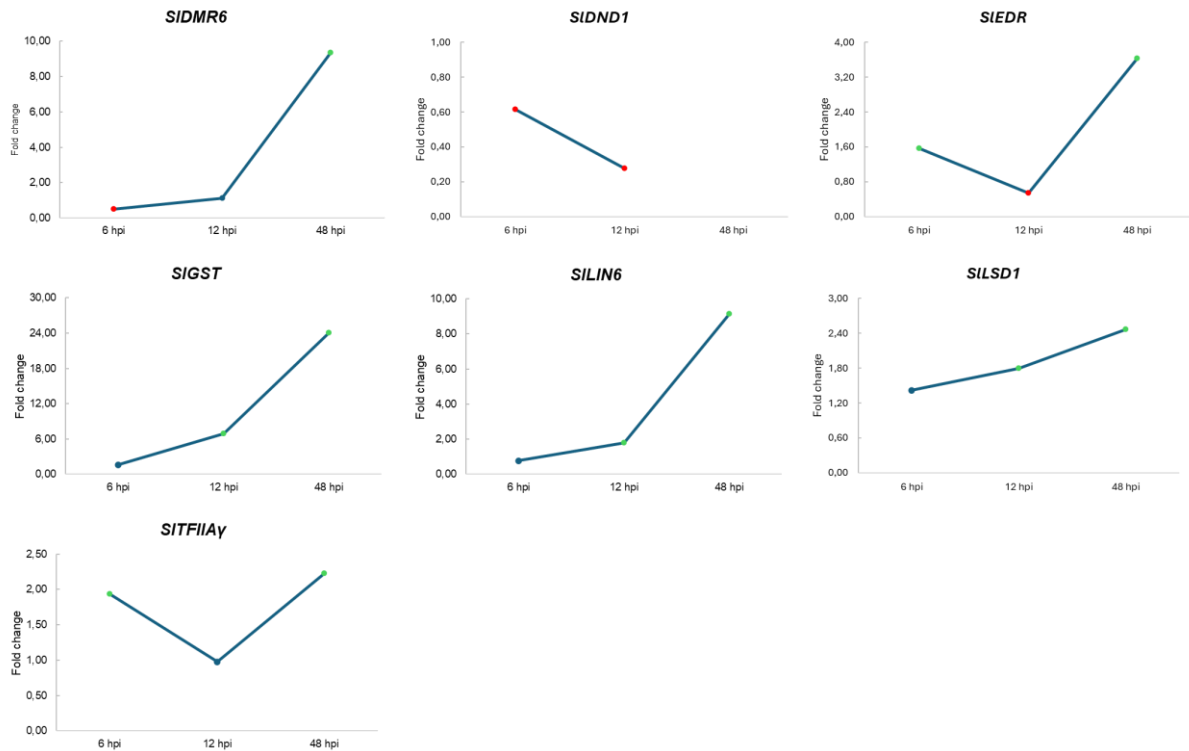


Figura 7. Análise da expressão relativa dos genes ao longo dos três *time-points* (*Time-course*), usando o tempo 0 horas pós a inoculação (hpi) como uma condição controle durante a interação suscetível entre tomate (var. Santa. Cruz) e *Sclerotinia sclerotiorum*. Os marcadores destacados em verde e vermelho correspondem, respectivamente, a expressão estatisticamente significativa ($p\text{-value} \leq 0.05$) regulada positivamente e negativamente tratamento controle, enquanto o azul não difere do tratamento controle.

5.2 Interação entre tomate (var. Ponderosa) e *V. dahliae*

O bioensaio na interação tomatero var. Ponderosa com *V. dahliae* seguiu-se conforme descrito em material em métodos. A Figura 8 ilustra os procedimentos para inoculação e a evolução dos sintomas em estágios avançados. A visualização dos sintomas é crucial neste patossistema para confirmar que o patógeno infectou efetivamente a planta e estabeleceu uma interação compatível. Aqui, o principal objetivo foi identificar genes diretamente envolvidos nos estágios iniciais de infecção, onde reside a etapa inicial da doença, sendo, portanto, um ponto crítico para o sucesso da doença. Para isto, as raízes foram coletadas em estágios iniciais de infecção, antes mesmo do desenvolvimento dos sintomas, pois diferente do que é

observado no patossistema anterior, o desenvolvimento dos sintomas nesta interação é relativamente lento e muitos dos sintomas identificáveis são reflexos, podendo não haver uma grande quantidade de material fúngico no tecido nas etapas iniciais.

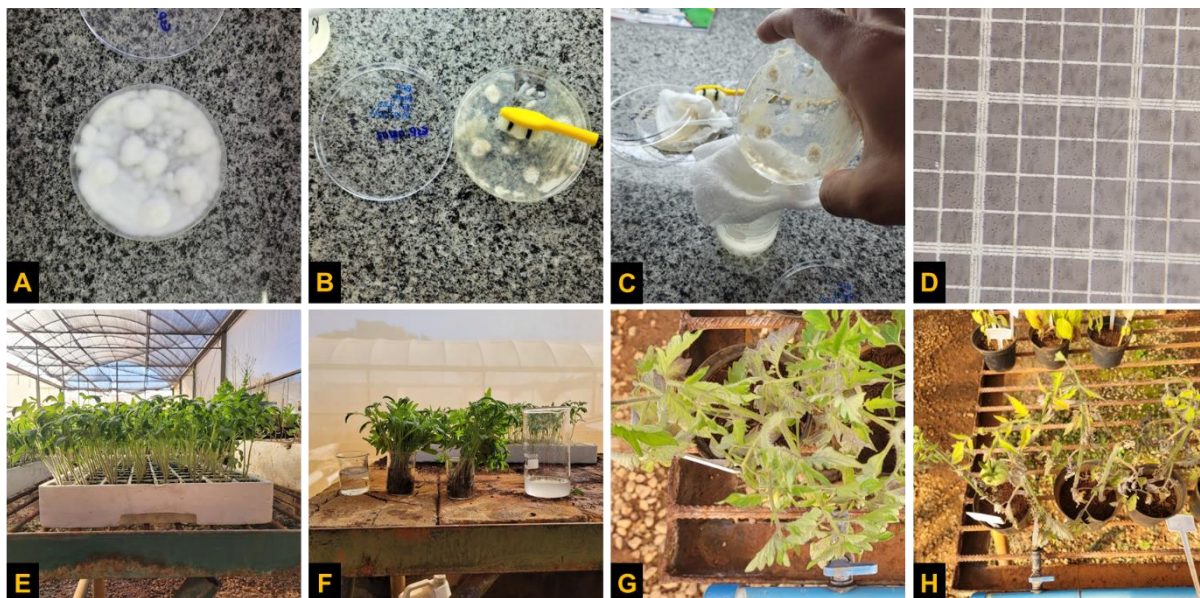


Figura 8. Inoculação e evolução dos sintomas em plantas de tomate (var. Ponderosa) com *Verticillium dahliae*: A) Placa completamente colonizada; B) “Escovação” da placa; C) Filtragem da suspensão de esporos; D) Esporos em câmara de Neubauer; E) Plantas com 21 dias após a germinação; F) Imersão das raízes em solução de esporos; G) Sintomas em plantas aos 25 dias após a inoculação (dpi); & H) Sintomas em plantas aos 52 dpi.

A extração de RNA total foi realizada a partir de folhas de plantas de tomate (var. Ponderosa) inoculadas com *V. dahliae*, conforme descrito na metodologia e o rendimento médio das extrações foi de 1069 ng/μL, com variações entre 2101 ng/μL, para 52 hpi RB3, a 214 ng/μL para 52 hpi RB2. Os fragmentos, obtidos a partir da eletroforese em gel de agarose 1%, mostraram-se íntegros e possuíam tamanho esperado (Figura 9).

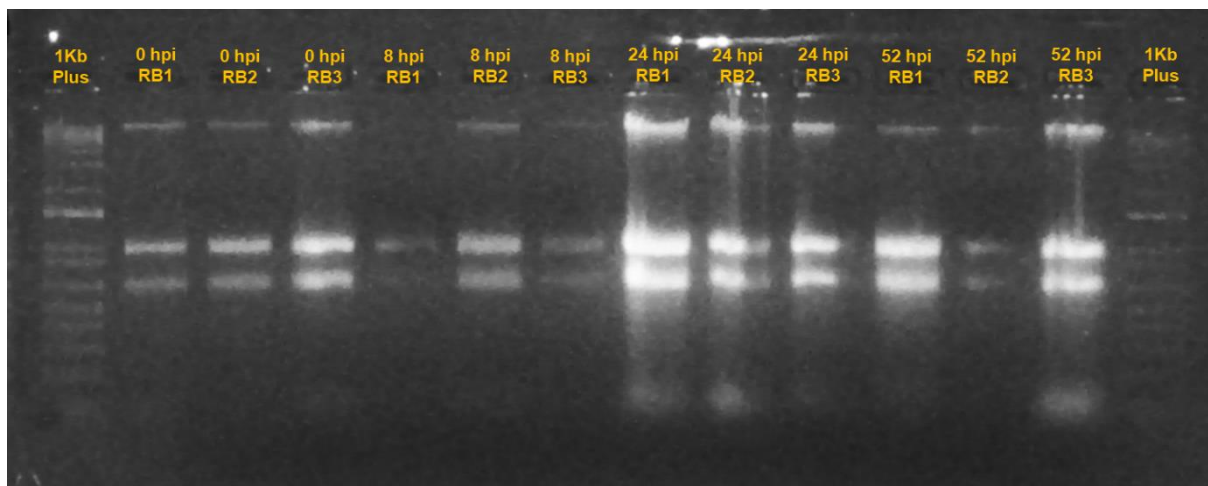


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Avaliação da integridade do RNA total extraído a partir da interação tomate (var. Ponderosa) e *Verticillium dahliae*.

Em seguida as amostras foram tratadas com DNase e submetidas a eletroforese, onde foi possível visualizar a presença dos dois fragmentos referentes ao RNA ribossômico integras em todas as amostras (Figura 10).

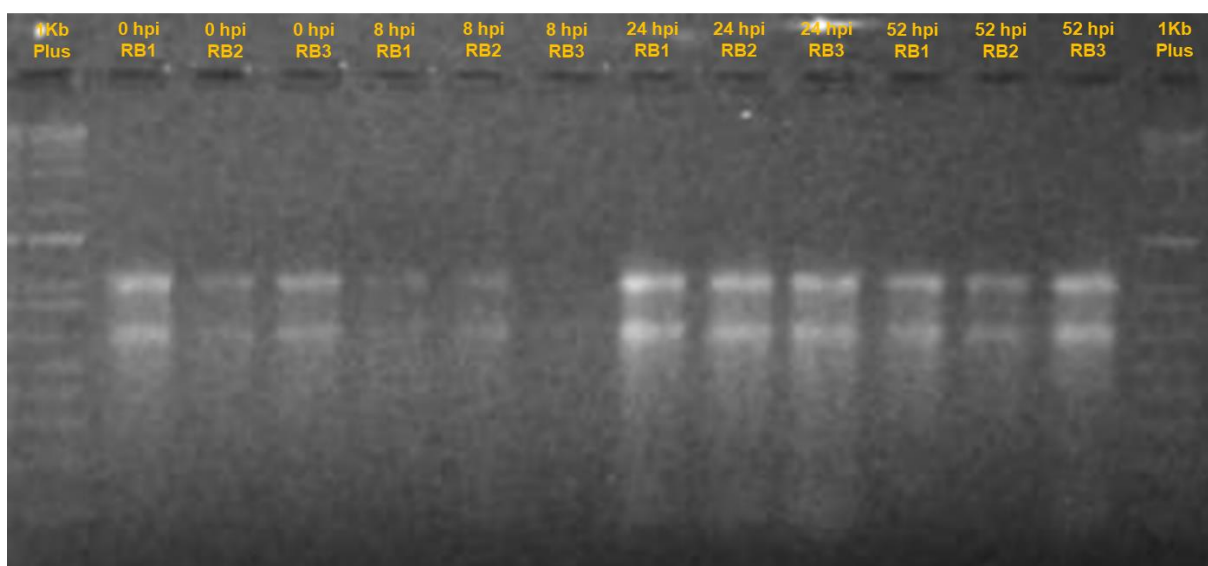


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Avaliação da integridade de amostras de RNA total extraído a partir da interação tomate (var. Ponderosa) e *Verticillium dahliae*, após tratamento com DNase.

Posteriormente, as amostras tratadas com DNase foram agrupadas em 4 “pools”, onde cada “pool” continha as 3 réplicas biológicas de um mesmo tempo, e submetidas a RT-qPCR, utilizando os *primers* para o gene referência *SILSM7*, para verificação da ausência de contaminações de DNA genômico. Os resultados confirmaram a ausência de contaminação por DNA genômico (Figura 11).

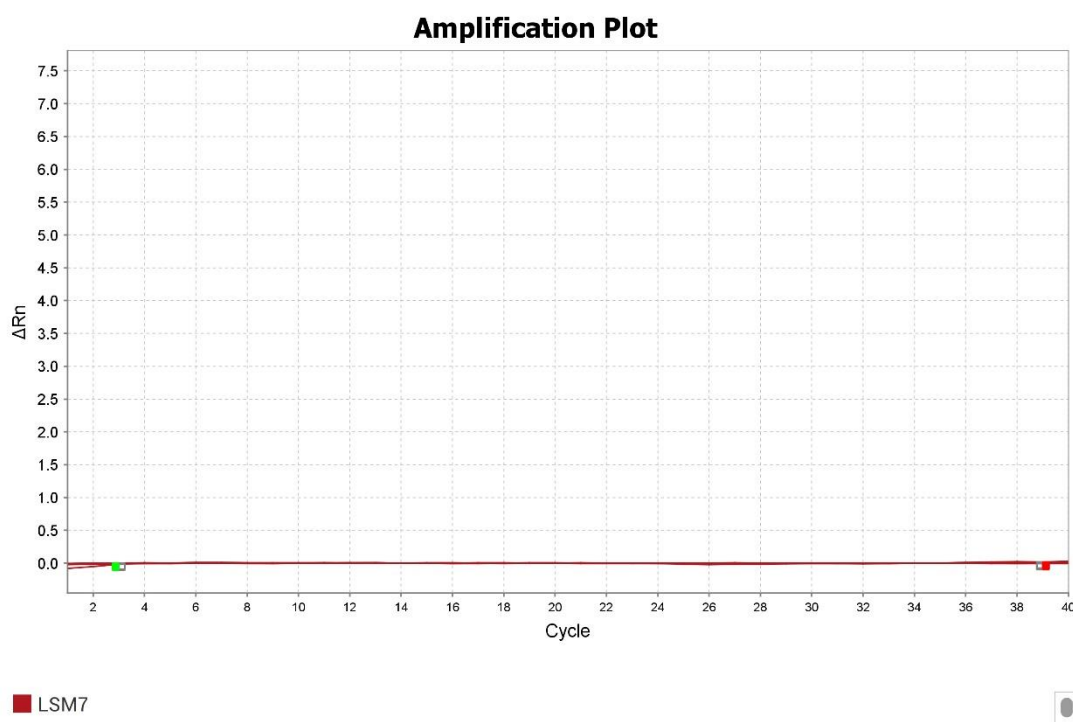


Figura 11. qPCR de amostras de RNA total tratadas com DNase para amostras na interação tomate (var. Ponderosa)-*Verticillium dahliae* para confirmar a ausência de contaminação com DNA genômico, utilizando *primers* para o gene *SILSM7*.

A síntese de cDNA foi realizada imediatamente após a confirmação da integridade do RNA total e a confirmação da sua efetividade da síntese foi realizada utilizando a RT-PCR, com os *primers* para o gene *SILSM7*. Conforme mostrado na

figura 11 todas as amostras apresentaram amplificação para o gene específico, conforme esperado.

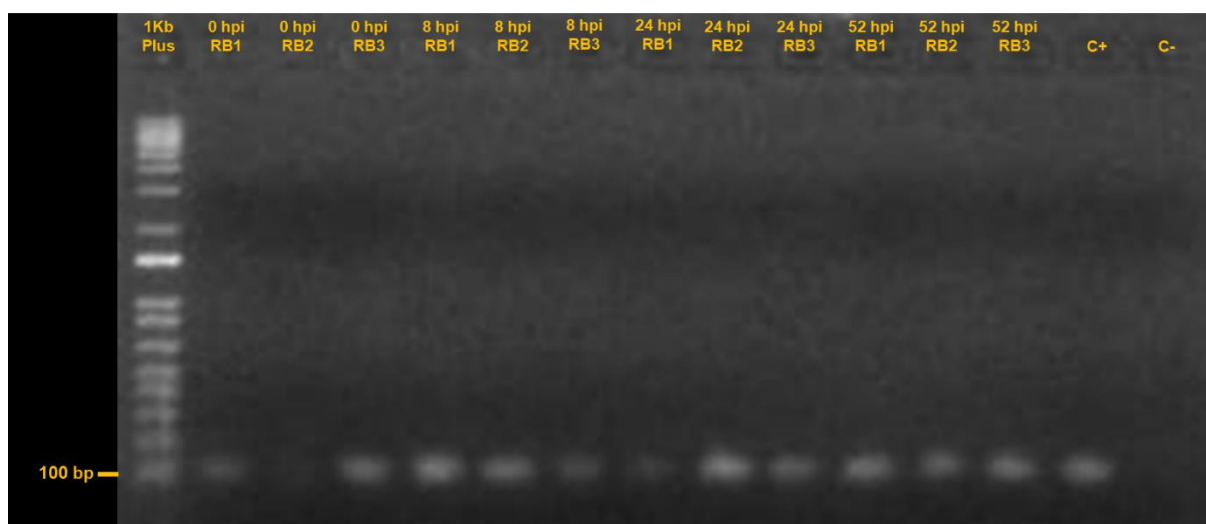


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Validação por RT-PCR dos cDNAs (diluídos 1:20) da interação tomate (var. Ponderosa), com *Verticillium dahliae*, utilizando *primers* para o gene referência *SILSM7*.

Para avaliar a resposta de suscetibilidade de plantas de tomate (var. Ponderosa), durante a interação com *V. dahliae*, utilizou-se a RT-qPCR para analisar a expressão relativa de 14 genes potencialmente envolvidos na suscetibilidade à doença (Tabela 1). Para esta interação foram avaliados os genes *SibHLH*, *SICTR2*, *SIDMR6*, *SIDND1*, *SIEDR*, *SIGR-RBP*, *SIGST*, *SILIN6*, *SILSD1*, *SIMC7*, *SIMC8*, *SISR1*, *SITFIIAγ* e *SITPK1b*, além de dois genes de referência *SIPHD* e *SILSM7*, sendo que apenas 4 dos genes testados não apresentaram boa eficiência de amplificação. Sendo eles o *SISR1*, que apresentou algumas amplificações tardias no controle negativo em duas tentativas, *SIDND1*, que apresentou erros no ajuste da fase exponencial em praticamente todas as amostras quando analisado no Real-time PCR Miner, *SIHLH*, que não amplificou, o *SITFIIAγ*, que apresentou não amplificou bem para algumas amostras e apresentou erros no ajuste na fase exponencial, assim como o *SIDND1*. A análise de estabilidade dos genes-S podem utilizando o programa RefFinder demonstrou que apenas o gene *SIPHD* possui estabilidade suficiente para

ser utilizado como gene normalizador (Figura 13). Sendo, portanto, o único utilizado na normalização dos dados neste trabalho.

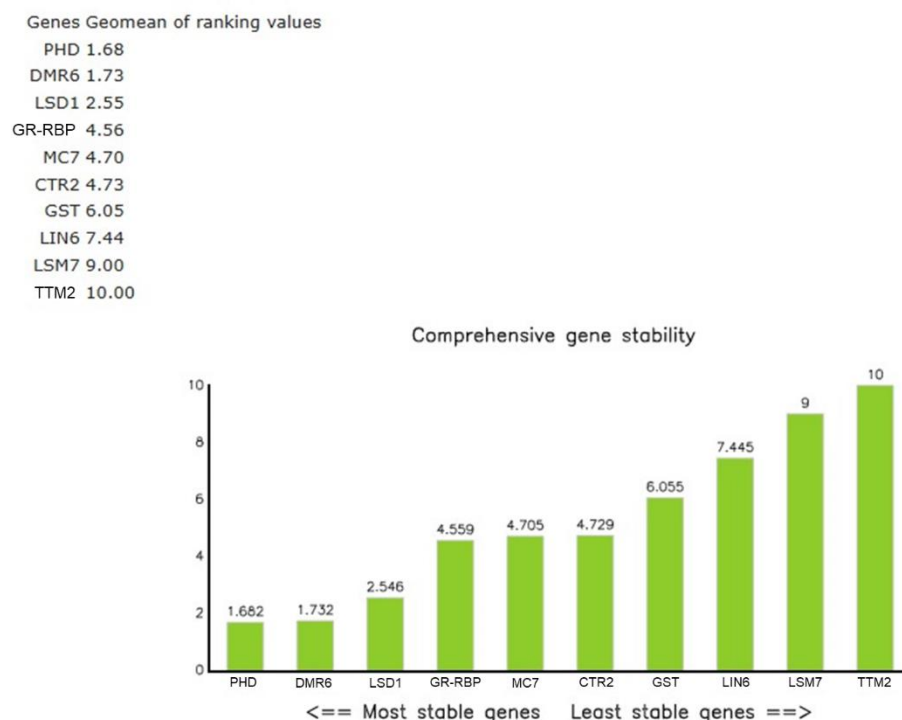


Figura 13. Classificação de estabilidade dos genes medido pelo RefFinder. Fonte: RefFinder

Todos os demais 10 genes restantes foram analisados conforme mostrado na Figura 14. Dentre estes, apenas SIMC8 e SIUCKL não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (0 dpi) em nenhum dos tempos analisados, enquanto que os genes SICTR2 e SILSD1 foram regulados negativamente, o primeiro em 52 hpi e o segundo em 24 hpi.

Todos os outros genes foram regulados positivamente em pelo menos um tempo, sendo que todos tiveram regulação positiva no tempo 8 hpi, indicando uma regulação precoce na expressão destes genes. Vale ressaltar que Os genes SIDMR6, SILIN6 e o gene SIMC7 tiveram regulação positiva apenas em 8 hpi, e não apresentaram diferenças estatísticas significativas em nenhum dos outros tempos analisados.

Por outro lado, os genes *SIGST*, *SIGR-RBP* e *SITPK1* tiveram regulação positiva em mais de um tempo. Com *SIGST* e *SIGR-RBP* sendo regulados positivamente em todos os tempos e *SITPK1* sendo regulado positivamente em 8 e 24 hpi.

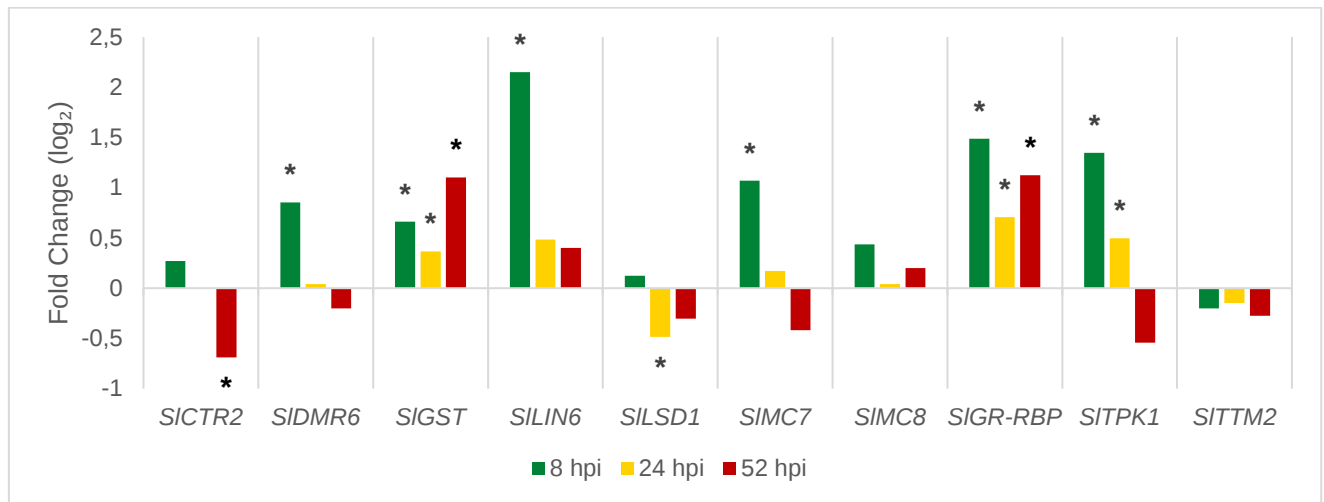


Figura 14. Expressão relativa dos potenciais genes-S na interação suscetível entre Tomate (*var. Ponderosa*) e *V. dahliae*. As cores das barras correspondem aos tempos analisados e o “*” valores significativos ($p\text{-value} \leq 0.05$) da expressão relativa ao controle (0hpi).

A análise da expressão gênica ao longo do tempo (figura 15) mostrou que, com exceção de *SIGST*, todos os genes tiveram expressão relativa aumentada com maior valor para o tempo 8 hpi. No caso do gene *SIGST* houve uma maior expressão no tempo 52 hpi.

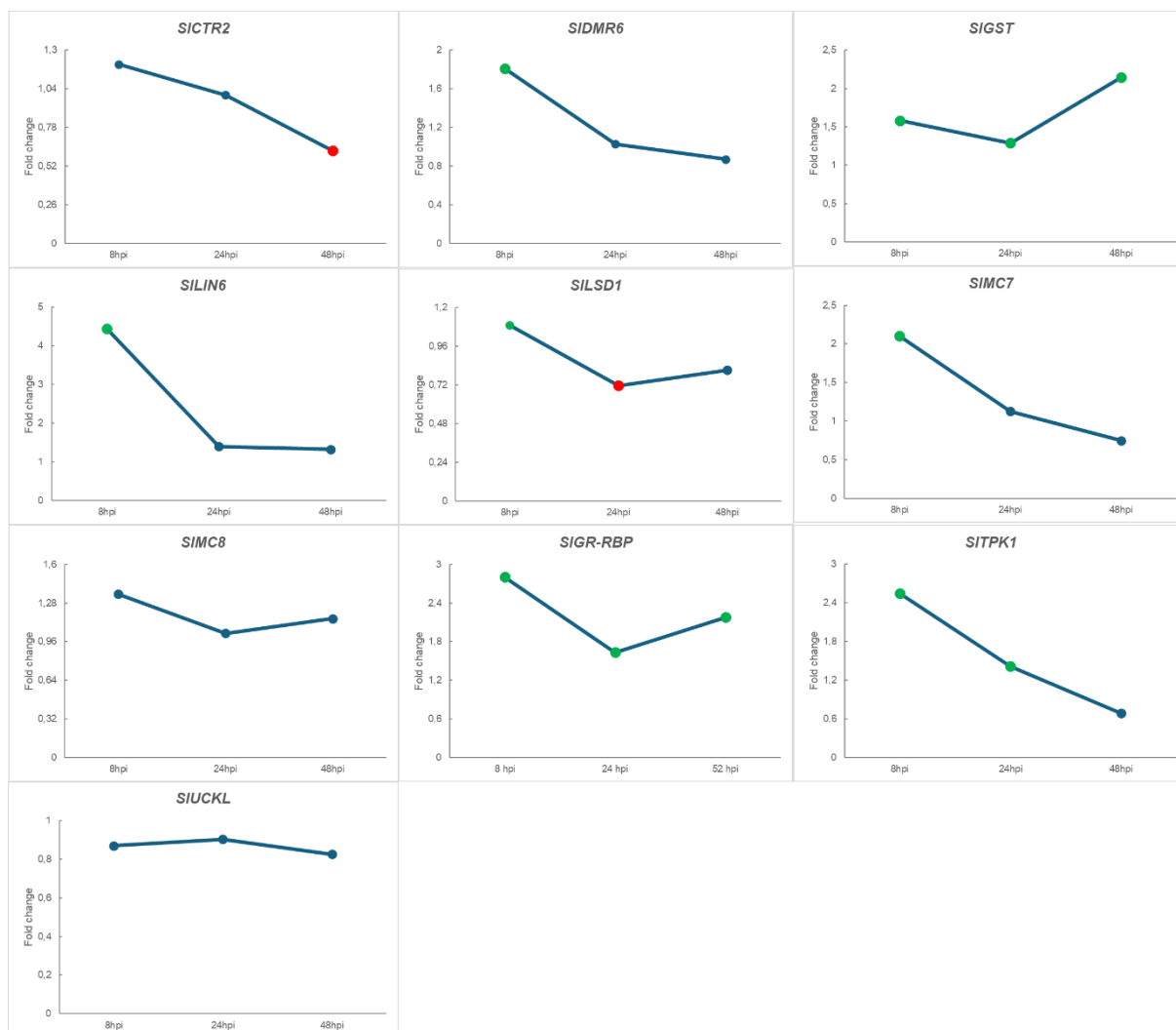


Figura 15. Análise da expressão relativa dos genes alvos ao longo do tempo (*Time-course*), tendo tempo 0h como controle, durante a interação suscetível entre tomate (*var. Ponderosa*) e *Verticillium dahliae*. Os marcadores destacados em verde e vermelho correspondem, respectivamente, a expressão estatisticamente significativa ($p\text{-value} \leq 0.05$) regulada positivamente e negativamente tratamento controle, enquanto o azul não difere do tratamento controle.

6 DISCUSSÃO

S. sclerotiorum e *V. dahliae* são fungos fitopatogênicos que causam grandes perdas econômicas. Embora sejam taxonomicamente distintos, ambos apresentam modo de nutrição hemibiotótico, com a capacidade de produzir estruturas de resistência (escleródios e microescleródios, respectivamente) e podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, o que dificulta o controle destes patógenos. Essas

características resultam em perdas significativas de produtividade e qualidade em diversas culturas, incluindo o tomate, quando estes patógenos se estabelecem no campo.

Apesar das diversas estratégias de manejo utilizadas pelos produtores, atuando tanto no manejo do solo quanto no controle direto dos patógenos, a obtenção de plantas geneticamente resistentes representa uma das abordagens mais promissoras. No entanto, a complexidade das interações planta-patógeno e a rápida evolução dos patógenos tornam esse desafio constante, considerando ainda que a disponibilidade de fontes de resistência em tomate para esses patógenos é muito limitada. A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à interação planta-patógeno é fundamental para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Estudos têm demonstrado que a expressão de genes relacionados tanto a defesa, quanto a suscetibilidade pode influenciar no resultado da interação, sendo que em interações compatíveis, a expressão de genes-S tende a ser regulada positivamente (KOSEOGLOU et al., 2022).

Neste estudo, o objetivo foi identificar potenciais genes-S em interações suscetíveis de tomate com *S. sclerotiorum* e *V. dahliae* por meio da análise da expressão gênica diferencial utilizando a técnica de RT-qPCR. Na interação com *S. sclerotiorum*, vários genes relacionados com a suscetibilidade de tomate foram avaliados nas folhas e os resultados mostraram que 6 dos 7 genes analisados foram regulados positivamente em ao menos um tempo, sendo eles *SIDMR6*, *SIEDR*, *SIGST*, *SILIN6*, *SILSD1* e *SITFIIAγ*. Na interação de tomate com *V. dahliae*, 6 dos 10 genes analisados nas raízes também tiveram regulação positiva em ao menos um tempo, incluindo *SIMC7*, *SIGR-RBP*, *SITPK1*, *SIDMR6*, *SIGST* e *SILIN6*. Entre os genes analisados em ambos os patossistemas (*SIDMR6*, *SIGST*, *SILIN6* e *SILSD1*), apenas o gene *SILSD1* não teve regulação positiva no patossistema com *S. sclerotiorum*.

Todos os genes analisados neste estudo já foram relatados em outros estudos por terem função na suscetibilidade das plantas. O gene *SIDMR6*, por exemplo, e seus ortólogos pertencem a superfamília das *2-oxoglutarate Fe(II)-dependent dioxygenases (2-ODDs)*. Essa família é extremamente diversa em quantidade e em funções e engloba cerca de 132 membros em tomate, porém muitos de seus representantes, incluindo o *SIDMR6*, ainda carecem de estudos aprofundados sobre

sua função metabólica (HAGEL; FACCHINI, 2018; WEI et al., 2021; ZEILMAKER et al., 2015). Apesar da função metabólica do gene *SIDMR6* ainda não ter sido caracterizada, alguns de seus ortólogos em *A. thaliana* já tiveram suas funções moleculares elucidadas, como exemplo, as enzimas *salicylic acid 3-hydroxylase* (*S3H*), que é codificada pelo *DLO1* (DMR6-like oxygenase 1), e o *salicylic acid 5-hydroxylase* (*S5H*), codificado pelo gene *AtDMR6* (At5g24530), que é o gene ortólogo mais semelhante ao *SIDMR6* (Soly03g080190), levando em conta a sequência de nucleotídeos e de proteínas. Este último catalisa a formação de ácido 2,5-dihidroxibenzóico, por hidroxilação de ácido salicílico (AS) na posição C5 de seu anel fenil, desempenhando, portanto, função na homeostase de ácido salicílico (ZHANG et al., 2017). Em plantas onde essa enzima não está presente ou é disfuncional, a catálise de AS fica comprometida, então é presumível que a quantidade de AS acumulado na célula seja elevado. Desta forma, os patógenos biotróficos e hemibiotróficos, que necessitam de baixas concentrações de AS, são prejudicados.

Os Genes codificadores de enzimas glutathione S-transferase (GST) também vêm sendo estudados na interação planta patógeno. Estas enzimas possuem diversas funções e são consideradas onipresentes em plantas, além de serem codificadas por grandes famílias. Aparentemente o papel mais importante das GSTs é a supressão do estresse oxidativo nos tecidos hospedeiros infectados, entretanto outros papéis destes genes ainda precisam ser mais bem compreendidos, pois as respostas destas enzimas em diferentes patossistemas ainda são muito variáveis. Sabe-se, entretanto, que expressão desses genes pode levar a quatro tipos de interação: 1) resistência, sem sintomas visíveis; 2) resistência, associada à hipersensibilidade (HR); 3) limitação da disseminação sistêmica de patógenos e da morte celular; & 4) promoção da suscetibilidade (GULLNER et al., 2018). Em um estudo conduzido por Islam et al., (2017), foram identificados 90 membros desta família em tomate, o maior número entre as espécies vegetais estudadas até então. A análise da expressão de 30 destes genes revelou que a maior parte deles são positivamente expressos durante a resposta aos patógenos, como *Botrytis cinerea*, com poucas exceções que mostraram regulação negativa. Além disso, os genes *SIGSTU34*, *SIGSTU4*, *SIGSTU5*, *SIGSTU39* e *SIGSTU43*, exibiram uma forte regulação positiva em resposta a múltiplos patógenos, como Tomato spotted wilt virus (TSWV), *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, *Clavibacter michiganensis* e Potato spindle tuber viroid (PSTVd). Neste estudo, o gene denominado de *SIGST* corresponde ao gene

SIGSTU39, comprovadamente envolvido nas respostas de tomate em interações compatíveis.

Sabe-se também que o metabolismo de açúcar é essencial na interação entre plantas e patógenos, onde, de um lado os patógenos podem sequestrar os sistemas de efluxo de açúcar, induzindo a expressão de genes transportadores de açúcar, como os genes da família *SWEET*, enquanto, de outro lado, as plantas tendem a utilizar sistemas de influxo de açúcar, como aqueles controlados pelos genes *At-STP4* e *At-STP13*, para induzir respostas de defesa (LACRAMPE et al., 2021). Esse “cabo de guerra” pelo controle dos açúcares também envolve invertases de parede celular. A atividade destas enzimas também pode desencadear respostas de defesa da planta, como indução de genes PR, expressão gênica PAL, deposição de calose e redução da morte celular (LANUBILE et al., 2015). Porém a invertase extracelular codificada pelo gene *SILIN6*, em tomate, que catalisa a clivagem da sacarose em glicose e frutose no apoplasto celular, tem particularidades no seu comportamento em relação as outras invertases (*SILIN5*, *SILIN7* e *SILIN8*). A sua expressão é induzida por ferimentos, tratamento com açúcar, aplicação de zeatina e em resposta a colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares (SCHAARSCHMIDT; ROITSCH; HAUSE, 2006). Em tomateiro, sua expressão ainda foi relacionada com o aumento do desenvolvimento de sintomas na interação com *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* e com a suscetibilidade a *Botrytis cinerea* (KOCAL; SONNEWALD; SONNEWALD, 2008; LACRAMPE et al., 2021). O fato do gene *LIN6* ser regulado positivamente desde o início da infecção pode indicar que sua função, provavelmente na modulação de outros componentes do metabolismo dos carboidratos, pode favorecer o patógeno.

Entre os genes analisados exclusivamente no patossistema com *S. sclerotiorum*, cabe-se destacar o gene *SITFIIAγ* e o gene *SIEDR*. O gene *SITFIIAγ* [*Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma)*], é amplamente estudado como um fator de suscetibilidade para bactérias do gênero *Xanthomonas*. Efetores do tipo *Transcription activator-like effectors* (TALEs) são secretados por estas bactérias, e a interação com a subunidade *TFIIAγ* do fator de transcrição TFII, faz com que esses patógenos consigam induzir a expressão de outros genes-S necessários para seu desenvolvimento. Estudos mostram que o silenciamento deste gene pode contribuir para a resistência destas plantas aos patógenos (SOUSA et al., 2023; YUAN et al., 2016). Apesar de não existirem estudos específicos sobre efetores fúngicos que

tenham o gene *TFIIAγ* como alvo, sabe-se que estes organismos possuem uma grande diversidade de efetores, inclusive muitos dos quais estão relacionados a modulação da transcrição (LI et al., 2024a). A expressão aumentada deste gene na interação com *S. sclerotiorum* pode indicar que este patógeno pode induzir a transcrição deste fator diretamente, com algum efector direcionado a ele, ou indiretamente, criando condições para que a planta necessite expressá-lo de forma mais intensa. A explicação dos mecanismos pelos quais isto acontece devem ser estudadas mais detalhadamente no futuro.

Por outro lado, o gene *EDR* (*Enhanced Disease Resistance 1*), que codifica uma *Raf-like MAPK kinase kinase* (MAPKKK), é conhecido por regular negativamente a cascata de MKK4/MKK5-MPK3/MPK6, uma importante via de defesa em *Arabidopsis*. Sabe-se também que mutantes deficientes de *EDR* possuem resistência aumentada a patógenos (ZHAO et al., 2014). Os dados demonstrados neste estudo corroboram esta constatação. Isso indica que este pode ser um bom candidato para programas de melhoramento voltados a múltiplos patógenos.

Já entre os genes analisados exclusivamente na interação com *V. dahliae* os genes *SIMC7*, *SIGR-RBP* e *SITPK1* se destacaram com forte regulação positiva no início da infecção. As metacaspases vêm sendo estudadas como importantes reguladores nas respostas de defesa da planta. Bernacki et al.(2024), em um trabalho de caracterização do gene *METACASPASE8* (*MC8*), uma metacaspase do tipo II, em *Arabidopsis*, relatam que este gene pode ser um executor final da morte celular dependente de *LSD1*. Em tomate, são reconhecidas oito destes genes nomeados de *SIMC1-SIMC8*, onde apenas o *SIMC7* e o *SIMC8* são agrupados no tipo II (LIU; LIU; WEI, 2016). Os níveis de transcrição deste tipo de metacaspase são rapidamente aumentados em tomates inoculados com *B. cinerea* (HOEBERICHTS; TEN HAVE; WOLTERING, 2003), o que indica ou uma função na suscetibilidade, contribuindo para a morte celular desprogramada, ou ser resultado de uma tentativa da modulação de uma resposta de defesa. Mais estudos precisam ser conduzidos na busca pela sua função metabólica completa.

Os genes *GR-RBP* codificam proteínas *glycine-rich RNA-binding*, que têm papel essencial no processamento e metabolismo do RNA e vem sendo associadas a estresses, como frio, ferimentos, radiação UV, salinidade e infecção por patógenos. Apesar de algumas de suas funções ainda precisarem ser melhor compreendidas,

sabe-se que estas proteínas estão envolvidas em vários processos, incluindo *splicing* pré-mRNA, transporte nucleocitoplasmático de RNA e edição de RNA. Vários destes genes já foram demonstrados com funções na suscetibilidade, como por exemplo o gene *NgRBP*, que facilita a colonização do *Potato virus X (PVX)* e do Cucumber mosaic virus; o gene *GR-RBP2*, na interação de *Zea mays* com *Aspergillus flavus*; e o gene *RZ-1A*, que codifica uma *GR-RBP* com característico dedo de zinco interno do tipo CCHC, essa proteína é recrutada pelo efector *PsFYVE1* de *Phytophthora sojae* para modular as defesas da planta (LU et al., 2023). Neste estudo, a modulação positiva, em estágios iniciais, de um gene como estes pode indicar que o patógeno tem a capacidade de modular a expressão deste gene para alterar o perfil de transcritos do tomateiro, estabelecendo melhor condições para o seu desenvolvimento.

Outra característica interessante neste estudo foi a análise temporal da expressão destes genes nos diferentes patossistemas. A expressão dos genes-S em plantas pode variar significativamente durante o processo de infecção, sendo influenciada pelo modo ou estágio de nutrição dos patógenos. Estudos realizados por Pavese et al. (2021), com a interação entre os patógenos *Phytophthora cinnamomi* e *Cryphonectria parasitica* em castanheiras (*Castanea sativa*, suscetível a ambos patógenos, e *Castanea crenata*, tolerante a *P. cinnamomi*) revelaram padrões de expressão distintos para os genes *mlo*, *dnd1*, *pmr4* e *dmr6*. Em *C. sativa*, a expressão desses genes-S é significativamente maior nas fases iniciais da infecção, diminuindo à medida que a doença progride. Este mesmo padrão foi observado na interação entre *C. crenata* e *C. parasitica*. Isto pode sugerir que estes genes podem facilitar a colonização inicial do patógeno, mas que a partir de determinado momento outros fatores relacionados a virulência devem ser ativados. Por outro lado, na interação incompatível entre *C. crenata* e *P. cinnamomi*, não houve diferenças na expressão destes genes nos estágios iniciais, mas há uma forte regulação negativa nos estágios finais de infecção, sugerindo que além do patógeno não conseguir induzir uma maior expressão destes genes, a planta pode ainda reduzir a produção deles para se contrapor ao ataque dos patógenos.

As diferenças na expressão dos genes de suscetibilidade podem ser atribuídas às características dos ciclos de vida dos patógenos. Embora *S. sclerotiorum* e *V. dahliae* sejam hemi-biotróficos, a transição da fase biotrófica para a necrotrófica em cada patossistema ocorre em tempos distintos (CHOWDHURY; BASU; KUNDU,

2017). A infecção por *S. sclerotiorum* é rápida, com sintomas de necrose aparecendo em apenas 12 horas. Em contraste, os sintomas de *V. dahliae* manifestam-se mais lentamente, após cerca de duas semanas, e a planta hospedeira permanece viva por um período mais longo. Dado que o objetivo deste estudo foi identificar genes de suscetibilidade para serem utilizados em programas de melhoramento, a fase inicial da infecção é de particular interesse.

Enquanto em *S. sclerotiorum* esta fase pode ser encontrada nas primeiras horas de infecção, sendo possível neste único estudo visualizar como estes genes se comportam nos estágios inicial (6 hpi), intermediário (12 hpi) e avançado (48 hpi) de infecção. Em *V. dahliae* não há uma definição clara de qual seria a fase inicial. Em alguns estudos há a indicação que este patógeno leve de 2 a 4 dias para invadir os vasos do xilema, e outro para espalhar e esporular (FRADIN; THOMMA, 2006).

Porém, mais recentemente, em um estudo detalhado da interação entre *A. thaliana* e *V. dahliae*, realizado por Su et al. (2018), observou-se uma progressão mais rápida da infecção. Com a utilização de microscopia confocal com isolado *GFP*, percebeu-se que quatro horas após a inoculação, conídios já haviam sido aderidos à superfície radicular e que a germinação dos esporos se inicia em apenas 8 hpi, tendo o ápice desta germinação em 12 hpi, com um rápido alongamento do tubo germinativo. Após 24 hpi, o micélio estava bem desenvolvido e, entre 48 e 56 hpi, a raiz encontrava-se completamente colonizada. Neste estudo o perfil transcriptômico também foi analisado, o que possibilitou a observação de que apenas o contato com o patógeno já induziu a expressão diferencial de genes, e que no tempo 8 hpi houve a maior expressão diferencial de genes nesta interação, basicamente o dobro do que o encontrado no menor (0 hpi) e maior (24 hpi) tempos. Este conjunto de dados permite inferir que a fase inicial da infecção do patógeno se inicia antes das 24 horas, e que o seu estabelecimento pode estar compreendido em períodos iguais ou superiores a este tempo. Desta forma, em teoria, a seleção dos tempos 0 hpi, 8 hpi, 24 hpi e 52 hpi neste estudo poderia compreender o período inicial de infecção até o estabelecimento do patógeno.

Esperava-se que os dados deste estudo demonstrassem uma diminuição na expressão dos genes-S em etapas mais avançadas da fase necrotrófica, porém no patossistema tomate-*S. sclerotiorum*, observou-se um maior *fold-change* dos genes regulados positivamente no tempo 48 hpi, onde as folhas já estavam muito necrosadas. Este comportamento demonstra que, ou este patógeno não interrompe a

indução da expressão destes genes em estágios avançados da sua fase necrotrófica, ou que a expressão destes genes está relacionada ao contato direto das hifas do patógeno com as células da planta. O sentido desta suposição está no fato de quanto mais avançada for a infecção, mais hifas estarão na fase inicial de infecção e colonização nas bordas da área necrosada. Estudos transcriptômicos e proteômicos em *single cell* poderiam ser mais precisos na avaliação e compreensão da expressão de transcritos e abundância das suas proteínas em função da distância do ponto de infecção, o que permitiria entender a dispersão de sinais relacionados a indução destes fatores célula a célula.

Por outro lado, no patossistema tomate-*V. dahliae* observou-se um comportamento oposto para todos os genes regulados positivamente, com exceção do *SIGST* que teve o mesmo comportamento nos dois patossistemas. Neste patossistema, o menor tempo (8 hpi) teve o maior *fold-change*. O que implica em dizer que estes genes foram mais expressos no início da infecção.

Apesar de não ter sido possível testar todos os genes em ambos patossistemas, é possível supor que suas funções na suscetibilidade podem ser semelhantes para alguns destes genes. A defesa das plantas contra patógenos se constitui de um processo complexo e dinâmico, envolvendo uma série de mecanismos compartilhados ou sobrepostos. Esta sobreposição pôde ser verificada, por exemplo, por Jiang et al. (2022) em um estudo onde constatou-se que a resistência de *Brassica rapa* a *S. sclerotiorum* foi aumentada quando se pulverizou a proteína efetora *Aspf2-like protein* (VDAL) de *V. dahliae* nas folhas. Essa resistência foi relacionada a expressão diferencial de genes e de vias enzimáticas conhecidamente relacionados a defesa. Isto revela a existência de mecanismos de defesa comuns que podem ser explorados para o controle de diferentes patógenos.

O silenciamento e o nocaute de genes-S já vêm sendo estudados como estratégias para proteção de cultivos (JOSÉ DE SOUSA et al., 2023; PATIL; JANGRA; GHOSH, 2024). Alguns dos genes estudados, como o *SIDMR6*, já foram inclusive nocauteados e expressaram fenótipo resistente a patógenos (MAIOLI et al., 2024). Alguns destes genes como *SILIN6*, *SITFIIAγ*, *SIGR-RBP*, e *SITPK1*, merecem ser melhor caracterizados quanto as suas funções, com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese e explorar seu potencial como alvos para o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

7 CONCLUSÃO

A análise de expressão diferencial por RT-qPCR durante as interações tomate-*S. sclerotiorum* e tomate-*V. dahliae* permitiu identificar 9 genes com possível função na suscetibilidade nos patossistemas estudados, sendo eles *SILSD1*, *SILIN6*, *SIDMR6*, *SIGST*, *SIEDR*, *SITFIIAγ*, *SIGR-RBP*, *SITPK1* e *SIMC7*. Estes resultados fornecem um ponto de partida sólido para investigações mais aprofundadas sobre os mecanismos moleculares e sobre as funções destes genes.

A compreensão destes mecanismos pode fornecer uma base valiosa para o desenvolvimento de novas abordagens biotecnológicas, como silenciamento ou aplicação de tratamentos não convencionais, para supressão da expressão destes genes, ou ainda o desenvolvimento de variedades de tomate mais resistentes ou tolerantes a estes patógenos em programas de melhoramento genético de precisão.

REFERÊNCIAS:

- ACHARYA, B. et al. Opportunities and Challenges in Studies of Host-Pathogen Interactions and Management of *Verticillium dahliae* in Tomatoes. **Plants** **2020**, Vol. **9**, Page **1622**, v. 9, n. 11, p. 1622, 22 nov. 2020.
- BARRAGAN, A. C.; WEIGEL, D. Plant NLR diversity: the known unknowns of pan-NLRomes. **The Plant Cell**, v. 33, n. 4, p. 814–831, 31 maio 2021.
- BERGOUGNOUX, V. The history of tomato: From domestication to biopharming. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 170–189, 1 jan. 2014.
- BERNACKI, M. J. et al. METACASPASE8 (MC8) Is a Crucial Protein in the LSD1-Dependent Cell Death Pathway in Response to Ultraviolet Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 6, p. 3195, 11 mar. 2024.
- BUHTZ, A. et al. Effects of *Verticillium dahliae* on tomato root morphology considering plant growth response and defence. **Plant Pathology**, v. 66, n. 4, p. 667–676, 1 maio 2017.
- CARUSO, A. G. et al. Tomato brown rugose fruit virus: A pathogen that is changing the tomato production worldwide. **Annals of Applied Biology**, v. 181, n. 3, p. 258–274, 1 nov. 2022.
- CASTROVERDE, C. D. et al. Biotic factors that induce the tomato Ve1 R-gene. **Plant Science**, v. 265, p. 61–69, 1 dez. 2017.
- CHAVARRO-CARRERO, E. A. et al. Comparative genomics reveals the in planta-secreted *Verticillium dahliae* Av2 effector protein recognized in tomato plants that carry the V2 resistance locus. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 1941–1958, 1 abr. 2021.
- CHECKER, V. G. et al. Role of Phytohormones in Plant Defense: Signaling and Cross Talk. Em: **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**. [s.l.] Springer, Singapore, 2018. p. 159–184.
- CHOI, H. W.; KLESSIG, D. F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. **BMC Plant Biology** **2016 16:1**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 26 out. 2016.
- CHOWDHURY, S.; BASU, A.; KUNDU, S. Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. **Scientific Reports** **2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 8 dez. 2017.
- DE JONGE, R. et al. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 13, p. 5110–5115, 27 mar. 2012.

- DE TOLEDO THOMAZELLA, D. P. et al. Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 27, p. e2026152118, 6 jul. 2021.
- DE WIT, P. J. G. M. The tomato crop. Em: OLIVER, R. P. (Ed.). **Agrios' Plant Pathology, Sixth Edition**. [s.l.] Academic Press, 2024. p. 795–801.
- DEKETELAERE, S. et al. Desirable traits of a good biocontrol agent against Verticillium wilt. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 276684, 6 jul. 2017.
- DENANCÉ, N. et al. Disease resistance or growth: The role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. MAY, p. 44526, 24 maio 2013.
- DERBYSHIRE, M. C. et al. The evolutionary and molecular features of the broad-host-range plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, n. 8, p. 1075–1090, 1 ago. 2022.
- EINSPANIER, S. et al. High-Resolution Disease Phenotyping Reveals Distinct Resistance Mechanisms of Tomato Crop Wild Relatives against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Phenomics**, v. 6, 5 ago. 2024.
- ELLIS, C. et al. The Arabidopsis Mutant *cev1* Links Cell Wall Signaling to Jasmonate and Ethylene Responses. **The Plant Cell**, v. 14, n. 7, p. 1557, 2002.
- ELLIS, C.; TURNER, J. G. The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. **The Plant cell**, v. 13, n. 5, p. 1025–1033, 2001.
- FAOSTAT. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS – FAO DATABASE**. 2023.
- FRADIN, E. F.; THOMMA, B. P. H. J. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 2, p. 71–86, 1 mar. 2006.
- FRIESEN, T. L. et al. Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1421–1428, 1 jul. 2008.
- FRYE, C. A.; TANG, D.; INNES, R. W. Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 1, p. 373–378, 2 jan. 2001.
- GHOZLAN, M. H. et al. Plant Defense against Necrotrophic Pathogens. **American Journal of Plant Sciences**, v. 11, n. 12, p. 2122–2138, 3 dez. 2020.
- GORSHKOV, V.; TSERS, I. Plant susceptible responses: the underestimated side of plant–pathogen interactions. **Biological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 45–66, 1 fev. 2022.

- GU, Y. et al. Nuclear Pore Permeabilization Is a Convergent Signaling Event in Effector-Triggered Immunity. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1526, 8 set. 2016.
- GULLNER, G. et al. Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, p. 427485, 21 dez. 2018.
- HAGEL, J. M.; FACCHINI, P. J. Expanding the roles for 2-oxoglutarate-dependent oxygenases in plant metabolism. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 8, p. 721–734, 15 ago. 2018.
- HAMMAMI, I. et al. Isolation and characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 336, n. 11–12, p. 557–564, nov. 2013.
- HAN, G. Z. Origin and evolution of the plant immune system. **New Phytologist**, v. 222, n. 1, p. 70–83, 1 abr. 2019.
- HOEBERICHTS, F. A.; TEN HAVE, A.; WOLTERING, E. J. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. **Planta**, v. 217, n. 3, p. 517–522, 1 jul. 2003.
- HU, X. et al. Proteome and metabolome analyses reveal differential responses in tomato -*Verticillium dahliae*-interactions. **Journal of Proteomics**, v. 207, p. 103449, 15 set. 2019.
- INDERBITZIN, P.; SUBBARAO, K. V. *Verticillium Systematics and Evolution: How Confusion Impedes Verticillium Wilt Management and How to Resolve It*. 2014.
- ISLAM, S. et al. Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187504, 1 nov. 2017.
- JIANG, S. et al. Enhanced Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica rapa* by Activating Host Immunity through Exogenous *Verticillium dahliae* Asp2-like Protein (VDAL) Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 13958, 1 nov. 2022.
- JONES, J. B. et al. Reclassification of the Xanthomonads Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 755–762, 15 dez. 2004.
- SOUSA, L. J. et al. Expression of tomato susceptibility genes triggered by *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* and disease control by short antisense oligodeoxynucleotide gene silencing. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 128, p. 102163, 1 nov. 2023.
- KABBAGE, M.; WILLIAMS, B.; DICKMAN, M. B. Cell Death Control: The Interplay of Apoptosis and Autophagy in the Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 4, p. e1003287, abr. 2013.

- KALOSHIAN, I.; TEIXEIRA, M. Advances in plant_nematode interactions with emphasis on the notorious nematode genus *Meloidogyne*. **Phytopathology**, v. 109, n. 12, p. 1988–1996, 15 out. 2019.
- KAZAN, K.; LYONS, R. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. **The Plant Cell**, v. 26, n. 6, p. 2285–2309, 28 jul. 2014.
- KIEU, N. P. et al. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- KISSOUDIS, C. et al. Combined biotic and abiotic stress resistance in tomato. **Euphytica**, v. 202, n. 2, p. 317–332, 1 mar. 2015.
- KLOSTERMAN, S. J. et al. Diversity, pathogenicity, and management of verticillium species. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, n. Volume 47, 2009, p. 39–62, 8 set. 2009.
- KOCAL, N.; SONNEWALD, U.; SONNEWALD, S. Cell Wall-Bound Invertase Limits Sucrose Export and Is Involved in Symptom Development and Inhibition of Photosynthesis during Compatible Interaction between Tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1523–1536, 6 nov. 2008.
- KOSEOGLU, E. et al. Susceptibility reversed: modified plant susceptibility genes for resistance to bacteria. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 1, p. 69–79, 1 jan. 2022.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 1 abr. 2006.
- KUMAR, S. P.; SRINIVASULU, A.; BABU, K. R. Symptomology of major fungal diseases on tomato and its management. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 6, p. 1817–1821, 2018.
- LACRAMPE, N. et al. Regulation of sugar metabolism genes in the nitrogen-dependent susceptibility of tomato stems to *Botrytis cinerea*. **Annals of Botany**, v. 127, n. 1, p. 143–154, 1 jan. 2021.
- LANGE, W. H.; BRONSON, L. Insect Pests of Tomatoes. **Annual Review of Entomology**, v. 26, n. Volume 26, 1981, p. 345–371, 1 jan. 1981.
- LANUBILE, A. et al. Transcriptome profiling of soybean (*Glycine max*) roots challenged with pathogenic and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 21 dez. 2015.
- LEHNER, M. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Are *Sclerotinia sclerotiorum* populations from the tropics more variable than those from subtropical and temperate zones? **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 2, p. 61–69, 1 abr. 2017.
- LI, G. et al. Fungal effectors: past, present, and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 81, p. 102526, 1 out. 2024a.

- LI, R. et al. Genomic Analysis Highlights Putative Defective Susceptibility Genes in Tomato Germplasm. **Plants**, v. 12, n. 12, p. 2289, 1 jun. 2023.
- LI, R. et al. Less is more: CRISPR/Cas9-based mutations in DND1 gene enhance tomato resistance to powdery mildew with low fitness costs. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 763, 1 dez. 2024b.
- LI, X. et al. Tomato SR/CAMTA transcription factors SISR1 and SISR3L negatively regulate disease resistance response and SISR1L positively modulates drought stress tolerance. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–19, 28 out. 2014.
- LIN, Z. et al. LeCTR2, a CTR1-like protein kinase from tomato, plays a role in ethylene signalling, development and defence. **The Plant Journal**, v. 54, n. 6, p. 1083, jun. 2008.
- LIU, H.; LIU, J.; WEI, Y. Identification and analysis of the metacaspase gene family in tomato. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 3, p. 523–529, 21 out. 2016.
- LOCCI, F.; PARKER, J. E. Plant NLR immunity activation and execution: a biochemical perspective. **Open Biology**, v. 14, n. 1, 24 jan. 2024.
- LØVDAL, T.; LILLO, C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. **Analytical Biochemistry**, v. 387, n. 2, p. 238–242, 15 abr. 2009.
- LU, X. et al. The *Phytophthora sojae* effector PsFYVE1 modulates immunity-related gene expression by targeting host RZ-1A protein. **Plant Physiology**, v. 191, n. 2, p. 925, 1 fev. 2023.
- MA, K. W.; MA, W. Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. **Plant Molecular Biology** 2016 **91:6**, v. 91, n. 6, p. 713–725, 15 fev. 2016.
- MAIOLI, A. et al. Knock-out of SIDMR6-1 in tomato promotes a drought-avoidance strategy and increases tolerance to Late Blight. **Plant Stress**, v. 13, p. 100541, 1 set. 2024.
- MARTÍNEZ, O. Time course gene expression experiments. Em: ALI, M. A.; LEE, J. (Eds.). **Transcriptome Profiling: Progress and Prospects**. [s.l.] Academic Press, 2023. p. 85–110.
- MAZUMDAR, P. Sclerotinia stem rot in tomato: a review on biology, pathogenicity, disease management and future research priorities. **Journal of Plant Diseases and Protection** 2021 **128:6**, v. 128, n. 6, p. 1403–1431, 2 ago. 2021.

- MCCOMBE, C. L. et al. Molecular plant immunity against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic fungi. **Essays in Biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 581–593, 30 set. 2022.
- MÜLLER, O. A. et al. Genome-Wide Identification and Validation of Reference Genes in Infected Tomato Leaves for Quantitative RT-PCR Analyses. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136499, 27 ago. 2015.
- NICK, C.; SILVA, D. J. H. DA. A cultura. Em: NICK, C.; SILVA, D. J. H. DA; BOREM, A. (Eds.). **Tomate do Plantio à Colheita**. Viçosa-MG: UFV, 2018.
- NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols** 2006 **1:3**, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 9 nov. 2006.
- OLIVER, R. P. (ED.). **Agrios' Plant Pathology, Sixth Edition**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2024.
- PATIL, V.; JANGRA, S.; GHOSH, A. Advances in Antisense Oligo Technology for Sustainable Crop Protection. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 43, n. 6, p. 405–427, 2024.
- PAVAN, S. et al. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. **Molecular Breeding**, v. 25, n. 1, p. 1, 2009.
- PAVESE, V. et al. Identification of susceptibility genes in castanea sativa and their transcription dynamics following pathogen infection. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 913, 2021.
- PENG, S. et al. CONSTITUTIVE EXPRESSER OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 5 is an RNA-binding protein controlling plant immunity via an RNA processing complex. **The Plant Cell**, v. 34, n. 5, p. 1724–1744, 26 abr. 2022.
- PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (Solanum L. section Lycopersicon [Mill.] Wettst. subsection Lycopersicon). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 10, p. 1888–1902, 1 out. 2001.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, 2002.
- QUINET, M. et al. Tomato Fruit Development and Metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 475784, 29 nov. 2019.
- RAMÍREZ-OJEDA, G. et al. Edaphoclimatic Descriptors of Wild Tomato Species (Solanum Sect. Lycopersicon) and Closely Related Species (Solanum Sect. Juglandifolia and Sect. Lycopersicoides) in South America. **Frontiers in genetics**, v. 12, p. 748979, 17 nov. 2021.
- REIS, A.; BOITEYX, L. S.; COSTA, H. **Determinação de espécies e de raças de isolados de Verticillium oriundos de diferentes Estados do Brasil**. Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, , nov. 2007.

Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/781642>>. Acesso em: 24 dez. 2024.

- ROSATI, D. et al. Differential gene expression analysis pipelines and bioinformatic tools for the identification of specific biomarkers: A review. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 23, p. 1154, 1 dez. 2024.
- SCHAARSCHMIDT, S.; ROITSCH, T.; HAUSE, B. Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 15, p. 4015–4023, 1 dez. 2006.
- SEID, A. et al. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) – a century-old battle. **Nematology**, v. 17, n. 9, p. 995–1009, 1 jan. 2015.
- SILVA, R. A. et al. The Population of *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil Is Structured by Mycelial Compatibility Groups. **Plant Disease**, v. 105, n. 11, p. 3376–3384, 1 nov. 2021.
- SIMMS, D.; CIZDZIEL, P. E.; CHOMCZYNSKI, P. **TRizol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=8d9c11a710ea9c93cecf802767ea384493dc5342>>. Acesso em: 28 nov. 2024.
- SINGH, A.; SINGH, I. K. Molecular aspects of plant-pathogen interaction. **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**, p. 1–351, 15 fev. 2018.
- SINGH, V. K.; SINGH, A. K.; KUMAR, A. Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. **3 Biotech**, v. 7, n. 4, p. 1–10, 1 ago. 2017.
- SONG, R. et al. An Overview of the Molecular Genetics of Plant Resistance to the Verticillium Wilt Pathogen *Verticillium dahliae*. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 1120**, v. 21, n. 3, p. 1120, 7 fev. 2020.
- SOUSA, L. J. DE. **Identificação de espécies de Fusarium patogênicas ao grão de bico e indução de genes relacionados a defesa com o uso de extrato de *Rhizobium tropici***. Brasília: Universidade de Brasília, 3 jul. 2020.
- SOUSA, L. J. DE et al. Expression of tomato susceptibility genes triggered by *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* and disease control by short antisense oligodeoxynucleotide gene silencing. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 128, p. 102163, 1 nov. 2023.
- SOUSA, L. J. DE. Estratégias inovadoras visando resistência à mancha bacteriana do tomateiro. 9 abr. 2024.
- SU, X. et al. The dynamic transcriptome and metabolomics profiling in *Verticillium dahliae* inoculated *Arabidopsis thaliana*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15404, 1 dez. 2018.

- SUASTE-DZUL, A. P. et al. Mating types and physiological races of *Verticillium dahliae* in Solanaceae crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 165, n. 1, p. 139–152, 1 jan. 2023.
- SUN, K. et al. Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. **Transgenic Research**, v. 25, n. 5, p. 731–742, 1 out. 2016.
- SUN, K. et al. Silencing of DND1 in potato and tomato impedes conidial germination, attachment and hyphal growth of *Botrytis cinerea*. **BMC plant biology**, v. 17, n. 1, p. 235, 6 dez. 2017.
- TABAEIZADEH, Z. et al. Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 197–202, 1999.
- TÁVORA, F. T. P. K. et al. Shotgun proteomics coupled to transient-inducible gene silencing reveal rice susceptibility genes as new sources for blast disease resistance. **Journal of Proteomics**, v. 241, p. 104223, 15 jun. 2021.
- THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature** **2012** **485:7400**, v. 485, n. 7400, p. 635–641, 30 maio 2012.
- TURNBULL, D. et al. RXLR Effector AVR2 Up-Regulates a Brassinosteroid-Responsive bHLH Transcription Factor to Suppress Immunity. **Plant Physiology**, v. 174, n. 1, p. 356, 1 maio 2017.
- UNG, H.; MOEDER, W.; YOSHIOKA, K. Arabidopsis Triphosphate Tunnel Metalloenzyme2 Is a Negative Regulator of the Salicylic Acid-Mediated Feedback Amplification Loop for Defense Responses. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 1009, 1 out. 2014.
- USAMI, T. et al. Race 2 of *Verticillium dahliae* infecting tomato in Japan can be split into two races with differential pathogenicity on resistant rootstocks. **Plant Pathology**, v. 66, n. 2, p. 230–238, 1 fev. 2017.
- VAN SCHIE, C. C. N.; TAKKEN, F. L. W. Susceptibility genes 101: How to be a good host. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. Volume 52, 2014, p. 551–581, 4 ago. 2014.
- VERONESE, P. et al. The Membrane-Anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 Plays Distinct Roles in Arabidopsis Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens. **The Plant Cell**, v. 18, n. 1, p. 257, 2006.
- VICENTE, M. H. et al. Semi-determinate growth habit adjusts the vegetative-to-reproductive balance and increases productivity and water-use efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 177, p. 11–19, 1 abr. 2015.

- WANG, N. et al. Inactivation of a wheat protein kinase gene confers broad-spectrum resistance to rust fungi. **Cell**, v. 185, n. 16, p. 2961- 2974.e19, 4 ago. 2022.
- WEI, S. et al. Genome-wide characterization of 2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent dioxygenase family genes in tomato during growth cycle and their roles in metabolism. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2021.
- WEIS, C.; HÜCKELHOVEN, R.; EICHMANN, R. LIFEGUARD proteins support plant colonization by biotrophic powdery mildew fungi. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 12, p. 3855, set. 2013.
- WITUSZYŃSKA, W. et al. LESION SIMULATING DISEASE 1 And ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 differentially regulate UV-C-induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, v. 38, n. 2, p. 315–330, 1 fev. 2015.
- WITZEL, K.; BUHTZ, A.; GROSCHE, R. Temporal impact of the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae* on tomato root proteome. **Journal of Proteomics**, v. 169, p. 215–224, 3 out. 2017.
- XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant molecular biology**, v. 80, n. 1, p. 75–84, set. 2012.
- YANG, G. et al. A cerato-platanin protein SsCP1 targets plant PR1 and contributes to virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Phytologist**, v. 217, n. 2, p. 739–755, 1 jan. 2018.
- YUAN, M. et al. A host basal transcription factor is a key component for infection of rice by TALE-carrying bacteria. **eLife**, v. 5, n. JULY, 29 jul. 2016.
- ZAIDI, S. S. E. A.; MUKHTAR, M. S.; MANSOOR, S. Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 898–906, 1 set. 2018.
- ZEILMAKER, T. et al. DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 81, n. 2, p. 210–222, 1 jan. 2015.
- ZHANG, Y. J. et al. S5H/DMR6 Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase That Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis. **Plant Physiology**, v. 175, n. 3, p. 1082–1093, 31 out. 2017.
- ZHAO, C. et al. EDR1 Physically Interacts with MKK4/MKK5 and Negatively Regulates a MAP Kinase Cascade to Modulate Plant Innate Immunity. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 5, p. e1004389, 2014.
- ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 1047, out. 2005.

ZHU, Y. et al. Recent advances in virulence of a broad host range plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*: a mini-review. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1424130, 19 jun. 2024.

Relative Expression Results -TOMATE SC X SCLEROTINIA 6H

Parameter Value

Iterations	2000					
Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8773	0.896			
LSM7	REF	0.8686	1.116			
LSD1	TRG	0.8533	1.419	0.745 - 2.991	0.444 - 4.929	0.159
GST	TRG	0.9477	1.622	0.923 - 2.915	0.329 - 6.543	0.067
DND1	TRG	0.859	0.616	0.350 - 1.015	0.259 - 1.584	0.018 DOWN
DMR6	TRG	0.8752	0.501	0.319 - 0.850	0.155 - 1.865	0.005 DOWN
LIN6	TRG	0.8352	0.773	0.379 - 1.438	0.208 - 2.037	0.281
TF2A	TRG	0.8963	1.935	1.257 - 3.951	0.672 - 7.856	0.008 UP
EDR	TRG	0.8769	1.565	0.931 - 2.703	0.619 - 3.768	0.018 UP

LSD1 sample group is not different to control group. P(H1)=0.159

GST sample group is not different to control group. P(H1)=0.067

DND1 is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.616 (S.E. range is 0.350 - 1.015).

DND1 sample group is different to control group. P(H1)=0.018

DMR6 is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.501 (S.E. range is 0.319 - 0.850).

DMR6 sample group is different to control group. P(H1)=0.005

LIN6 sample group is not different to control group. P(H1)=0.281

TF2A is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.935 (S.E. range is 1.257 - 3.951).

TF2A sample group is different to control group. P(H1)=0.008

EDR is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.565 (S.E. range is 0.931 - 2.703).

EDR sample group is different to control group. P(H1)=0.018

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8773	0.823	0.375 - 1.655	0.240 - 2.887	0.456
LSM7	REF	0.8686	1.026	0.426 - 2.997	0.261 - 5.245	0.932
LSD1	TRG	0.8533	1.304	0.353 - 6.558	0.203 - 17.943	0.598
GST	TRG	0.9477	1.491	0.516 - 5.499	0.127 - 26.407	0.363
DND1	TRG	0.859	0.566	0.186 - 2.027	0.107 - 3.932	0.154
DMR6	TRG	0.8752	0.461	0.134 - 2.045	0.065 - 4.356	0.082
LIN6	TRG	0.8352	0.711	0.311 - 1.711	0.139 - 4.336	0.287
TF2A	TRG	0.8963	1.778	0.503 - 8.916	0.280 - 21.145	0.224
EDR	TRG	0.8769	1.438	0.570 - 3.365	0.305 - 7.735	0.256

Relative Expression Results -TOMATE SC X SCLEROTINIA 12H

Parameter Value

Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8773	0.800			
LSM7	REF	0.8686	1.250			
LSD1	TRG	0.8533	1.793	0.833 - 4.206	0.535 - 7.474	0.031 UP
GST	TRG	0.9477	6.893	3.581 - 15.675	2.663 - 25.766	0.000 UP
DND1	TRG	0.859	0.275	0.104 - 0.669	0.070 - 1.367	0.000 DOWN
DMR6	TRG	0.8752	1.132	0.436 - 2.947	0.233 - 8.621	0.728
LIN6	TRG	0.8352	1.772	0.842 - 3.727	0.464 - 5.189	0.038 UP
TF2A	TRG	0.8963	0.975	0.304 - 2.344	0.177 - 7.362	0.941
EDR	TRG	0.8769	0.539	0.236 - 1.494	0.164 - 2.225	0.049 DOWN

Interpretation

LSD1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.793 (S.E. range is 0.833 - 4.206).

LSD1 sample group is different to control group. P(H1)=0.031

GST is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 6.893 (S.E. range is 3.581 - 15.675).

GST sample group is different to control group. P(H1)=0.000

DND1 is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.275 (S.E. range is 0.104 - 0.669).

DND1 sample group is different to control group. P(H1)=0.000

DMR6 sample group is not different to control group. P(H1)=0.728

LIN6 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.772 (S.E. range is 0.842 - 3.727).

LIN6 sample group is different to control group. P(H1)=0.038

TF2A sample group is not different to control group. P(H1)=0.941

EDR is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.539 (S.E. range is 0.236 - 1.494).

EDR sample group is different to control group. $P(H1)=0.049$

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8773	0.552	0.251 - 1.344	0.118 - 2.054	0.049 DOWN
LSM7	REF	0.8686	0.863	0.348 - 2.605	0.177 - 5.501	0.650
LSD1	TRG	0.8533	1.237	0.276 - 5.093	0.170 - 19.232	0.685
GST	TRG	0.9477	4.758	1.389 - 16.168	0.642 - 57.614	0.004 UP
DND1	TRG	0.859	0.190	0.050 - 0.618	0.035 - 2.094	0.003 DOWN
DMR6	TRG	0.8752	0.781	0.145 - 2.891	0.089 - 24.626	0.698
LIN6	TRG	0.8352	1.223	0.263 - 4.403	0.137 - 9.813	0.641
TF2A	TRG	0.8963	0.673	0.139 - 3.009	0.110 - 13.641	0.428
EDR	TRG	0.8769	0.372	0.162 - 1.088	0.098 - 1.465	0.006 DOWN

Relative Expression Results -TOMATE SC X SCLEROTINIA 48H

Parameter Value

Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8773	0.711			
LSM7	REF	0.8686	1.407			
LSD1	TRG	0.8533	2.463	1.333 - 5.333	0.891 - 9.446	0.001 UP
GST	TRG	0.9477	24.030	14.565 - 43.206	10.465 - 88.631	0.000 UP
DMR6	TRG	0.8752	9.339	5.188 - 15.776	4.021 - 33.468	0.000 UP
LIN6	TRG	0.8352	9.134	5.499 - 17.067	3.353 - 22.004	0.000 UP
TF2A	TRG	0.8963	2.225	1.177 - 5.196	0.705 - 11.438	0.004 UP
EDR	TRG	0.8769	3.627	2.231 - 6.110	1.587 - 9.251	0.000 UP

Interpretation

LSD1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2.463 (S.E. range is 1.333 - 5.333).

LSD1 sample group is different to control group. P(H1)=0.001

GST is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 24.030 (S.E. range is 14.565 - 43.206).

GST sample group is different to control group. P(H1)=0.000

DMR6 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 9.339 (S.E. range is 5.188 - 15.776).

DMR6 sample group is different to control group. P(H1)=0.000

LIN6 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 9.134 (S.E. range is 5.499 - 17.067).

LIN6 sample group is different to control group. P(H1)=0.000

TF2A is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2.225 (S.E. range is 1.177 - 5.196).

TF2A sample group is different to control group. P(H1)=0.004

EDR is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 3.627 (S.E. range is 2.231 - 6.110).

EDR sample group is different to control group. $P(H1)=0.000$

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8773	0.322	0.145 - 0.715	0.077 - 1.281	0.003 DOWN
LSM7	REF	0.8686	0.637	0.253 - 1.838	0.184 - 3.630	0.157
LSD1	TRG	0.8533	1.115	0.312 - 5.984	0.139 - 12.791	0.818
GST	TRG	0.9477	10.875	4.525 - 27.818	3.097 - 114.443	0.000 UP
DMR6	TRG	0.8752	4.226	1.194 - 18.671	0.542 - 56.219	0.004 UP
LIN6	TRG	0.8352	4.134	1.405 - 11.228	0.794 - 24.008	0.001 UP
TF2A	TRG	0.8963	1.007	0.242 - 5.712	0.130 - 19.564	0.993
EDR	TRG	0.8769	1.641	0.570 - 4.556	0.329 - 13.315	0.175

Relative Expression Results-TOMATE P X VERT 8H

Parameter Value

Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8861	1.000			
GST	TRG	0.8509	1.582	1.212 - 2.040	0.999 - 2.442	0.000 UP
LSD1	TRG	0.8398	1.089	0.781 - 1.559	0.550 - 2.093	0.527
GR-RBP	TRG	0.843	2.803	1.958 - 3.929	1.427 - 6.176	0.000 UP
LIN6	TRG	0.8467	4.440	2.345 - 7.594	1.807 - 10.442	0.000 UP
MC7	TRG	0.8474	2.099	1.323 - 3.190	0.972 - 5.016	0.000 UP
CTR2	TRG	0.8518	1.205	0.653 - 2.187	0.424 - 3.443	0.353
TTM2	TRG	0.8683	0.870	0.525 - 1.391	0.332 - 1.904	0.429
DMR6	TRG	0.8322	1.808	1.310 - 2.510	0.981 - 3.281	0.001 UP
MC8	TRG	0.8654	1.353	0.827 - 2.270	0.656 - 3.584	0.088
TPK1	TRG	0.8678	2.543	1.984 - 3.306	1.573 - 4.035	0.000 UP

Interpretation

GST is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.582 (S.E. range is 1.212 - 2.040).

GST sample group is different to control group. P(H1)=0.000

LSD1 sample group is not different to control group. P(H1)=0.527

RPB1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2.803 (S.E. range is 1.958 - 3.929).

RPB1 sample group is different to control group. P(H1)=0.000

LIN6 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 4.440 (S.E. range is 2.345 - 7.594). LIN6 sample group is different to control group. P(H1)=0.000

MC7 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2.099 (S.E. range is 1.323 - 3.190).

MC7 sample group is different to control group. P(H1)=0.000

CTR2 sample group is not different to control group. P(H1)=0.353

TTM2 sample group is not different to control group. P(H1)=0.429

DMR6 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.808 (S.E. range is 1.310 - 2.510).

DMR6 sample group is different to control group. P(H1)=0.001

MC8 sample group is not different to control group. $P(H1)=0.088$

TPK1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2.543 (S.E. range is 1.984 - 3.306).

TPK1 sample group is different to control group. $P(H1)=0.000$

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8861	0.409	0.222 - 0.733	0.158 - 0.932	0.000 DOWN
GST	TRG	0.8509	0.646	0.364 - 1.061	0.246 - 1.321	0.010 DOWN
LSD1	TRG	0.8398	0.445	0.175 - 0.920	0.113 - 1.436	0.004 DOWN
GR-RBP	TRG	0.843	1.145	0.721 - 1.687	0.455 - 1.984	0.335
LIN6	TRG	0.8467	1.814	0.914 - 3.797	0.521 - 6.780	0.033 UP
MC7	TRG	0.8474	0.857	0.393 - 2.140	0.293 - 3.347	0.558
CTR2	TRG	0.8518	0.492	0.246 - 1.173	0.233 - 2.502	0.014 DOWN
TTM2	TRG	0.8683	0.355	0.157 - 0.834	0.068 - 1.456	0.002 DOWN
DMR6	TRG	0.8322	0.739	0.365 - 1.269	0.260 - 1.775	0.153
MC8	TRG	0.8654	0.553	0.247 - 1.604	0.162 - 2.446	0.054
TPK1	TRG	0.8678	1.039	0.516 - 2.133	0.306 - 2.744	0.877

Relative Expression Results -TOMATE P X VERT 24H

Parameter Value

Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8861	1.000			
GST	TRG	0.8509	1.290	0.923 - 1.828	0.745 - 2.354	0.049 UP
LSD1	TRG	0.8398	0.714	0.562 - 0.978	0.419 - 1.460	0.005 DOWN
GR-RBP	TRG	0.843	1.632	1.044 - 2.397	0.721 - 2.696	0.003 UP
LIN6	TRG	0.8467	1.398	0.842 - 2.460	0.592 - 4.015	0.098
MC7	TRG	0.8474	1.126	0.676 - 1.755	0.486 - 2.759	0.479
CTR2	TRG	0.8518	0.999	0.611 - 1.612	0.414 - 3.120	0.997
TTM2	TRG	0.8683	0.903	0.592 - 1.413	0.326 - 1.873	0.530
DMR6	TRG	0.8322	1.029	0.728 - 1.435	0.510 - 1.860	0.809
MC8	TRG	0.8654	1.028	0.725 - 1.428	0.580 - 1.989	0.814
TPK1	TRG	0.8678	1.411	0.896 - 2.244	0.625 - 4.017	0.046 UP

Interpretation

GST is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.290 (S.E. range is 0.923 - 1.828).

GST sample group is different to control group. P(H1)=0.049

LSD1 is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.714 (S.E. range is 0.562 - 0.978).

LSD1 sample group is different to control group. P(H1)=0.005

RPB1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.632 (S.E. range is 1.044 - 2.397).

RPB1 sample group is different to control group. P(H1)=0.003

LIN6 sample group is not different to control group. P(H1)=0.098

MC7 sample group is not different to control group. P(H1)=0.479

CTR2 sample group is not different to control group. P(H1)=0.997

TTM2 sample group is not different to control group. P(H1)=0.530

DMR6 sample group is not different to control group. P(H1)=0.809

MC8 sample group is not different to control group. P(H1)=0.814

TPK1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1.411 (S.E. range is 0.896 - 2.244).

TPK1 sample group is different to control group. P(H1)=0.046

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8861	0.697	0.385 - 1.675	0.289 - 2.018	0.134
GST	TRG	0.8509	0.899	0.480 - 1.900	0.343 - 2.285	0.622
LSD1	TRG	0.8398	0.498	0.251 - 1.107	0.198 - 1.718	0.015 DOWN
GR-RBP	TRG	0.843	1.138	0.722 - 1.821	0.563 - 2.857	0.453
LIN6	TRG	0.8467	0.975	0.433 - 2.738	0.259 - 5.314	0.938
MC7	TRG	0.8474	0.785	0.419 - 1.331	0.338 - 2.233	0.216
CTR2	TRG	0.8518	0.696	0.307 - 1.879	0.236 - 3.727	0.252
TTM2	TRG	0.8683	0.630	0.295 - 1.651	0.167 - 2.321	0.127
DMR6	TRG	0.8322	0.718	0.364 - 1.804	0.251 - 2.688	0.224
MC8	TRG	0.8654	0.717	0.360 - 1.624	0.269 - 2.406	0.203
TPK1	TRG	0.8678	0.984	0.397 - 3.652	0.266 - 5.255	0.963

Relative Expression Results-TOMATE P X VERT 52H

Parameter Value

Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8861	1.000			
GST	TRG	0.8509	2.146	1.267 - 4.182	1.028 - 5.968	0.000 UP
LSD1	TRG	0.8398	0.811	0.600 - 1.146	0.459 - 1.559	0.097
GR-RBP	TRG	0.843	2.180	1.739 - 2.749	1.345 - 3.152	0.000 UP
LIN6	TRG	0.8467	1.321	0.898 - 2.022	0.504 - 2.763	0.085
MC7	TRG	0.8474	0.749	0.478 - 1.164	0.327 - 1.737	0.078
CTR2	TRG	0.8518	0.621	0.356 - 1.169	0.229 - 1.747	0.040 DOWN
TTM2	TRG	0.8683	0.826	0.584 - 1.255	0.290 - 1.592	0.221
DMR6	TRG	0.8322	0.870	0.613 - 1.244	0.400 - 1.609	0.303
MC8	TRG	0.8654	1.150	0.790 - 1.587	0.607 - 2.385	0.283
TPK1	TRG	0.8678	0.687	0.404 - 1.248	0.313 - 1.741	0.062

Interpretation

GST is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2.146 (S.E. range is 1.267 - 4.182).

GST sample group is different to control group. P(H1)=0.000

LSD1 sample group is not different to control group. P(H1)=0.097

RPB1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2.180 (S.E. range is 1.739 - 2.749).

RPB1 sample group is different to control group. P(H1)=0.000

LIN6 sample group is not different to control group. P(H1)=0.085

MC7 sample group is not different to control group. P(H1)=0.078

CTR2 is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.621 (S.E. range is 0.356 - 1.169).

CTR2 sample group is different to control group. P(H1)=0.040

TTM2 sample group is not different to control group. P(H1)=0.221

DMR6 sample group is not different to control group. P(H1)=0.303

MC8 sample group is not different to control group. P(H1)=0.283

TPK1 sample group is not different to control group. P(H1)=0.062

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
PHD	REF	0.8861	1.237	0.886 - 1.813	0.615 - 2.258	0.106
GST	TRG	0.8509	2.655	1.946 - 3.827	1.806 - 4.981	0.000 UP
LSD1	TRG	0.8398	1.003	0.710 - 1.376	0.558 - 2.011	0.980
GR-RBP	TRG	0.843	2.696	2.033 - 3.821	1.458 - 4.836	0.000 UP
LIN6	TRG	0.8467	1.634	1.000 - 2.601	0.701 - 3.983	0.011 UP
MC7	TRG	0.8474	0.927	0.521 - 1.633	0.341 - 2.403	0.705
CTR2	TRG	0.8518	0.769	0.556 - 1.277	0.325 - 1.661	0.121
TTM2	TRG	0.8683	1.022	0.556 - 1.752	0.293 - 2.407	0.911
DMR6	TRG	0.8322	1.076	0.780 - 1.490	0.589 - 1.977	0.528
MC8	TRG	0.8654	1.423	0.910 - 2.290	0.662 - 2.587	0.027 UP
TPK1	TRG	0.8678	0.849	0.541 - 1.318	0.365 - 1.708	0.279