

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

**Perfis de expressão gênica temporal de cana-de-açúcar infectada por
ferrugem alaranjada**

Fernando Henrique Correr

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

**Piracicaba
2016**

Fernando Henrique Correr
Bacharel em Biotecnologia

**Perfis de expressão gênica temporal de cana-de-açúcar infectada por
ferrugem alaranjada**

Orientador:

Prof. Dr. **GABRIEL RODRIGUES ALVES MARGARIDO**

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

Piracicaba
2016

RESUMO

Perfis de expressão gênica temporal de cana-de-açúcar infectada por ferrugem alaranjada

A ferrugem alaranjada é uma doença foliar que afeta a cana-de-açúcar, tendo ganho destaque como uma das principais doenças da cultura. Causada pelo fitopatógeno biotrófico *Puccinia kuehni*, foi relatada em diversos países da América do Sul, incluindo o Brasil. Entender o comportamento desta doença é importante na compreensão de seus mecanismos de infecção. Para isso, o propósito deste trabalho é avaliar o transcriptoma, por sequenciamento de RNA, da resposta da cana-de-açúcar à infecção por *P. kuehni* durante o estabelecimento da doença. O material biológico utilizado correspondeu a folhas de cana-de-açúcar do cultivar suscetível SP89-1115, amostrados no momento da inoculação dos esporos (0 h), 12 horas após a inoculação (hai), 24 hai, 48 hai, 5 dias e 12 dias após a inoculação da ferrugem alaranjada. Após o pré-processamento das leituras, foi realizado o mapeamento de aproximadamente 800 milhões de leituras, utilizando como referência um transcriptoma de cana-de-açúcar obtido a partir do sequenciamento de seis genótipos distintos. Posteriormente, foi realizada a análise de expressão diferencial: *i*) em um teste do tipo Análise de Variância, *ii*) entre a comparação de cada tempo após a infecção contra 0 h e *iii*) pela comparação de tempos adjacentes. Por essa última estratégia, a maioria dos transcritos diferencialmente expressos ocorreu em 12 hai, 48 hai e 12 dai. Através do enriquecimento funcional foram evidenciados processos relacionados principalmente à fotossíntese e oxirredução, importantes na manutenção do metabolismo e sinalização celular sob perturbação. Os perfis de expressão gênica temporal dos transcritos anotados de acordo com termos da base *Gene Ontology*, por sua vez, mostraram ondas invertidas de repressão e estímulo entre as comparações 12 hai vs 0 h e 48 hai vs 24 hai. Através da segunda análise de expressão diferencial houve indícios de que os níveis de expressão dos transcritos eram similares entre 0 h e 48 hai. Portanto, *P. kuehni* pode ter agido no sentido de repressão das vias de resposta de defesa nas primeiras horas seguidas da inoculação, desfavorecendo mecanismos de acúmulo de fitormônios e deposição de lignina na parede celular. O cultivar de cana-de-açúcar pode ter sido prejudicado pela ausência de sistemas de reconhecimento e/ou no combate às proteínas efetoras do patógeno, de modo a ter sido modulado para o estabelecimento fúngico, havendo evidências do restabelecimento parcial da homeostase celular em 48 hai.

Palavras-chave: RNA-Seq, Transcriptoma, *Saccharum*, *Puccinia kuehni*

ABSTRACT

Temporal gene expression profiles of sugarcane infected by orange rust

Orange rust is a foliar disease that affects sugarcane, gaining importance among the main diseases of this crop. Caused by the biotrophic phytopathogen *Puccinia kuehnii*, it has been reported in several countries in South America, including Brazil. Understanding the behavior of this disease is very important in comprehending its mechanisms of infection. The purpose of this work is to evaluate the transcriptome, by RNA sequencing, of the sugarcane response to infection by *P. kuehnii* during the establishment of the disease. The biological material used corresponds to sugarcane leaves from susceptible cultivar SP89-1115, sampled at the time of spore inoculation (0 h), 12 hours post inoculation (hpi), 24 hpi, 48 hpi, 5 days and 12 days post inoculation of orange rust. After pre-processing the reads, we mapped approximately 800 million reads to a reference sugarcane transcriptome obtained from sequencing six different genotypes. Subsequently, we performed differential expression analysis: *i*) in an Analysis of Variance type test; *ii*) comparing each time after inoculation against 0 h and *iii*) by comparing adjacent times. By the latter strategy, most of the differentially expressed transcripts occurred at 12 hpi, 48 hpi and 12 dpi. Through functional enrichment analysis, processes related mainly to photosynthesis and oxidation were evidenced, which are important in metabolic maintenance and cellular signaling under perturbation. The temporal gene expression profiles of *Gene Ontology*-annotated transcripts, in turn, showed reverse repression and stimulus waves between the comparisons 12 hpi vs 0 h and 48 hpi vs 24 hpi. Through the second differential expression analysis we found evidence that the expression levels of the transcripts were similar between 0 h and 48 hpi. Therefore, *P. kuehnii* may have acted in the sense of repressing defense response pathways in the first hours following inoculation, disfavoring mechanisms of phytohormones signaling and lignin deposition in the cell wall. This sugarcane cultivar may have been harmed by the absence of recognition systems and/or in the control of pathogen effector proteins in order to have been modulated for fungal establishment, with evidence of partial reestablishment of cellular homeostasis at 48 hpi.

Keywords: RNA-Seq, Transcriptome, *Saccharum*, *Puccinia kuehnii*

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das culturas agrícolas mais importantes no Brasil, movendo um setor de grande impacto agroindustrial, com destaque para o Estado de São Paulo, onde representa 30% das unidades de produção agropecuária com mais de 5 milhões de hectares ocupados (SÃO PAULO, 2008). Historicamente, vem sendo utilizada principalmente para a produção de açúcar e, há quase cinco décadas, faz parte da cadeia produtiva do etanol, importante biocombustível no cenário nacional e internacional, devido à grande demanda por combustíveis renováveis (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011; MACRELLI *et al.*, 2012). Cabe ressaltar que, além de utilizado como combustível na forma de álcool hidratado, o álcool na forma anídrica é empregado como aditivo para a gasolina (DANTAS *et al.*, 2013).

Historicamente, a primeira fase do melhoramento genético da cana-de-açúcar foi direcionada principalmente ao acúmulo de sacarose nos colmos. Porém, notou-se a necessidade de serem incorporadas outras características, tal como capacidade de perfilhamento e melhor adaptação a diferentes ambientes. Posteriormente, métodos baseados na seleção recorrente, com o uso dos parentais considerados mais favoráveis, foram utilizados no melhoramento genético visando principalmente a produção e acúmulo de açúcar. Uma outra abordagem, porém, é a formação de várias populações pelo cruzamento de parentais contrastantes, permitindo selecionar os indivíduos superiores, em várias fases de avaliação e levando em conta os efeitos ambientais. Nos dois casos, dentre os critérios de seleção, além do conteúdo de sacarose e produção, há destaque para a resistência a doenças e limitações abióticas (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011; JACKSON, 2005). Em relação ao último caráter, JOHNSON (1992) aponta que cada patógeno apresenta seus próprios obstáculos, assim como o hospedeiro é variável em sua resposta. Não obstante, em geral, é necessário verificar fontes de resistência, compreendendo a interação gene-a-gene entre os dois organismos. Essa relação é dinâmica, já que novos genes de virulência podem ser estabelecidos.

Entre as diversas formas de estresse biótico existentes para o cultivo da cana-de-açúcar, está a ferrugem alaranjada, causada por *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler. É um patógeno morfológicamente e molecularmente distinto da ferrugem marrom (*P. melanocephala*), formando grupos arredondados de lesões foliares com distribuição irregular, a partir dos quais há dispersão de esporos de cor laranja, que dão o nome à doença. A ocorrência da primeira epidemia de *P. kuehnii* foi no início do século XXI e afetou drasticamente os canaviais da Austrália onde se empregava a cultivar Q124, com perdas por volta de 45% (BRAITHWAITE *et al.*, 2009; MAGAREY *et al.*, 2001; VIRTUDAZO *et al.*, 2001). BARBASSO *et al.* (2010) relataram e confirmaram a primeira aparição da doença em canaviais brasileiros, a partir de observações durante o ano de 2009 sobre uma cultivar resistente à *P. melanocephala*. Outras três cultivares responsáveis na época por cerca de 10% das áreas com plantio de cana-de-açúcar demonstraram-se altamente suscetíveis, entre elas a SP89-1115. Observando as bases bibliográficas, relatos confirmam a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar na Colômbia (CADAVID *et al.*, 2012), Louisiana (EUA) (GRISHAM *et al.*, 2013), Equador (GARCÉS *et al.*, 2014), República Dominicana (BRIGGS *et al.*, 2014) e, recentemente, na Argentina (FUNES *et al.*, 2016).

As interações entre as proteínas do patógeno e da planta permitem compreender as bases moleculares da suscetibilidade ou resistência à doença, corroborando os estudos epidemiológicos. Essas biomoléculas celulares podem ser compreendidas através de seus transcritos, elementos funcionais do genoma. Para isso, é feita a geração massiva de dados, por meio do sequenciamento das moléculas de RNA mensageiro. A partir daí, pode-se verificar as alterações nos níveis de expressão dos transcritos dada a ocorrência de uma perturbação. Essa estratégia tem importante aplicação no estudo da resposta molecular das plantas à infecção, pois a influência de estresses representa uma fonte de distúrbio que altera os níveis de expressão gênica. Visto que a célula é um sistema dinâmico, considera-se também o tempo como um fator preponderante na variação dos níveis de expressão gênica, verificando-se muitos transcritos de expressão não estacionária. Como os transcritos estão relacionados às proteínas que serão traduzidas

a partir de suas sequências, pode-se verificar através deles o comportamento de vias metabólicas. Com isso visa-se compreender os processos regulatórios existentes em um organismo ao longo de um período estabelecido de ação de um agente estressor (BAR-JOSEPH *et al.*, 2012; MARGUERAT & BÄHLER, 2010; VOGEL & MARCOTTE, 2012; WANG *et al.*, 2009).

Neste contexto, a investigação do RNA total coletado de folhas de cana-de-açúcar infectadas com *P. kuehni* é de grande importância. Em particular, a análise quantitativa dos transcritos ao longo do tempo, durante o período de infecção, pode fornecer evidências a respeito de mudanças nos genes expressos e, conseqüentemente, de sua influência na suscetibilidade da cultivar SP89-1115.

1.1 A cana-de-açúcar no cenário atual

No Brasil, de acordo com o quarto levantamento feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016a), para a safra de 2015/16, o total de cana-de-açúcar colhida para processamento foi de 665,6 milhões de toneladas, dos quais cerca de 59,58% foram direcionados à produção de 30,5 bilhões de litros de álcool, sendo que os 40,42% restantes destinaram-se à produção de 33,5 milhões de toneladas de açúcar. De acordo com as atuais estimativas do mesmo órgão publicadas em Agosto de 2016, para a safra de 2016/17 espera-se uma elevação em torno de 19,3% na produção total de açúcar, com produção de 36,36 milhões de toneladas. Em contrapartida, espera-se uma redução de aproximadamente 9,7% na produção do etanol (CONAB, 2016b).

Tanto o açúcar quanto o álcool, os dois principais produtos comerciais, provêm do caldo da cana. Não obstante, o potencial da cultura se estende em função de mudanças no plantio e nas tecnologias de produção, criando-se produtos complementares como, por exemplo, a utilização do bagaço na co-geração de energia elétrica (bioeletricidade) e, também, na produção de etanol de segunda geração. Desenvolvem-se, também, pesquisas com bioplásticos e de aproveitamento dos demais resíduos, como palha e vinhaça. Trata-se de uma visão de sustentabilidade, na qual o setor busca seu desenvolvimento a partir do seu crescimento econômico com melhorias de práticas, inovação dos produtos e criação de novos programas socioambientais (DANTAS *et al.*, 2013; MACRELLI *et al.*, 2012; VIANA & PEREZ, 2013).

Dessa forma, para suprir toda a necessidade de matéria-prima para atender ao mercado dos produtos e subprodutos acima mencionados, é necessário aumentar a produtividade sem que se aumente a área de cultivo. Assim, buscam-se continuamente melhorias das técnicas de plantio e colheita, bem como do próprio potencial genético dos cultivares. Com isso, para a maior eficiência no uso da área cultivada, os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar devem atentar-se, além de elevada produção, à redução dos recursos naturais utilizados pela planta (SCORTECCI *et al.*, 2012).

1.2 Importância da ferrugem alaranjada

Em relação a formas bióticas de estresse responsáveis por problemas no cultivo, a cultura é afetada por pragas agrícolas e doenças de grande impacto, com destaque para três doenças fúngicas: o carvão, causado por *Sporisorium scitamineum*, a ferrugem marrom, ocasionada por *P. melanocephala*, e a ferrugem alaranjada, causada por *P. kuehni* (MOREIRA, 2013). A primeira doença atua principalmente sobre o meristema apical, enquanto as duas ferrugens se estabelecem nas folhas. Resultados indicam que a perda em produtividade causada pela *P. melanocephala*, agente causador da ferrugem marrom, é da ordem de 47% em cultivares suscetíveis. Para *S. scitamineum*, responsável pelo carvão, demonstrou-se uma perda de produtividade média de 0,78% para cada 300 touceiras infectadas por hectare (BURNQUIST & VEGA, 1995).

Como uma forma de caracterizar visualmente o impacto sobre o hospedeiro, é notável que as ferrugens, como patógenos foliares, têm como principais sintomas a clorose e a necrose. SOOD *et al.*

(2009) criaram uma escala para mensurar a infecção das ferrugens nas folhas de cana-de-açúcar, em que 0 significa ausência de sintomas, 1 a presença de manchas cloróticas, 2 quando há presença de lesões (na coloração da ferrugem), 3 quando há de uma a cinco pústulas com esporos e 4 quando o número de pústulas for superior a cinco. Esses autores também utilizaram essa escala de sintomas para caracterizar os cultivares quanto à resistência às ferrugens da cana-de-açúcar: um cultivar com valor de 0 a 1 é considerado resistente; na classe 2 é considerado moderadamente resistente; e nas classes 3 e 4 o cultivar é dito suscetível. No caso particular de *P. kuehni*, observou-se redução significativa e linear de medidas como a condutância estomática e a taxa de fotossíntese, nas porções infectadas de folhas classificadas nos níveis 2, 3 e 4 de infecção (ZHAO *et al.*, 2011).

Comumente em plantas resistentes, a morte de células do tecido vegetal nas proximidades da infecção leva ao acúmulo de fitoalexinas tóxicas ao patógeno e estimula a defesa nas células circundantes, o que representa um mecanismo de defesa localizado de uma interação planta-patógeno incompatível. Isto é resultado de uma intensa e específica relação de reconhecimento de genes de avirulência do patógeno por genes de resistência do hospedeiro, conhecida como resistência sistêmica adquirida. Esta, por sua vez, varia com o estágio desenvolvimental do hospedeiro, com constante reestabelecimento das relações entre raças do patógeno e os cultivares, em um escopo evolutivo (DANGL & JONES, 2001; KEEN, 1990; WHALEN, 2005).

Para que a interação entre os produtos gênicos ocorra durante o processo de estabelecimento de uma doença sobre o hospedeiro, é necessário um período de estabelecimento do patógeno sobre o tecido. Diversas vias de sinalização são importantes, tanto para a ação dos sistemas de defesa do hospedeiro, quando este é resistente, quanto para promover a completa disseminação do patógeno, no caso da suscetibilidade (GREENBERG & YAO, 2004). Desse modo, o estudo do transcriptoma é fundamental para a compreensão desse estado fisiológico, pois permite a avaliação dos genes expressos pelos dois organismos, bem como de suas interações, a partir da avaliação dos elementos funcionais do genoma (WANG *et al.*, 2009). O grande impacto dos estresses bióticos sobre os cultivares suscetíveis (SCORTECCI *et al.*, 2012) justifica o entendimento de como essa relação se estabelece.

1.3 Bases moleculares da infecção fúngica e resposta do hospedeiro

KNOGGE (1996) aponta, de forma geral, a existência de três tipos de gravidade de infecção sobre o vegetal, correlacionados ao espectro de atuação dos fungos fitopatogênicos: *i*) Os de baixa virulência, quando há capacidade de se estabelecer em vários hospedeiros; *ii*) Os de alta virulência sobre um pequeno grupo de hospedeiros, mas que não são parasitas obrigatórios; *iii*) E os virulentos obrigatoriamente parasitas, cuja sobrevivência se dá com total dependência do organismo hospedeiro. Neste último pode se enquadrar *P. kuehni*, com comportamento biotrófico característico das ferrugens (BRAITHWAITE *et al.*, 2009; DUPLESSIS *et al.*, 2011; VIRTUDAZO *et al.*, 2001). KNOGGE (1996) considera ainda que os dois organismos envolvidos, patógeno e planta, realizam uma troca de sinais que reflete no desencadeamento dessa relação, ou seja, na resistência ou suscetibilidade vegetal, virulência ou avirulência do fungo.

Dado que o principal objetivo de um fungo fitopatogênico é conseguir nutrientes através da introdução de haustórios nas células hospedeiras, JONES & DANGL (2006) relatam dois principais sistemas imunes para que esse processo não seja bem-sucedido. O primeiro sistema imune ocorre pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) por receptores de reconhecimento transmembranares (PRR), que é conhecido por *plant-triggered immunity* (PTI). Porém, esse sistema não desencadeia uma indução da resposta hipersensitiva tão eficiente (Figura 1.1), podendo, dessa maneira, ser superado pela secreção de proteínas efetoras, causando a suscetibilidade desencadeada por efetores (*effector-triggered susceptibility* - ETS).

Caso a planta possua uma proteína de um gene de resistência, esta atuará sobre um efector

produzido pelo fungo, desde que haja correspondência entre eles. Em vista disso, é determinado o segundo sistema de defesa, conhecido como imunidade desencadeada por efector (*effector-triggered immunity* - ETI), motivo pelo qual o gene do efector é conhecido como de avirulência. Porém, por se tratar de um sistema complexo, um novo efector pode induzir novamente a ETS e um novo gene hospedeiro pode agir para que se estabeleça a ETI (Figura 1.1). Portanto, trata-se de uma cascata de reconhecimento das moléculas secretadas pelo patógeno e genes de resistência da planta, um modelo *zig-zag*. Esta interação resultará em uma planta resistente quando a ação de ETS for inferior à PTI somada a uma eficaz ETI (JONES & DANGL, 2006).

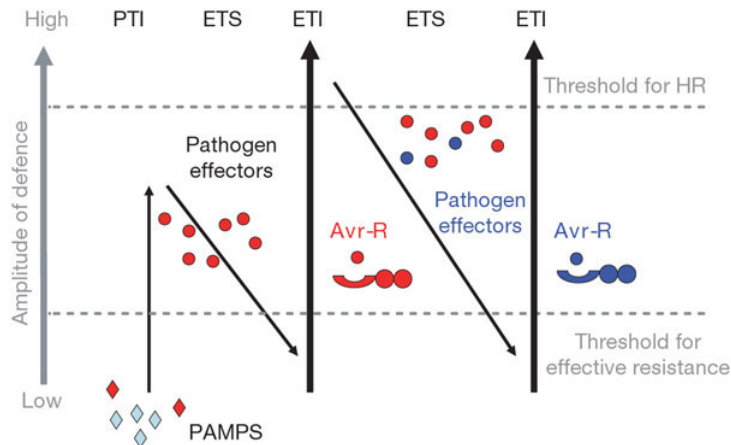


Figura 1.1. Interações moleculares no processo de interação planta-patógeno. O reconhecimento inicial dos PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) conduz à PTI (*plant-triggered immunity*) e, caso efetores sejam produzidos, haverá ETI (*effector-triggered immunity*) se houver genes de resistência. A relação dos efetores fúngicos com os genes de resistência do hospedeiro é de um para um. Caso não haja uma correspondência por parte de um gene de resistência, o efector será chamado de virulento. Tais padrões constituem o chamado modelo *zig-zag*. Fonte: JONES & DANGL (2006).

O interesse em compreender as bases moleculares da infecção fúngica por meio do acúmulo de transcritos vem de trabalhos como o de LAWTON & LAMB (1987), no qual o mRNA produzido a partir de genes em condições normais era comparado ao uso de um tratamento com elicitor fúngico. De maneira similar, SCHMELZER *et al.* (1989) mantiveram a atenção sobre poucos genes específicos relacionados às vias de defesa, como a via da fitoalexina, na qual um dos compostos essenciais para sua formação é a fenilalanina amônio liase (*Phenylalanine ammonia-lyase* - PAL).

As proteínas codificadas pelos genes de resistência são tipificadas por dois domínios principais: *nucleotide binding* (NB) e *leucine-rich repeat* (LRR) (JONES & DANGL, 2006), além de um domínio variável na extremidade amino-terminal (TAKKEN *et al.*, 2006). A ação de um efector de um gene de avirulência (*Avr*) ocorre pela ação em proteínas substrato, como é o caso da clivagem da proteína PBS1 pelo *AvrPphB* em *Arabidopsis thaliana*. Isso permite a ativação indireta, por meio de sinalização celular, de uma proteína NBS-LRR. Além disso, as proteínas NBS-LRR são reguladas por outras proteínas, como é o caso de RIN4 com ação *trans* sobre RPM1 e RPS2 (ambas NBS-LRR), bem como podem ser estabilizadas por ação *trans* de HSP90 (BELKHADIR *et al.*, 2004; TAKKEN *et al.*, 2006). As interações formadas por uma proteína substrato podem ser: *i*) de regulação negativa quando essa proteína é ligada a uma proteína de resistência, a qual será liberada se um efector fizer a clivagem do substrato; *ii*) de ativação de um membro NBS-LRR, quando um *Avr* causar a fosforilação do substrato (TAKKEN *et al.*, 2006).

A sinalização é deveras relevante, com os fitormônios sendo os principais atuantes nesse processo. Eles são importantes não só no crescimento, mas o balanço de certas categorias de hormônios, bem como

a interação entre elas, tem ação direta no comportamento do sistema de defesa das plantas (HUOT *et al.*, 2014; ROBERT-SEILANIANZ *et al.*, 2011). Ademais, as vias de sinalização têm etapas conduzidas por transdutores de sinais dos estímulos de reconhecimento do patógeno, como as cascatas de cinase do tipo MAP. Os fatores de transcrição WRKY, por outro lado, atuam no sentido de estímulo ou repressão da transcrição dos genes de defesa (JONES & TAKEMOTO, 2004). Há um último mecanismo de sinalização, mais generalista entre diferentes formas de estresse, que são as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS), cujo acúmulo e propagação podem ser indicativos de perturbação nas células. Ademais, essa classe de moléculas possui diferentes alvos e relaciona-se com outras substâncias que promovem sua detoxificação e agem sobre outros alvos, aumentando a gama de processos relacionados com a defesa (LEHMANN *et al.*, 2015).

1.4 Melhoramento genético e recursos genômicos da cana-de-açúcar

O nome cana-de-açúcar representa espécies pertencentes a um grupo de gramíneas tropicais para o qual, no intuito de reunir caracteres de acúmulo de sacarose e robustez de espécies distintas, delinearam-se os programas de melhoramento genético para a obtenção de cultivares. São membros da família Poaceae, tribo Andropogoneae, subtribo Saccharinae, gênero *Saccharum*. Cultivadas pelo acúmulo de sacarose, das quais são reconhecidas quatro espécies: *Saccharum officinarum*, *S. barberi*, *S. edule* e *S. sinense*; e outras duas tidas como selvagens: *S. spontaneum* e *S. robustum*, de ampla distribuição. Em complemento, notam-se outras espécies proximamente relacionadas, o que dá origem ao chamado complexo *Saccharum*, formado com os gêneros de gramíneas *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya* e *Narenga* (MOORE *et al.*, 2013; DANIELS & ROACH, 1987).

No tocante à organização genômica da cana-de-açúcar, a hibridação interespecífica entre as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, com menor contribuição das espécies *S. sinensi*, *S. robustum* e *S. barberi*, permitiu a obtenção dos cultivares modernos. Devido a recorrentes retrocruzamentos com *S. officinarum*, tais cultivares são caracterizadas geneticamente por altos níveis de ploidia, com frequente aneuploidia, encontrando-se usualmente de 10 a 13 conjuntos de cromossomos, com cerca de oito homólogos para cada cromossomo oriundo de *S. officinarum*, até 23% dos cromossomos provenientes de *S. spontaneum* e uma quantidade menor, até cerca de 13%, de recombinantes entre essas espécies (GRIVET & ARRUDA, 2002; PIPERIDIS *et al.*, 2010).

No que diz respeito à similaridade genética, KIM *et al.* (2014) fizeram uso de sequências parálogas e ortólogas para realizar comparações entre o gênero *Saccharum*, *Miscanthus*, sorgo (*Sorghum bicolor*) e milho. Os autores concluíram que a separação entre as subtribos Saccharinae e Sorghinae se deu há 5,4 milhões de anos. Sugeriram que, após a divergência em relação ao sorgo, *Saccharum* e *Miscanthus* compartilharam um evento de duplicação de todo o genoma e, além disso, em *Saccharum*, houve um evento de duplicação exclusivo no gênero. Os resultados estimam em 3,1 milhões de anos a divergência entre esses dois gêneros.

Embora não haja ainda um genoma de cana-de-açúcar completamente sequenciado e montado, DE SETTA *et al.* (2014) abordaram funcionalmente o genoma da espécie pelo uso de análises comparativas com *Expressed Sequence Tags* (ESTs) de cana-de-açúcar, arroz e sorgo. Estes autores salientaram também a presença de grande quantidade de elementos transponíveis, com destaque para retrotransposons de longa repetição terminal. De fato, estes elementos podem estar relacionados ao processo evolutivo da espécie, por atuar no aumento do tamanho do genoma. As regiões entre genes que não codificam elementos transponíveis variaram no comprimento e na presença desses elementos. Em complemento, houve picos de pequenos RNAs mapeados a essas regiões, indicando que os elementos transponíveis sofrem ação regulatória. Além disso, obteve-se uma riqueza de sequências codantes funcionais ligadas a diversos processos biológicos.

DE SETTA *et al.* (2014) corroboraram, também, a semelhança entre o genoma da cana-de-açúcar e o genoma do sorgo, uma gramínea diploide proximalmente aparentada ao gênero *Saccharum*. A semelhança entre as duas espécies, frente a outras gramíneas, é ainda evidenciada por resultados que comprovam a sintenia entre elas (MING *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2010). NISHIYAMA *et al.* (2014) montaram *contigs* de transcritos de cana-de-açúcar provenientes do cultivar SP80-3280, de um acesso de *S. officinarum* e um de *S. spontaneum* e puderam alinhá-los com transcritos de várias espécies da família *Poaceae*, sendo que a porcentagem de alinhamento era maior conforme a proximidade da espécie com a cana-de-açúcar. Além disso, esses autores inferiram que diversas espécies do gênero *Saccharum* compartilham boa parte do genoma entre si.

Na tentativa de elucidar o genoma dessa importante gramínea, alguns trabalhos lançaram mão de estratégias no nível de DNA e RNA. Com técnicas de alto rendimento, a atenção foi centrada em usar plataformas de leituras longas (WANG *et al.*, 2010; DE SETTA *et al.*, 2014) ou de leituras mais curtas (BERKMAN *et al.*, 2013). GRATIVOL *et al.* (2014) restringiram a montagem ao genoma hipometilado, filtrando as regiões metiladas, de modo que a retirada de regiões de baixa complexidade (elementos transponíveis, rDNA e regiões centroméricas) favoreceu a montagem de regiões de baixo número de cópias, o que refletiu nas estimativas de qualidade da montagem. Por uma estratégia híbrida, combinando as plataformas PacBio e Illumina, 178 BACs aleatórios resultaram em uma montagem de 19,2Mb contida em aproximadamente 2,45 mil *scaffolds* (OKURA *et al.*, 2016).

Em nível transcricional, o primeiro grande esforço foi o projeto SUCEST, que a partir de bibliotecas de diferentes tecidos em distintos estágios de desenvolvimento produziram mais de 200 mil ESTs (VETTORE *et al.*, 2003). Porém, nos últimos anos as tecnologias de sequenciamento e os algoritmos de montagem favoreceram a construção de transcriptomas *de novo*. Nesse tipo de abordagem se encontram o transcriptoma conjunto de seis genótipos construído por CARDOSO-SILVA *et al.* (2014), o transcriptoma dos cultivares IACSP04-065 e IACSP04-627, contrastantes quanto ao conteúdo de lignina de VICENTINI *et al.* (2015) e outro que considerou um cultivar híbrido e dois acessos ancestrais (NISHIYAMA *et al.*, 2014).

Com o acúmulo de informações estruturais e funcionais sobre o genoma, novas pesquisas apontam o potencial uso de técnicas biotecnológicas no aumento da produtividade agrícola, em especial no tocante ao uso da técnica da transgenia para conferir as características de maior interesse no cenário atual. Algumas de tais características são difíceis de incorporar ou demandam muito tempo através do melhoramento clássico, como é o caso do aumento do conteúdo de sacarose das plantas de cana-de-açúcar e tolerância a estresses, bióticos ou abióticos (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011).

1.5 O estudo do transcriptoma através do sequenciamento de RNA

O transcriptoma é definido como a coleção de todas as moléculas de RNA expressas em um dado momento, as quais incluem o RNA mensageiro e os demais RNA não codantes (DE KLERK *et al.*, 2014). Diversos estudos dos transcritos de um organismo concentraram-se principalmente no uso de microarranjos, em que moléculas de cDNA produzidas a partir da transcrição reversa de RNA hibridizam-se com curtas sequências pré-determinadas, estabelecidas de acordo com genes já identificados no genoma.

Porém, avanços recentes fazem com que a transcrição reversa do mRNA em cDNA possibilite a obtenção de sequências em grande quantidade, através do uso de plataformas de comumente utilizadas para o sequenciamento de DNA, técnica que passou a ser conhecida por sequenciamento de RNA (RNA-Seq). Paralelamente, desenvolveram-se estratégias para o estudo dessas sequências por meio de ferramentas computacionais (OZSOLAK & MILOS, 2011). Previa-se que o progresso advindo dos estudos de larga-escala conduzisse a tecnologia do sequenciamento a patamares de maior aplicabilidade, tornando-se peça fundamental dos estudos genéticos modernos (LIU *et al.*, 2012).

Atualmente, o alto rendimento, custos reduzidos e a análise massiva paralela são os princípios que permitem a competitividade do sequenciamento de nova geração (LIU *et al.*, 2012). Como já ressaltado anteriormente, as principais plataformas de sequenciamento de DNA foram adaptadas aos métodos de sequenciamento de RNA. Há uma subdivisão em duas classificações principais: *i*) o método baseado em *tag* e *ii*) o método *shotgun*, os quais diferem quanto ao tamanho e especificidade do fragmento sequenciado. A partir da sobreposição destes fragmentos quando alinhados a um genoma de referência devidamente anotado, os transcritos expressos em uma determinada condição são identificados (DE KLERK *et al.*, 2014).

Genomas maiores, como é o caso da cana-de-açúcar, demandam sequenciamento com profundidade de cobertura mais elevada (WANG *et al.*, 2009). No sequenciamento de nova geração, preza-se pelo alto rendimento de sequências e, especificamente no caso do RNA, tal tendência revolucionou a forma de compreensão do transcriptoma. É possível quantificar níveis de expressão com maior acurácia, o que auxilia estudos de expressão diferencial, sendo também fundamental na descoberta de novos transcritos, a partir da identificação de isoformas (TRAPNELL *et al.*, 2009). Mesmo em eucariotos cujo genoma é de grande complexidade, pode-se amostrar o transcriptoma virtualmente em sua totalidade, o que resulta em informações sobre a junção dos éxons, modificações pós-transcricionais e variações que podem ter ocorrido nos genes transcritos, a partir dos dados de outros indivíduos de uma mesma espécie (WANG *et al.*, 2009).

Devido à existência prévia de recursos genômicos e transcriptômicos, é possível realizar comparações de novos dados do genoma e/ou transcriptoma com aqueles já disponíveis em bancos de dados, sendo que as novas descobertas podem ser incorporadas a tais repositórios. Na ausência de um genoma de referência da cana-de-açúcar, é factível proceder o alinhamento das leituras utilizando um transcriptoma como referência. Visto que há três montagens de transcriptoma disponíveis (CARDOSO-SILVA *et al.*, 2014; NISHIYAMA *et al.*, 2014; VICENTINI *et al.*, 2015), pode-se explorar esses recursos para identificar os transcritos a partir das leituras alinhadas e medir as alterações nos níveis de expressão dos transcritos de referência. Em seguida, verificam-se suas anotações para entender se determinadas vias metabólicas são estimuladas ou reprimidas. Um cuidado necessário é selecionar a referência mais adequada aos dados, pois deve abranger os transcritos relacionados a uma determinada forma de perturbação que é objeto de estudo.

Todos esses processos são possíveis graças à disponibilidade de ferramentas de bioinformática para análise dos dados biológicos. Algumas delas, como o *Bowtie2* (LANGMEAD & SALZBERG, 2012), são utilizadas para o mapeamento de leituras à referência; outras lidam até mesmo com sítios de splicing, como o *TopHat2* (KIM *et al.*, 2013) e o *HISAT2* (KIM *et al.*, 2015), possibilitando o estudo de isoformas dos transcritos. Em relação à expressão diferencial dos genes, ferramentas como *Cufflinks* (TRAPNELL *et al.*, 2009), *DESeq2* (LOVE *et al.*, 2014) e *edgeR* (ROBINSON *et al.*, 2009) são interessantes em estudos de organismos submetidos a condições experimentais contrastantes, como estresses, verificando-se a mudança na expressão de genes relacionados às vias metabólicas de interesse.

Não obstante esses avanços, é ainda essencial planejar cuidadosamente o experimento. Visto que as plantas possuem um sistema dinâmico e são sensíveis às mudanças ambientais, é imprescindível analisar os dados adequadamente, de modo a evitar viés ou confundimento de efeitos. As pesquisas com plantas, quando relacionadas à expressão gênica, exigem cautela na condução do experimento e na coleta dos dados, tendo-se atenção para que outras fontes de variação sejam minimizadas, bem como para a definição de tecido(s) e/ou momento(s) para a coleta do material biológico (YANG & WEI, 2015).

Há na literatura trabalhos publicados referentes à investigação de transcritos de cana-de-açúcar. Um desses trabalhos demonstra que, embora clones de cDNA aleatórios não possuíssem especificidade ao tecido e/ou fase do desenvolvimento dos tecidos, havia variação na intensidade dos clones entre folhas e colmos. Isso permitiu atribuir aqueles que eram diferencialmente expressos para cada tipo de tecido,

alguns deles com homologia a outros genes de plantas (CARSON *et al.*, 2002). Por sua vez, dentre 119 transcritos diferencialmente expressos, CASU *et al.* (2007) constataram quais eram exclusivos a cada estágio fenológico do colmo. Por conseguinte, foram identificados transcritos participantes do processo de formação da parede celular. Similarmente a esses resultados de microarranjos, VICENTINI *et al.* (2015) também encontraram alterações na biossíntese de lignina, mas com um conjunto de resultados superior a dois mil transcritos com expressão diferencial, obtidos pelo sequenciamento de entrenós de dois cultivares contrastantes para conteúdo desse composto.

Em relação aos estresses abióticos, NOGUEIRA *et al.* (2003) atentaram-se à influência do estresse térmico na composição de ESTs do cultivar SP80-3280. As maiores variações entre as temperaturas 4°C e 26°C, seja no sentido de estímulo ou repressão, foi identificado em 48h. Diferentes tempos de exposição a esse estresse viabilizaram a observação do comportamento desses transcritos sob a forma de perfis de expressão temporal. Já ROCHA *et al.* (2007) contemplaram o estresse hídrico, em que transcritos tardios responderam de forma exclusiva em 72 h e 120 h após o início da supressão do fornecimento de água. Todavia, quando avaliado o déficit nutricional de fósforo, a expressão diferencial dos transcritos foi mais breve. Além desses estresses, os autores expandiram os resultados sobre perturbações às categorias de tratamento com hormônios, herbivoria e simbiose.

Quanto ao transcriptoma baseado em bibliotecas de diferentes cultivares, pôde-se já encontrar genes relacionados ao acúmulo de sacarose e resposta a doenças, além de diversos outros processos metabólicos fundamentais à fisiologia do vegetal (CARDOSO-SILVA *et al.*, 2014). NISHIYAMA *et al.* (2014) verificaram que, embora o número de transcritos genótipo-específicos fosse baixo entre a cultivar híbrida SP80-3280, *S. officinarum* e *S. spontaneum*, eles podem estar relacionados com mudanças importantes na região expressa que diferenciam os seus fenótipos.

Já a interação entre a cana-de-açúcar com um patógeno pode ser examinada pela composição de transcritos de uma biblioteca construída para essa finalidade. SCHAKER *et al.* (2016) propuseram um estudo de avaliação temporal através do uso de um transcriptoma de referência da cana-de-açúcar, combinado aos transcritos obtidos pela montagem das leituras não alinhadas a essa referência. Tais leituras foram geradas pelo sequenciamento de RNA de bibliotecas de cana infectada por carvão, em dois momentos de infecção, 120 horas e 200 dias após a inoculação com *S. scitamineum*. Os resultados indicaram alterações no metabolismo de amido e sacarose, fixação de carbono e outras vias do desenvolvimento vegetal. No tempo final, os genes dos processos celulares e metabólicos mostraram-se reprimidos, em detrimento ao surgimento de genes classificados para sistema imune e processos multiorganismos.

1.6 Estudos de expressão diferencial e perfis de expressão gênica

A técnica do RNA-Seq permite a quantificação da abundância dos transcritos, ou seja, fragmentos oriundos dos transcritos podem ser identificados e é possível determinar os níveis de expressão gênica (WANG *et al.*, 2009). Dessa forma, pode-se proceder à comparação da intensidade de expressão em condições diferentes entre si, isto é, conduzir análises de expressão gênica diferencial. Assim, os perfis do transcriptoma são comumente utilizados na busca de genes diferencialmente expressos, que são aqueles em que há diferença no nível de expressão entre diferentes condições (SONESON & DELORENZI, 2013).

Desta forma, quando é feita a imposição de estresse sobre um organismo, durante a condução de um experimento, espera-se que ocorra variação no nível de expressão dos transcritos em relação à condição não perturbada. Tais mudanças podem ser observadas ao longo do tempo e os resultados podem ser verificados por técnicas que mensurem o nível de expressão gênica, a exemplo da RT-PCR. FERNANDEZ *et al.* (2012), por esta metodologia, identificaram, em folhas infectadas, aproximadamente 7 mil *contigs* correspondentes ao patógeno causador da ferrugem do café. A partir desse conjunto, dentre aqueles preditos como genes, fez-se a seleção de 22 *contigs* e, com isso, foi averiguado quais eram seus

níveis de expressão pela comparação de quatro tempos distintos. A indução foi mais pronunciada 18 horas após inoculação (hai), 7 dias após a inoculação (dai) e 21 dai.

Para o estudo adequado de dados oriundos de uma análise temporal, os pontos ao longo do tempo escolhidos para amostragem, bem como o intervalo entre eles, devem ser planejados a partir do impacto que o estresse causa no vegetal e o grau esperado de diferenciação entre os perfis de expressão nos diversos momentos. Paralelamente, o número de réplicas biológicas deve ser suficiente para que erros na condução do experimento e execução dos protocolos experimentais, bem como o efeito da variação ao acaso, sejam minimizados (YANG & WEI, 2015).

1.7 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é elucidar, ao longo do tempo, o impacto da infecção do agente patogênico *Puccinia kuehnii* sobre o cultivar suscetível de cana-de-açúcar SP89-1115. A metodologia foi embasada pelo uso de dados do transcriptoma de folhas infectadas do cultivar, os quais foram gerados a partir do sequenciamento de RNA. Para isso, foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

- Pré-processar as leituras brutas e realizar o controle de qualidade dos dados de sequenciamento;
- Quantificar as leituras de cada amostra alinhadas a cada transcrito;
- Detectar a presença de transcritos diferencialmente expressos;
- Realizar análise funcional para verificar quais vias biológicas são alteradas pelo desenvolvimento do patógeno sobre o tecido do hospedeiro;
- Obter perfis de expressão gênica temporal para transcritos anotados em categorias funcionais de interesse.

2 CONCLUSÃO

A análise de expressão diferencial a partir da avaliação dos diferentes momentos da infecção revelaram que a influência de *P. kuehni* sobre a cana-de-açúcar acarretou modificações substanciais nos níveis de expressão dos transcritos. A partir do teste conjunto, foi possível perceber quais os principais processos influenciados ao longo do desenvolvimento da doença. Além disso, a estratégia de comparação da expressão diferencial entre tempos adjacentes possibilitou encontrar as alterações dos componentes moleculares em vias metabólicas específicas. Algumas dessas modificações evidenciaram-se exclusivamente em dados momentos, enquanto que outras exibiram padrões antagônicos em tempos distintos.

Com base nos perfis de expressão temporal, pode-se observar que as mudanças metabólicas mais drásticas ocorreram principalmente nos tempos iniciais após a inoculação. O nível de expressão de diversos transcritos retornou aos níveis basais após o provável estabelecimento do fungo, o que potencialmente reflete menor influência do patógeno no metabolismo vegetal.

Por ser um cultivar suscetível, SP89-1115 pode ter sido desfavorecido em mecanismos como a sinalização através das espécies reativas de oxigênio e em barreiras estruturais como, por exemplo, a deposição de lignina na parede celular.

REFERÊNCIAS

- ANDERS, S. & W. HUBER, 2010 Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**: R106.
- ANDREWS, S., 2010 FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> .
- BAR-JOSEPH, Z., A. GITTER, & I. SIMON, 2012 Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. *Nature Reviews Genetics* **13**: 552–564.
- BARBASSO, D., H. JORDÃO, W. MACCHERONI, J. BOLDINI, J. BRESSIANI, & A. SANGUINO, 2010 First Report of *Puccinia kuehnii* , Causal Agent of Orange Rust of Sugarcane, in Brazil. *Plant Disease* **94**: 1170–1170.
- BELKHADIR, Y., R. SUBRAMANIAM, & J. L. DANGL, 2004 Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 391–399.
- BENJAMINI, Y. & Y. HOCHBERG, 1995 Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**: 289 – 300.
- BERGER, S., A. K. SINHA, & T. ROITSCH, 2007 Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4019–4026.
- BERKMAN, P. J., R. E. CASU, J. STILLER, A. L. RAE, A. L. R. A. E. AITKEN, & K. S, 2013 Towards the sugarcane genome sequence and an understanding of polyploidy. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* **28**.
- BOL, J. F., H. J. M. LINTHORST, & B. J. C. CORNELISSEN, 1990 Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus-Infection. *Annual review of phytopathology* **28**: 113–138.
- BRAITHWAITE, K. S., B. J. CROFT, R. C. MAGAREY, & T. SCHARASCHKIN, 2009 Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. *Australasian Plant Pathology* **38**: 380–388.
- BRIGGS, G. C., Z. NAKHID, A. T. ALLEYNE, J. AYATS, J. O. DESPRADEL, & W. ELIBOX, 2014 First Report of Orange Rust Disease of Sugarcane in the Dominican Republic. *Plant Disease* **98**: 1010–1010.
- BURNQUIST, W. L. & J. VEGA, 1995 Sugarcane diseases in southern Brazil: A brief report. Em *Sugarcane Germplasm Conservation and Exchange*, editado por B. J. Croft, C. M. Piggitt, E. S. Wallis, & D. M. Hogarth, pp. 59–61, Canberra: ACIAR Proceedings.
- CADAVID, M., J. C. ÁNGEL, & J. I. VICTORIA, 2012 First Report of Orange Rust of Sugarcane Caused by *Puccinia kuehnii* in Colombia. *Plant Disease* **96**: 143–143.
- CARDOSO-SILVA, C. B., E. A. COSTA, M. C. MANCINI, T. W. A. BALSALOBRE, L. E. COSTA CANESIN, L. R. PINTO, M. S. CARNEIRO, A. A. F. GARCIA, A. P. DE SOUZA, & R. VICENTINI, 2014 De novo assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. *PLoS ONE* **9**: e88462.
- CARSON, D., B. HUCKETT, F. BOTHA, & J. VAN STADEN, 2002 Differential gene expression in sugarcane leaf and internodal tissues of varying maturity. *South African Journal of Botany* **68**: 434–442.

- CASU, R. E., J. M. JARMEY, G. D. BONNETT, & J. M. MANNERS, 2007 Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. *Functional & Integrative Genomics* **7**: 153–167.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A., H. M. C. DE ABREU, P. ARRUDA, J. C. BESPALHOK FILHO, W. L. BURNQUIST, S. CRESTE, L. DI CIERO, J. A. FERRO, A. V. DE OLIVEIRA FIGUEIRA, T. DE SOUSA FILGUEIRAS, M. D. F. GROSSI-DE SÁ, E. C. GUZZO, H. P. HOFFMANN, M. G. DE ANDRADE LANDELL, N. MACEDO, S. MATSUOKA, F. DE CASTRO REINACH, E. ROMANO, W. J. DA SILVA, M. DE CASTRO SILVA FILHO, & E. CÉSAR ULIAN, 2011 Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology* **4**: 62–89.
- CHEN, Y., A. T. L. LUN, & G. K. SMYTH, 2014 Differential Expression Analysis of Complex RNA-seq Experiments Using edgeR. Em *Statistical Analysis of Next Generation Sequencing Data*, pp. 51–74, Springer International Publishing, Cham.
- CHEN, Y., D. J. MCCARTHY, M. RITCHIE, M. D. ROBINSON, & G. K. SMYTH, 2016 edgeR: diferencial expression analysis of digital gene expression data.
- COLLINGE, D., K. KRAGH, J. MIKKELSEN, K. NIELSEN, U. RASMUSSEN, & K. VAD, 1993 Plant chitinases. *The Plant Journal* **3**: 31–40.
- CONAB, 2016a Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar – Quarto Levantamento da safra 2015/16. Companhia Nacional de Abastecimento **2**: 76.
- CONAB, 2016b Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar – Segundo Levantamento da safra 2016/17. Companhia Nacional de Abastecimento **3**: 72.
- CONESA, A., S. GÖTZ, J. M. GARCÍA-GÓMEZ, J. TEROL, M. TALÓN, & M. ROBLES, 2005 Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**: 3674–3676.
- DANGL, J. L. & J. D. G. JONES, 2001 Defence Responses To Infection. *Nature* **411**: 826–833.
- DANIELS, J. & B. T. ROACH, 1987 Chapter 2 - Taxonomy and Evolution. Em *Sugarcane Improvement through Breeding*, editado por D. J. Heinz, volume 11 de *Developments in Crop Science*, pp. 7–84, Elsevier.
- DANTAS, G. A., L. F. L. LEGEY, & A. MAZZONE, 2013 Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **21**: 356–364.
- DE KLERK, E., J. T. DEN DUNNEN, & P. A. C. ‘T HOEN, 2014 RNA sequencing: from tag-based profiling to resolving complete transcript structure. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**: 3537–3551.
- DE SETTA, N., C. MONTEIRO-VITORELLO, C. METCALFE, G. M. CRUZ, L. DEL BEM, R. VICENTINI, F. T. NOGUEIRA, R. CAMPOS, S. NUNES, P. C. TURRINI, A. VIEIRA, E. OCHOA CRUZ, T. C. CORRÊA, C. HOTTA, A. DE MELLO VARANI, S. VAUTRIN, A. DA TRINDADE, M. DE MENDONÇA VILELA, C. LEMBKE, P. SATO, R. DE ANDRADE, M. NISHIYAMA, C. CARDOSO-SILVA, K. SCORTECCI, A. A. GARCIA, M. CARNEIRO, C. KIM, A. H. PATERSON, H. BERGÈS, A. D’HONT, A. DE SOUZA, G. SOUZA, M. VINCENTZ, J. KITAJIMA, & M.-A. VAN SLUYS, 2014 Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. *BMC Genomics* **15**: 540.

- DEYOUNG, B. J. & R. W. INNES, 2006 Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology* **7**: 1243–1249.
- DUPLESSIS, S., C. A. CUOMO, Y.-C. LIN, A. AERTS, E. TISSERANT, C. VENEVAULT-FOURREY, D. L. JOLY, S. HACQUARD, J. AMSELEM, B. L. CANTAREL, R. CHIU, P. M. COUTINHO, N. FEAU, M. FIELD, P. FREY, E. GELHAYE, J. GOLDBERG, M. G. GRABHERR, C. D. KODIRA, A. KOHLER, U. KUES, E. A. LINDQUIST, S. M. LUCAS, R. MAGO, E. MAUCELI, E. MORIN, C. MURAT, J. L. PANGILINAN, R. PARK, M. PEARSON, H. QUESNEVILLE, N. ROUHIER, S. SAKTHIKUMAR, A. A. SALAMOV, J. SCHMUTZ, B. SELLES, H. SHAPIRO, P. TANGUAY, G. A. TUSKAN, B. HENRISSAT, Y. VAN DE PEER, P. ROUZE, J. G. ELLIS, P. N. DODDS, J. E. SCHEIN, S. ZHONG, R. C. HAMELIN, I. V. GRIGORIEV, L. J. SZABO, & F. MARTIN, 2011 Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 9166–9171.
- FANG, J., A. LIN, W. QIU, H. CAI, M. UMAR, R. CHEN, & R. MING, 2016 Transcriptome Profiling Revealed Stress-Induced and Disease Resistance Genes Up-Regulated in PRSV Resistant Transgenic Papaya. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–20.
- FERNANDEZ, D., E. TISSERANT, P. TALHINHAS, H. AZINHEIRA, A. VIEIRA, A. S. PETITOT, A. LOUREIRO, J. POULAIN, C. DA SILVA, M. DO CÉU SILVA, & S. DUPLESSIS, 2012 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. *Molecular Plant Pathology* **13**: 17–37.
- FUNES, C., S. G. PÉREZ GÓMEZ, D. D. HENRIQUEZ, V. DI PAULI, R. P. BERTANI, D. P. FONTANA, A. M. RAGO, C. M. JOYA, R. A. SOPENA, V. GONZÁLEZ, H. BABI, L. E. ERAZZU, M. I. CUENYA, & L. D. PLOPER, 2016 First Report of Orange Rust of Sugarcane Caused by *Puccinia kuehnii* in Argentina. *Plant Disease* **100**: 861.
- GADJEV, I., I. GADJEV, S. VANDERAUWERA, S. VANDERAUWERA, T. S. GECHEV, T. S. GECHEV, C. LALOI, C. LALOI, I. N. MINKOV, I. N. MINKOV, R. MITTLER, R. MITTLER, F. V. BREUSEGEM, F. V. BREUSEGEM, V. SHULAEV, V. SHULAEV, K. APEL, K. APEL, D. INZE, D. INZE, G. B. SCIENCES, G. B. SCIENCES, P. GENETICS, & P. GENETICS, 2006 Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in *Arabidopsis*. *Society* **141**: 436–445.
- GALLO, J. R., 1962 Amostragem foliar em cana-de-açúcar para fins de análise foliar. *Bragantia* **21**: 899–921.
- GARCÉS, F. F., F. F. FIALLOS, E. SILVA, F. MARTINEZ, M. C. AIME, J. C. COMSTOCK, N. C. GLYNN, & L. A. CASTLEBURY, 2014 First Report of Orange Rust of Sugarcane Caused by *Puccinia kuehnii* in Ecuador. *Plant Disease* **98**: 842–842.
- GENDRON, J. M. & Z.-Y. WANG, 2007 Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 436–441.
- GOMEZ, S. G. P., 2013 *Quantificação de parâmetros monocíclicos da ferrugem alaranjada (Puccinia kuehnii) em cana-de-açúcar*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- GRATIVOL, C., M. REGULSKI, M. BERTALAN, W. R. MCCOMBIE, F. R. DA SILVA, A. ZERLOTINI NETO, R. VICENTINI, L. FARINELLI, A. S. HEMERLY, R. A. MARTIENSSSEN, & P. C. G. FERREIRA, 2014 Sugarcane genome sequencing by methylation filtration provides tools for genomic research in the genus *Saccharum*. *The Plant Journal* **79**: 162–172.

- GREENBERG, J. T. & N. YAO, 2004 The role of regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**: 201–211.
- GRISHAM, M. P., J. W. HOY, J. S. HAUDENSHIELD, & G. L. HARTMAN, 2013 First Report of Orange Rust Caused by *Puccinia kuehnii* in Sugarcane in Louisiana. *Plant Disease* **97**: 426–426.
- GRIVET, L. & P. ARRUDA, 2002 Sugarcane genomics: Depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 122–127.
- HANSEN, K. D., S. E. BRENNER, & S. DUOIT, 2010 Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Research* **38**: e131–e131.
- HUOT, B., J. YAO, B. L. MONTGOMERY, & S. Y. HE, 2014 Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* **7**: 1267–1287.
- INZÉ, D. & M. V. MONTAGU, 1995 Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 153–158.
- JACKSON, P. A., 2005 Breeding for improved sugar content in sugarcane. *Field Crops Research* **92**: 277–290.
- JOHNSON, D. C., D. R. DEAN, A. D. SMITH, & M. K. JOHNSON, 2005 Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters. *Annu. Rev. Biochem* **74**: 247–281.
- JOHNSON, R., 1992 Past, present and future opportunities in breeding for disease resistance, with examples from wheat. *Euphytica* **63**: 3–22.
- JONES, D. A. & D. TAKEMOTO, 2004 Plant innate immunity - Direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* **16**: 48–62.
- JONES, J. D. G., 1996 Plant disease resistance genes: Structure, function and evolution.
- JONES, J. D. G. & J. L. DANGL, 2006 The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- KANGASJÄRVI, S., J. NEUKERMANS, S. LI, E. M. ARO, & G. NOCTOR, 2012 Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1619–1636.
- KEEN, N. T., 1990 Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual review of genetics* **24**: 447–463.
- KIM, C., X. WANG, T.-H. LEE, K. JAKOB, G.-J. LEE, & A. H. PATERSON, 2014 Comparative Analysis of *Miscanthus* and *Saccharum* Reveals a Shared Whole-Genome Duplication but Different Evolutionary Fates. *The Plant Cell* **26**: 2420–2429.
- KIM, D., B. LANGMEAD, & S. L. SALZBERG, 2015 HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods* **12**: 357–360.
- KIM, D., G. PERTEA, C. TRAPNELL, H. PIMENTEL, R. KELLEY, & S. L. SALZBERG, 2013 TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* **14**: R36.
- KNOGGE, W., 1996 Fungal Infection of Plants. *The Plant cell* **8**: 1711–1722.
- KOPYLOVA, E., L. NOÉ, & H. TOUZET, 2012 SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* **28**: 3211–3217.

- LANGMEAD, B. & S. L. SALZBERG, 2012 Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**: 357–359.
- LAWTON, M. A. & C. J. LAMB, 1987 Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Molecular and cellular biology* **7**: 335–341.
- LEHMANN, S., M. SERRANO, F. L'HARIDON, S. E. TJAMOS, & J.-P. METRAUX, 2015 Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* **112**: 54–62.
- LI, J., G. BRADER, & E. T. PALVA, 2004 The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense. *The Plant Cell* **16**: 319–331.
- LIU, L., Y. LI, S. LI, N. HU, Y. HE, R. PONG, D. LIN, L. LU, & M. LAW, 2012 Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**: 1–11.
- LIU, Y., J. ZHOU, & K. P. WHITE, 2014 RNA-seq differential expression studies: More sequence or more replication? *Bioinformatics* **30**: 301–304.
- LOARCE, Y., E. NAVAS, C. PANIAGUA, A. FOMINAYA, J. L. MANJÓN, & E. FERRER, 2016 Identification of Genes in a Partially Resistant Genotype of *Avena sativa* Expressed in Response to *Puccinia coronata* Infection. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–15.
- LOVE, M. I., W. HUBER, & S. ANDERS, 2014 Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **15**: 550.
- LUN, A. T. L., Y. CHEN, & G. K. SMYTH, 2016 It's DE-licious: A Recipe for Differential Expression Analyses of RNA-seq Experiments Using Quasi-Likelihood Methods in edgeR. *Em Methods in Molecular Biology*, volume 1418, pp. 391–416.
- MACRELLI, S., J. MOGENSEN, & G. ZACCHI, 2012 Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. *Biotechnology for Biofuels* **5**: 22.
- MAGAREY, R., T. WILLCOX, B. CROFT, & A. CORDINGLEY, 2001 Orange Rust, A Major Pathogen Affecting Crops of Q124 in Queensland in 2000. *Proc. Aust. Soc. Sugarcane Technol* **23**: 274–280.
- MARGUERAT, S. & J. BÄHLER, 2010 RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 569–579.
- MARTIN, M., 2011 Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB-net.journal* **17**: pp. 10–12.
- MCCARTHY, D. J., Y. CHEN, & G. K. SMYTH, 2012 Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research* **40**: 4288–4297.
- MING, R., S. C. LIU, Y. R. LIN, J. DA SILVA, W. WILSON, D. BRAGA, A. VAN DEYNZE, T. F. WENSLAFF, K. K. WU, P. H. MOORE, W. BURNQUIST, M. E. SORRELLS, J. E. IRVINE, & A. H. PATERSON, 1998 Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics* **150**: 1663–1682.
- MITTLER, R., S. VANDERAUWERA, N. SUZUKI, G. MILLER, V. B. TOGNETTI, K. VANDEPOELE, M. GOLLERY, V. SHULAEV, & F. VAN BREUSEGEM, 2011 ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science* **16**: 300–309.

- MLÍČKOVÁ, K., L. LUHOVÁ, A. LEBEDA, B. MIESLEROVÁ, & P. PEČ, 2004 Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 753–761.
- MOORE, P. H., A. H. PATERSON, & T. TEW, 2013 Sugarcane: The Crop, the Plant, and Domestication. Em *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*, pp. 1–17, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- MOREIRA, A. S., 2013 *Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil: estudo de populações do patógeno e comportamento varietal*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- NICHOLSON, R. L. & R. HAMMERSCHMIDT, 1992 Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 369–389.
- NISHIYAMA, M. Y., S. S. FERREIRA, P. Z. TANG, S. BECKER, A. PÖRTNER-TALIANA, & G. M. SOUZA, 2014 Full-length enriched cDNA libraries and ORFeome analysis of sugarcane hybrid and ancestor genotypes. *PLoS ONE* **9**: 1–14.
- NOGUEIRA, F. T. S., V. E. DE ROSA, M. MENOSSI, E. C. ULIAN, & P. ARRUDA, 2003 RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant physiology* **132**: 1811–1824.
- OKURA, V. K., R. S. C. DE SOUZA, S. F. DE SIQUEIRA TADA, & P. ARRUDA, 2016 BAC-Pool Sequencing and Assembly of 19 Mb of the Complex Sugarcane Genome. *Frontiers in Plant Science* **7**: 342.
- OLIVEIRA-GARCIA, E. & B. VALENT, 2015 How eukaryotic filamentous pathogens evade plant recognition. *Current Opinion in Microbiology* **26**: 92–101.
- OZSOLAK, F. & P. M. MILOS, 2011 RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics* **12**: 87–98.
- PANDEY, S. & I. E. SOMSSICH, 2009 The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiology* **150**: 1648–1655.
- PIPERIDIS, G., N. PIPERIDIS, & A. D'HONT, 2010 Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Molecular Genetics and Genomics* **284**: 65–73.
- RAY, P. D., B. W. HUANG, & Y. TSUJI, 2012 Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* **24**: 981–990.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A., M. GRANT, & J. D. JONES, 2011 Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 317–343.
- ROBINSON, M. D., D. J. MCCARTHY, & G. K. SMYTH, 2009 edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140.
- ROBINSON, M. D. & G. K. SMYTH, 2008 Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* **9**: 321–332.
- ROCHA, F. R., F. S. PAPINI-TERZI, M. Y. NISHIYAMA, R. Z. VÊNCIO, R. VICENTINI, R. D. DUARTE, V. E. DE ROSA, F. VINAGRE, C. BARSALOBRES, A. H. MEDEIROS, F. A. RODRIGUES, E. C. ULIAN, S. M. ZINGARETTI, J. A. GALBIATTI, R. S. ALMEIDA, A. V. FIGUEIRA, A. S. HEMERLY, M. C. SILVA-FILHO, M. MENOSSI, & G. M. SOUZA, 2007 Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* **8**: 71.

- RUSHTON, P. J., I. E. SOMSSICH, P. RINGLER, & Q. J. SHEN, 2010 WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**: 247–258.
- SÃO PAULO, 2008 Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo - LUPA 2007/2008. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Instituto de Economia Agrícola. São Paulo: SAA/CATI/IEA. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>>. Acesso em: 15/06/2005 .
- SCHAKER, P. D. C., A. C. PALHARES, L. M. TANIGUTI, L. P. PETERS, S. CRESTE, K. S. AITKEN, M.-A. VAN SLUYS, J. P. KITAJIMA, M. L. C. VIEIRA, & C. B. MONTEIRO-VITORELLO, 2016 RNAseq Transcriptional Profiling following Whip Development in Sugarcane Smut Disease. *Plos One* **11**: e0162237.
- SCHMELZER, E., S. KRUGER-LEBUS, & K. HAHNBROCK, 1989 Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. *The Plant cell* **1**: 993–1001.
- SCHMITT, F. J., G. RENGER, T. FRIEDRICH, V. D. KRESLAVSKI, S. K. ZHARMUKHAMEDOV, D. A. LOS, V. V. KUZNETSOV, & S. I. ALLAKHVERDIEV, 2014 Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1837**: 835–848.
- SCHOLES, J. D. & S. A. ROLFE, 1996 Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* **199**: 573–582.
- SCORTECCI, K. C., S. CRESTE, T. C. JR., M. A. XAVIER, M. G. A. LANDELL, A. FIGUEIRA, & V. A. BENEDITO, 2012 Challenges, Opportunities and Recent Advances in Sugarcane Breeding. *Plant Breeding* p. 352.
- SONESON, C. & M. DELORENZI, 2013 A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* **14**: 91.
- SOOD, S. G., J. C. COMSTOCK, & N. C. GLYNN, 2009 Leaf Whorl Inoculation Method for Screening Sugarcane Rust Resistance. *Plant Disease* **93**: 1335–1340.
- STAPLES, R. C., 2000 Research on the Rust Fungi During the Twentieth Century. *Annual Review of Phytopathology* **38**: 49–69.
- STONE, J. M. & J. C. WALKER, 1995 Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction. *Plant Physiology* **108**: 451–457.
- SWINDELL, W. R., M. HUEBNER, & A. P. WEBER, 2007 Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**: 125.
- TAKKEN, F. L., M. ALBRECHT, & W. I. TAMELING, 2006 Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 383–390.
- TRAPNELL, C., L. PACTER, & S. L. SALZBERG, 2009 TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**: 1105–1111.
- VANCE, C. P., T. K. KIRK, & R. T. SHERWOOD, 1980 Lignification as a Mechanism of Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **18**: 259–288.

- VETTORE, A. L., F. R. DA SILVA, E. L. KEMPER, G. M. SOUZA, A. M. DA SILVA, M. I. T. FERRO, F. HENRIQUE-SILVA, É. A. GIGLIOTI, M. V. F. LEMOS, L. L. COUTINHO, M. P. NOBREGA, H. CARRER, S. C. FRANÇA, M. BACCI, M. H. S. GOLDMAN, S. L. GOMES, L. R. NUNES, L. E. A. CAMARGO, W. J. SIQUEIRA, M. A. VAN SLUYS, O. H. THIEMANN, E. E. KURAMAE, R. V. SANTELLI, C. L. MARINO, M. L. P. N. TARGON, J. A. FERRO, H. C. S. SILVEIRA, D. C. MARINI, E. G. M. LEMOS, C. B. MONTEIRO-VITORELLO, J. H. M. TAMBOR, D. M. CARRARO, P. G. ROBERTO, V. G. MARTINS, G. H. GOLDMAN, R. C. DE OLIVEIRA, D. TRUFFI, C. A. COLOMBO, M. ROSSI, P. G. DE ARAUJO, S. A. SCULACCIO, A. ANGELLA, M. M. A. LIMA, V. E. DE ROSA, F. SIVIERO, V. E. COSCRATO, M. A. MACHADO, L. GRIVET, S. M. Z. DI MAURO, F. G. NOBREGA, C. F. M. MENCK, M. D. V. BRAGA, G. P. TELLES, F. A. A. CARA, G. PEDROSA, J. MEIDANIS, & P. ARRUDA, 2003 Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research* **13**: 2725–2735.
- VIANA, K. R. O. & R. PEREZ, 2013 Survey of sugarcane industry in Minas Gerais, Brazil: Focus on sustainability. *Biomass and Bioenergy* **58**: 149–157.
- VICENTINI, R., A. BOTTCHEER, M. DOS SANTOS BRITO, A. B. DOS SANTOS, S. CRESTE, M. G. DE ANDRADE LANDELL, I. CESARINO, & P. MAZZAFERA, 2015 Large-scale transcriptome analysis of two sugarcane genotypes contrasting for lignin content. *PLoS ONE* **10**: e0134909.
- VIRTUDAZO, E. V., H. NOJIMA, & M. KAKISHIMA, 2001 Taxonomy of Puccinia species causing rust diseases on sugarcane. *Mycoscience* **42**: 167–175.
- VOGEL, C. & E. M. MARCOTTE, 2012 Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* **13**: 227–232.
- WANG, J., B. ROE, S. MACMIL, Q. YU, J. E. MURRAY, H. TANG, C. CHEN, F. NAJAR, G. WILEY, J. BOWERS, M.-A. VAN SLUYS, D. S. ROKHSAR, M. E. HUDSON, S. P. MOOSE, A. H. PATERSON, & R. MING, 2010 Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. *BMC genomics* **11**: 261.
- WANG, Z., M. GERSTEIN, & M. SNYDER, 2009 RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* **10**: 57–63.
- WHALEN, M. C., 2005 Host defence in a developmental context. *Molecular Plant Pathology* **6**: 347–360.
- YANG, C. & H. WEI, 2015 Designing microarray and RNA-Seq experiments for greater systems biology discovery in modern plant genomics. *Molecular Plant* **8**: 196–206.
- YOUNG, M. D., M. J. WAKEFIELD, G. K. SMYTH, & A. OSHLACK, 2010 Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome biology* **11**: R14.
- ZHAO, D., N. C. GLYNN, B. GLAZ, J. C. COMSTOCK, & S. SOOD, 2011 Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. *Plant Disease* **95**: 640–647.