Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Análise de metabólitos e proteínas totais em folhas de *Eucalyptus grandis* durante a infecção por *Puccinia psidii*

Felipe Garbelini Marques

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

Piracicaba
2016

Felipe Garbelini Marques
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Análise de metabólitos e proteínas totais em folhas de *Eucalyptus grandis* durante a infecção por *Puccinia psidii*.

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

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

Piracicaba
2016

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

Marques, Felipe Garbelini
Análise de metabólitos e proteínas totais em folhas de *Eucalyptus grandis* durante a infecção por *Puccinia psidii*. / Felipe Garbelini Marques. - - Piracicaba, 2016.
120 p. : il.

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

1. *Eucalyptus grandis* 2. *Puccinia psidii* 3. Ferrugem do eucalipto 4. Interação planta-patógeno 5. Proteômica 6. Metabolômica 7. Espectrometria de massas I. Título

CDD 634.9734
M357a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha família

Aos meus pais Valmir e Léia pelo total apoio, e por, apesar de não compreenderem completamente meu trabalho, nunca duvidarem da minha capacidade e jamais questionarem minhas escolhas.
Às minhas irmãs Gabriela e Heloísa pelo amor e carinho que ofereceram durante toda minha vida.
À minha avó Lourdes, que não poderá me chamar de Doutor.
À Fúvia, pelo amor, companhia e paciência durante mais do que estes últimos sete anos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate por ter confiado em mim desde a iniciação científica, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e por toda orientação dada durante esse período.

À Dra. Mônica Tereza Veneziano Labate pelos ensinamentos e paciência que teve comigo quando eu ainda era estagiário, e por ser responsável pela organização do laboratório que tanto desorganizamos.

À CAPES/CNPq/FAPESP pelo auxílio financeiro.

Ao Thiago Falda Leite e David Henry Moon por deixarem o legado científico que tive o prazer de continuar.

Ao Luis Felipe Boaretto, José Matheus Camargo Bonatto, Fernanda Salvato por serem meus primeiros mentores no Laboratório e para quem eu tive tanto prazer de trabalhar.

Ao Ivan Miletovic Mozol pelo auxílio no projeto quase conjunto e pela amizade que temos há tanto tempo.

À Thaís Regiani Cataldi pela ajuda nas análises de espectrometria de massas e pelos conhecimentos compartilhados em química.

À Ilara Gabriela Frasson Budzinski por compartilhar sua experiência em proteômica e metabolômica, discussão de artigos e identificação de moléculas.

Ao Fabrício Edgar de Moraes por ajudar tanto a facilitar minha vida com conhecimentos "informáticos" e casuais.

À "amiguinha" Andressa Peres Bini por ajudar a cuidar das centenas de bonsais de eucalipto e do querido fungo *Puccinia psidii*.

À agora Prof. Dra. Maria Carolina Quecine por ajudar com seus conhecimentos em microbiologia.

À Lívia Maria Franceschini por cuidar dos meus dados como se fossem dela.

À Mariana de Souza e Silva pela amizade e papos furados.

À Flavia de Moraes Franco, Juliana Guimarães Fonseca e Ana Paula Chiaverini Pinto pelas boas risadas a qualquer hora do dia e companhia no "bonde do Rucas".

À Ana Cláudia Pereira Cuenca pela ajuda na busca pelas "molequinhas"

Ao Fernando Cotinguiba, Hana Karina Pereira da Silva, Mariângela Rodrigues dos Santos, Simone Guidetti Gonzalez, Janaína de Santana Borges e Maria Letícia Bonatelli com quem pude conviver ao longo dos anos e com quem dividi meu mau humor.

Sarina Tsui, Jaqueline Almeida, Nathalia Brancalleão por ajudar a cuidar, molhar, podar e clonar nossas plantas.

À Suzano Papel e Celulose, Esteban Roberto Gonzáles e Shinitiro Oda por cederem tanto os materiais vegetais quanto o patógeno.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Franco Garcia, Luis Felipe Ventorim Ferrão, Letícia Aparecida de Castro Lara e Marianella Quezada Macchiavello pelo auxílio na análise estatística dos dados de proteômica.

Aos Funcionários do viveiro de mudas do Departamento de Ciências Florestais: Donizeti Aparecido Sabino, Natanael da Silva Duarte, José Amarildo da Fonseca pelo auxílio durante a clonagem das plantas.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 Florestas plantadas e o gênero *Eucalyptus* 15
2.2 *Puccinia psidii* Winter – a ferrugem do eucalipto 16
2.2.1 Sintomatologia 17
2.2.2 Ciclo de vida e tipos de esporos 17
2.3 Interação planta-patógeno 20
2.3.1 Reconhecimento da presença do patógeno 21
2.3.2 Amplificação do sinal de resistência após a percepção do microrganismo invasor 24
2.3.3 Papel da parede celular na imunidade contra patógenos 25
2.4 Metabólitos Secundários na Resposta de Defesa das Plantas 27
2.4.1 Terpenóides 29
2.4.2 Compostos Fenólicos 30
2.4.3 Alcalóides 31
3 MATERIAL E MÉTODOS 33
3.1 Origem e obtenção do isolado monopustular de *Puccinia psidii* 33
3.2 Seleção de genótipos de *Eucalyptus grandis* resistentes e susceptíveis à *P.psidii* 33
3.3 Clonagem e multiplicação do material vegetal selecionado 34
3.4 Delineamento Experimental 35
3.5 PCR para detecção de presença ou ausência de *P. psidii* 36
3.5.1 Extração de DNA 36
3.5.2 Detecção do patógeno por meio de PCR convencional 37
3.6 Proteômica 37
3.6.1 Extração proteica 37
3.6.2 Dessalinização das amostras 38
3.6.3 Quantificação de Proteínas 39
3.6.4 Verificação de qualidade do extrato proteico 39
3.6.5 Digestão das amostras complexas 39
3.6.6 Purificação das amostras 40
3.6.7 LC-MS^E 40

3.6.8 Análise dos dados 41
3.7 Metabolômica 42
3.7.1 Extração de Metabólitos 42
3.7.2 Separação e Análise de Metabólitos - Modo Negativo 43
3.7.3 Pré-processamento dos Dados 44
3.7.4 Normalização e Análise Estatística dos Dados 44
3.7.5 Fragmentação e Identificação de Metabólitos 45
4 RESULTADOS 47
4.1 Avaliação dos sintomas 47
4.2 Ausência do fungo nas plantas falso inoculadas 49
4.3 Resultados Proteômica 51
4.3.1 Rendimento e qualidade das extrações de proteína 51
4.3.2 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas 53
4.3.3 Distribuição de proteínas nos diferentes tempos pós-inoculação 53
4.3.4 Proteínas Exclusivas 54
4.3.5 Cálculo de expressão diferencial das proteínas comuns e separação por GO termos e palavras chave 59
4.4 Metabolômica - Modo Negativo 60
4.4.1 Procura por fitoanticipinas 61
4.4.2 Procura por moléculas produzidas após a inoculação com o patógeno (fitoalexinas) 64
5 DISCUSSÃO 69
5.1 Proteômica 69
5.1.1 Proteínas encontradas em apenas uma condição 69
5.1.2 Análise de proteínas comuns 75
5.2 Metabólitos secundários 80
6 CONCLUSÕES 85
REFERÊNCIAS 87
ANEXOS 97

RESUMO

Análise de metabólitos e proteínas totais em folhas de *Eucalyptus grandis* durante a infecção por *Puccinia psidii*

Os mecanismos moleculares envolvidos na resistência de plantas contra patógenos são um tema bastante discutido no meio acadêmico, sendo o objetivo maior dos estudos a diminuição das perdas de produtividade provocadas por doenças em plantações do mundo todo. Muitos modelos de interação patógeno-hospedeiro foram propostos e desenvolvidos priorizando plantas e culturas de rápido desenvolvimento com ciclo de vida curto. Espécies de ciclo longo, porém, devem lidar durante anos - ao menos até a idade reprodutiva - contra o ataque de bactérias, fungos e vírus, sem contar, nesse meio tempo, com recombinações genéticas e mutações que tornariam possível o escape contra as moléstias causadas por microrganismos. Assim, como alternativa aos modelos usuais, o presente trabalho estudou um diferente par de antagonistas: *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii*. Apesar da contribuição de programas de melhoramento genético, o patossistema *E. grandis* X *P. psidii* ainda é pouco descrito no nível molecular, havendo poucos estudos sobre os processos e as moléculas que agem de forma a conferir resistência às plantas. Assim, buscando o melhor entendimento da relação entre *E. grandis* X *P. psidii*, o presente trabalho estudou a mudança dos perfis de proteínas e metabólitos secundários ocorrida nos tecidos foliares de plantas resistentes e susceptíveis durante a infecção pelo patógeno, com o auxílio da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os resultados obtidos indicam que as plantas resistentes percebem a presença do patógeno logo nas primeiras horas pós-infecção, produzindo proteínas ligadas à imunidade (*HSP90*, *ILITYHIA*, *LRR Kinase*, *NB-ARC disease resistance protein*). Essa percepção desencadeia a produção de proteínas de parede celular e de resposta oxidativa, além de modificar o metabolismo primário e secundário. As plantas susceptíveis, por outro lado, têm o metabolismo subvertido, produzindo proteínas responsáveis pelo afrouxamento da parede celular, beneficiando a absorção de nutrientes, crescimento e propagação de *P. psidii*. No trabalho também são propostos metabólitos biomarcadores de resistência, moléculas biomarcadoras de resposta imune e sinais da infecção por patógeno em *E. grandis*.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; *Puccinia psidii*; Ferrugem do eucalipto; Interação planta-patógeno; Proteômica; Metabolômica; Espectrometria de massas

ABSTRACT

Analysis of total metabolites and proteins in *Eucalyptus grandis* leaves during the infection by *Puccinia psidii*

The molecular mechanisms involved in the plant resistance against pathogens is a well-discussed theme in the academy, overall objecting to diminish worldwide plantation yield losses caused by diseases. Many pathogen-host models were proposed and developed prioritizing model plants and fast growing crops with short life cycles. However, long life cycle species need to cope with the attack of bacteria, fungi and virus throughout many years, or at least until its reproduction period, being unable, meanwhile, to escape the attack of these microorganisms through genetic recombination and mutation. Therefore, as an alternative to the usual models, the present work studied a different pair of antagonists: *Eucalyptus grandis* and *Puccinia psidii*. Despite the contribution of plant breeding programs, the *E. grandis* X *P. psidii* pathosystem is still poorly described in the molecular level, with few studies about processes and molecules that confer resistance to the plants. Thus, in order to better understand the *E. grandis* X *P. psidii* relationship, this project aimed to study the proteome and metabolome changes that occur on leaf tissues of resistant and susceptible plants infected by the pathogen, with the aid of the liquid chromatography coupled to mass spectrometry technique. The results show that the resistant plants notice the presence of the pathogen shortly after being infected, producing immunity related proteins such as *HSP90*, *ILITYHIA*, *LRR Kinase*, *NB-ARC disease resistance protein.* This perception triggers the production of cell wall and oxidative burst proteins, also changing the primary and secondary metabolism. On the other hand, susceptible plants have its metabolism subverted, producing proteins responsible for the cell wall loosening, favoring *P. psidii* nutrient uptake, growth and spread. Metabolite biomarkers, Immune response biomarker molecules and infection signals triggered by *P. psidii* on *E. grandis* are also proposed on this work.

Keywords: *Eucalyptus grandis*; *Puccinia psidii*; Eucalyptus rust; Plant-pathogen interaction; Proteomics; Metabolomics; Mass spectrometry

1 INTRODUÇÃO

O principal protagonista do setor florestal é o gênero *Eucalyptus*, Myrtaceae exótica proveniente da Austrália que se adaptou com grande sucesso em terras brasileiras e é utilizado para produção de papel e celulose, carvão vegetal, movelaria, construção civil, óleos, entre outros. Porém, uma das consequências do manejo de plantas exóticas é sua exposição à patógenos nativos, e isso ocorre com o gênero *Eucalyptus* no Brasil. Grandes áreas plantadas com clones podem sofrer com a infecção por *Puccinia psidii*, fungo biotrófico originário da América Central e do Sul que ataca preferencialmente plantas da família Myrtaceae, causando uma doença conhecida como ferrugem do eucalipto (COUTINHO et al., 1998).

As bases genéticas da resistência de *Eucalyptus grandis* à *Puccinia psidii* podem ser encontradas na literatura. Junghans et al. (2003) afirmam que a resistência é conferida por um gene de efeito principal denominado *Ppr1* (*P. psidii resistance gene* 1), dominante, de penetrância incompleta e expressão variável, além da participação de outros genes com menor contribuição na resistência. Teixeira et al. (2009) relatam que a resistência pode ser explicada por um loco com efeito principal e pelo menos três alelos diferentes, que interagem entre si, resultando no fenótipo de resistência ou suscetibilidade. Esses trabalhos, porém, não descrevem quais as estratégias utilizadas pela planta para subverter o processo infeccioso do patógeno ou as modificações moleculares ocorridas nas plantas durante esse processo.

Deste modo, a fim de estudar a fisiologia molecular da interação *E. grandis* X *P. psidii*, o presente projeto caracterizou, por meio de modernas técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, a constituição proteica e metabólica em folhas infectadas de clones de *E. grandis*, resistentes e susceptíveis, durante o processo de infecção de *P. psidii*. O estudo descreve quais as mudanças ocorridas no tecido foliar levando a um maior conhecimento do mecanismo molecular da interação planta/patógeno. Também são apontadas proteínas responsáveis pela resistência e metabólitos que inibem o crescimento do patógeno, informações que podem ser utilizadas na busca de genes de interesse, monitoramento em programas de melhoramento ou transformação genética, obtendo-se linhagens com resistência mais duradoura ao patógeno, especialmente para espécies arbóreas ou de ciclo longo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Florestas plantadas e o gênero *Eucalyptus*

O setor florestal mundial movimenta cerca de 0,6 trilhão de dólares ao ano, o equivalente a 1% do PIB mundial (FAO, 2014). Do total das florestas globais, 7% da área corresponde a árvores plantadas, ou 264 milhões de hectares (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ, 2014), e estima-se que somente o gênero *Eucalyptus* tenha passado os 20 milhões de hectares plantados em áreas tropicais e temperadas (HENRY; KOLE, 2014), portanto sendo responsável por quase 10% da área de florestas plantadas no mundo.

No Brasil a área de plantio de árvores é de 7,6 milhões de hectares, gerando cerca de 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos no setor florestal (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013), além de ter sido responsável por 1,2% do PIB em 2013 (R$ 56 bilhões de um total de R$ 4,8 trilhões) (IBÁ, 2014). O principal protagonista do setor florestal brasileiro é o gênero *Eucalyptus*, Myrtaceae exótica que se adaptou com grande sucesso em terras brasileiras e é utilizado para produção de papel e celulose, movelaria, construção civil, óleos, carvão vegetal, entre outros, ocupando 72% da área de florestas plantadas (IBÁ, 2014).

Com a Austrália como centro de origem, de onde são provenientes mais de 700 espécies (HUDSON et al., 2015), a distribuição natural do gênero *Eucalyptus* se estende até as ilhas da Indonésia e Nova Guiné. O gênero foi introduzido no Brasil por volta do ano de 1868 no Rio Grande do Sul e no Rio de Janeiro e começou a ser cultivado de forma comercial por Navarro de Andrade por volta de 1909, especialmente em Rio Claro-SP, com a finalidade de produção de madeira para servir como combustível para locomotivas, mourão de cercas e postes, dormentes e madeiramento para construção de estações e vilas (MORA; GARCIA, 2000). Em 1957 a Cia. Suzano começou a produzir papel com celulose proveniente 100% de eucalipto, ampliando seu espectro de utilização, e atualmente a espécie *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e seus híbridos são as preferencialmente usadas pela indústria papeleira por seu rápido crescimento e alta produtividade volumétrica (MOON et al., 2007).

O genoma do *E. grandis* foi sequenciado, mais exatamente uma árvore de 17 anos proveniente de uma geração de auto-fecundação chamada de BRASUZ1 (MYBURG et al., 2014), resultando em um genoma de 640Mb e 36.376 genes codantes de proteínas preditos. Esse fato exemplifica a importância dessa árvore no contexto mundial, já que esse sequenciamento foi resultado de um consórcio envolvendo 35 instituições e 80 pesquisadores de diversos países como Brasil, África do Sul, Estados Unidos, Alemanha, Bélgica, França, Canadá, Austrália e Portugal.

A produtividade das plantações comerciais de eucalipto no Brasil varia entre 45-65 m^3 por hectare (MORA; GARCIA, 2000), mas esse número é influenciado por vários fatores abióticos e bióticos, destacando-se dentro desse segundo fator a ferrugem do eucalipto, provocada pelo fungo *P. psidii* Winter, uma das doenças mais importantes dessa cultura e única ferrugem capaz de infectar *Eucalyptus* spp (COUTINHO et al., 1998).

2.2 *Puccinia psidii* Winter – a ferrugem do eucalipto

P. psidii Winter é um basidiomiceto pertencente à ordem Pucciniales (Figura 1). A primeira descrição desse patógeno foi feita por Winter em 1884 infectando *Psidium guajava* e foi reportado como um patógeno do eucalipto apenas em 1944 (JOFFILY, 1944). Em 1973 se deu a primeira grande infestação por esse fungo em plantações de eucalipto, ocorrida no Espírito Santo, provocando sérias perdas em viveiros e plantas jovens (menos de 18 meses) de *E. grandis* (FERREIRA, 1983). Essa doença ainda foi descrita infectando outros 32 gêneros e 129 espécies de Myrtaceae em países da América do Sul, Central e do Norte, Japão, China, África do Sul e Austrália, centro de origem do gênero *Eucalyptus* (MORIN et al., 2012; PEGG et al., 2013).

P. psidii é uma ferrugem atípica visto que atinge uma grande gama de gêneros e espécies dentro da família Myrtaceae e sua patogenicidade ao gênero *Eucalyptus* é uma consequência ao se expor o hospedeiro ao patógeno em um ambiente não nativo ao primeiro (COUTINHO et al., 1998). Levantamentos feitos em plantios seminais de *E. grandis* no Vale do Paraíba e Sul do estado de São Paulo indicaram uma incidência de *P. psidii* em 35% de árvores com doze meses de idade e uma redução de 25 a 35% na altura e diâmetro de plantas altamente infectadas quando comparadas a plantas sadias (SILVEIRA; HIGASHI, 2003). Esses números apontam para o grande potencial epidêmico dessa doença e o risco que ela acarreta à produtividade de florestas plantadas de eucalipto.

Figura 1 – Ferrugem do eucalipto. **A** – *Eucalyptus grandis* altamente infectado por *Puccinia psidii*. **B** – Urediniósporos na superfície abaxial da folha de *E. grandis.* Figuras retiradas de Pegg et al. (2013)

2.2.1 Sintomatologia

A ferrugem do eucalipto afeta principalmente pequenas mudas, plantas jovens de até dois anos, jardins clonais e novos brotos provenientes de rebrota (XAVIER et al., 2001). Pequenas manchas amarelo-claras em botões foliares indicam os primeiros sintomas da doença e aparecem de dois a quatro dias após a infecção com urediniósporos. De 3 a 9 dias essas manchas se tornam pústulas cheias de urediniósporos que crescem em diâmetro com o tempo, tendo agora uma cor amarelo bastante intensa (XAVIER et al., 2001; LEITE, 2012).

Em poucos dias após a liberação dos esporos a infecção inicial se espalha para tecidos mais jovens da planta, como novas folhas em formação, pecíolos e na ponta dos ramos. As folhas mais velhas demonstram esporulação menos intensa (FERREIRA, 1983), e sendo assim as plantas hospedeiras raramente são mortas pela ferrugem.

2.2.2 Ciclo de vida e tipos de esporos

P. psidii é uma espécie obrigatoriamente biotrófica, obtendo nutrientes de células vivas, e autoécia (GLEN et al., 2007), portanto completa os estágios de sua vida em um único hospedeiro, diferente da maioria dos outros fungos da ordem Pucciniales, que são heteroécios e precisam de dois hospedeiros para completar o ciclo de vida (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Também é considerado que o ciclo de vida de *P. psidii* é incompleto (Figura 2), passando pelas fases aecial (fase 1), uredinial (fase 2), telial (fase 3) e basidial (fase 4), mas sem a fase espermogonial (fase 0), ainda não descrita na literatura, apesar dos

esforços na procura dessa fase na natureza e em laboratório (MORIN; TALBOT; GLEN, 2014).

Em condições ótimas *P. psidii* produz grande quantidade de urediniósporos em detrimento as demais formas (GLEN et al., 2007), e em condições controladas a germinação e infecção por urediniósporos acontecem em maiores taxas em folhas úmidas, no escuro e com temperaturas entre 15 e 25º C (RUIZ et al., 1989).

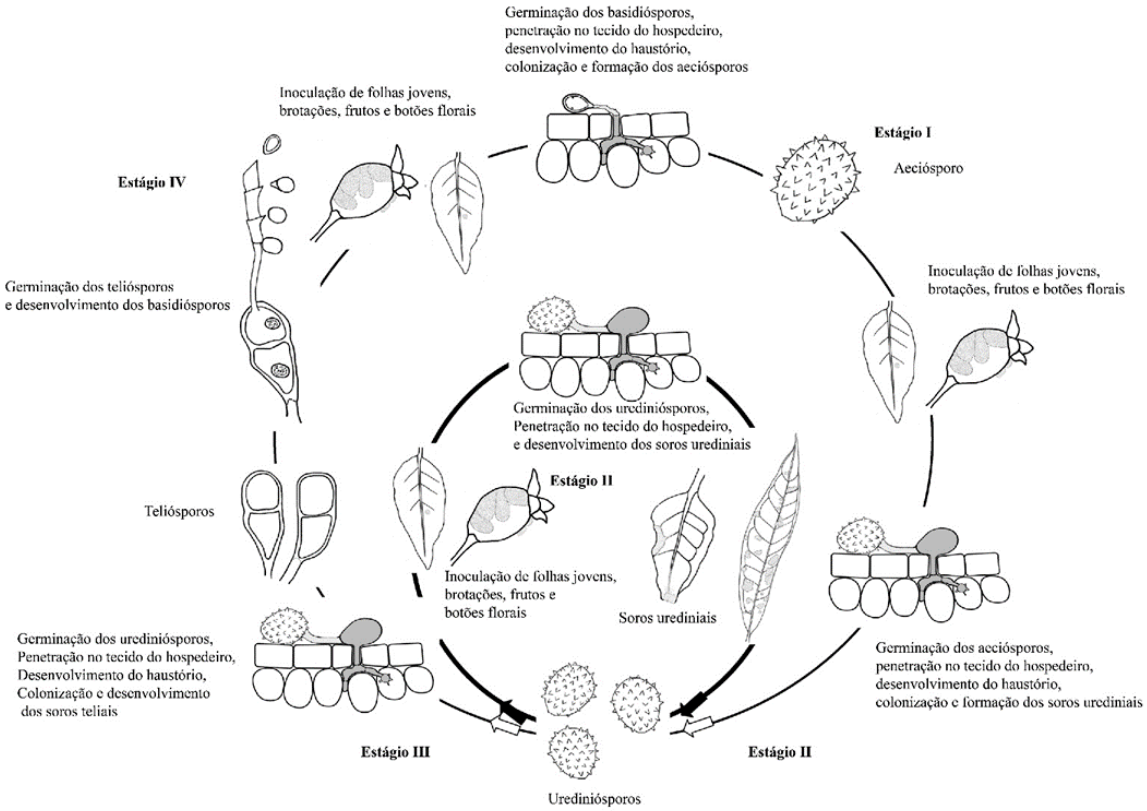


Figura 2 – Ciclo de vida de *Puccinia psidii*. Diferente da maioria das ferrugens, *P. psidii* passa por todos os estágios de desenvolvimento, com exceção da fase espermagonial (fase 0). Figura adaptada de Glen et al. (2007)

Xavier et al. (2001) e Leite (2012) descreveram as primeiras horas da interação entre *P. psidii* e genótipos resistentes e susceptíveis de *E. grandis*, descrevendo os detalhes de pré e pós-penetração do patógeno no hospedeiro em intervalos regulares após a inoculação (Figura 3). Em ambos estudos, realizados por técnicas de microscopia, a germinação, formação do apressório e penetração no hospedeiro ocorreu de forma semelhante tanto no genótipo resistente como no susceptível. Três horas após a inoculação foi observada a germinação dos uredósporos e logo às 6hpi foi possível observar a formação do apressório, estrutura do patógeno que o permite se ancorar ao hospedeiro e aplicar pressão mecânica para penetrar no tecido vegetal (LEITE, 2012). O processo de penetração tem início no período de 12hpi, com

a visualização da hifa de penetração surgindo do apressório e entremeando o tecido do hospedeiro. Xavier et al. (2001) observaram a formação do haustório (estrutura do fungo especializada na absorção de nutrientes de células hospedeiras vivas) tanto nas plantas susceptíveis quanto resistentes, 18 e 24 horas após a inoculação, respectivamente. Leite (2012), porém, somente observou a formação dessa estrutura no genótipo susceptível, 24 horas após a inoculação, supondo resposta de resistência nas plantas resistentes a partir de 18 horas após a inoculação, já que desse horário em diante não houve avanço do desenvolvimento do fungo dentro da planta.

Em ambos estudos não se observou avanço da colonização de *P. psidii* nas folhas de *E. grandis* resistentes, podendo-se observar sinais de reação de hipersensibilidade (morte celular) 48 horas após a inoculação. Pústulas começaram a emergir nas folhas das plantas susceptíveis no oitavo e nono dias após a inoculação. Variações na cronologia dos eventos devem ser resultado da utilização de diferentes genótipos tanto do hospedeiro quanto do patógeno, apesar de pertencerem às mesmas espécies (QUECINE et al., 2014, 2016).

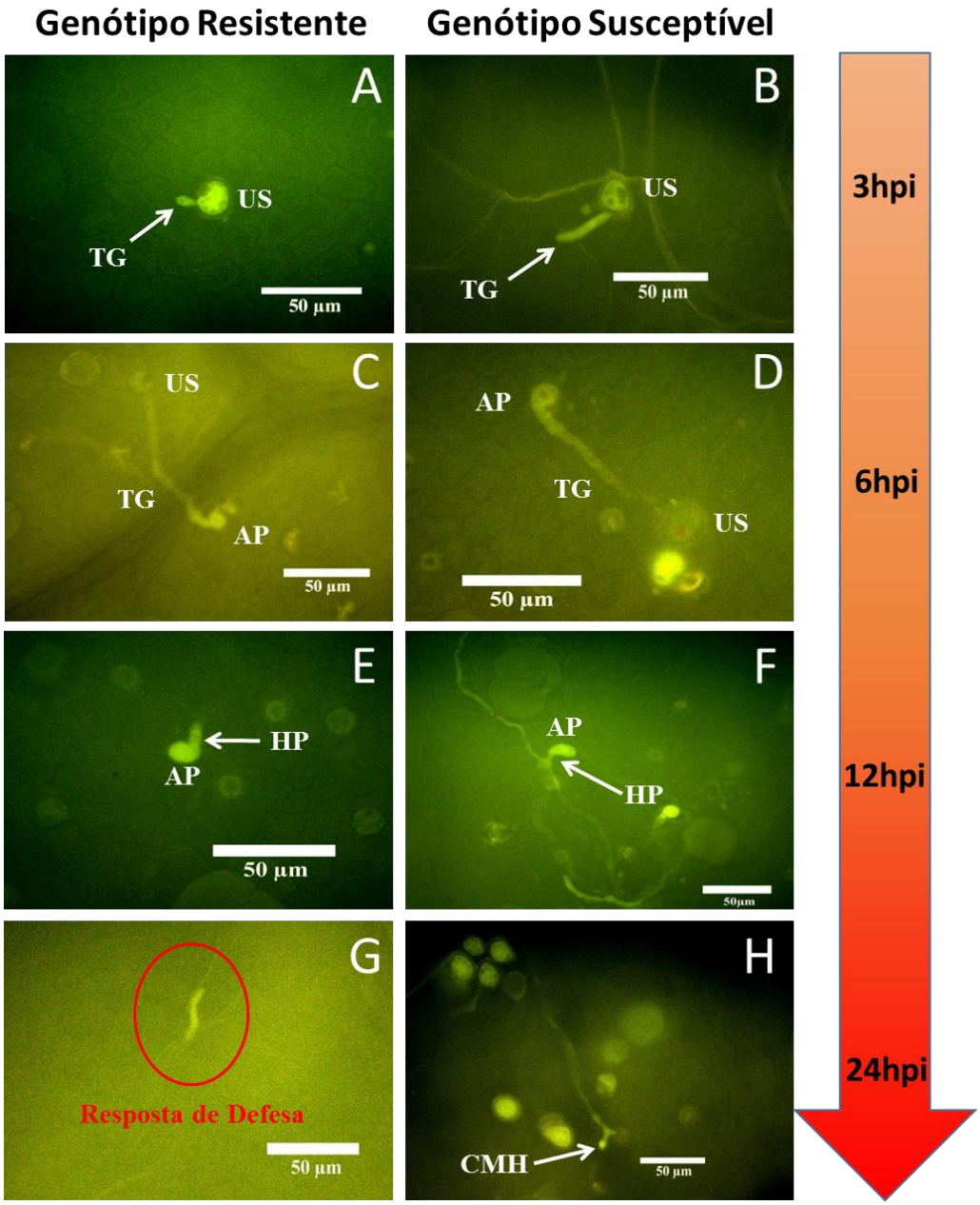


Figura 3 – Microscopia de fluorescência das primeiras horas da infecção de *E. grandis* por *P. psidii*. **A** e **B** – Germinação dos urediniósporos (US) nos genótipos Resistente e Susceptível, respectivamente, no período 3hpi; (TG) indica o tubo de germinação. **C** e **D** – Formação do apressório (AP) nos genótipos Resistente e Susceptível, respectivamente, no período 6hpi. **E** e **F** – formação da hifa de penetração (HP) nos genótipos Resistente e Susceptível, respectivamente, no período 12hpi. **G** - Resposta de resistência nas plantas resistentes, com a presença de fragmentos de hifas no período de 24hpi. **H** – Aparecimento da célula mãe do haustório (CMH) nas plantas Susceptíveis no período de 24hpi, indicando o sucesso do patógeno. Adaptado de Leite (2012)

2.3 Interação planta-patógeno

Patógenos de plantas possuem diferentes estratégias para infecção e disseminação quando em contato com o hospedeiro. Bactérias se proliferam em espaços intercelulares depois de entrar por estômatos ou lesões. Nematóides e afídeos se alimentam de vegetais

inserindo o estilete diretamente nas células do hospedeiro e fungos podem penetrar as células epidérmicas ou estender a hifa sobre ou entre as células vegetais (JONES; DANGL, 2006).

Diferente de mamíferos, as plantas não possuem células móveis de defesa e também não contam com um sistema de defesa adaptativo para se protegerem contra patógenos. Em vez disso os vegetais contam com um sistema imune inato presente em cada célula e em sinais emanados nos locais infectados (JONES; DANGL, 2006), também sendo capazes de estabelecer respostas altamente específicas e gerando uma memória duradoura contra os patógenos encontrados (SPOEL; DONG, 2012).

Nos anos de 1940, Flor formulou o conceito de interação gene-a-gene que, resumidamente, considera que as plantas possuem genes de resistência dominantes únicos (R) responsáveis pelo reconhecimento de patógenos que contém genes de avirulência (*avr*) complementares (STASKAWICZ, 2001; CHISHOLM et al., 2006). Os genes *avr* são definidos como genes do patógeno que codificam proteínas que são direta ou indiretamente reconhecidas por apenas aquelas plantas que contém o gene R complementar. O reconhecimento específico resulta na indução da resposta de defesa da planta e inibição do crescimento do patógeno. Se a planta não possuir o gene R complementar específico, o patógeno é capaz de causar a doença, mesmo possuindo o gene de avirulência (STASKAWICZ, 2001).

Porém, em vista da miríade de microrganismos a que as plantas estão expostas, patógenos ou não patógenos, e ao imenso número de genes R únicos que seriam necessários para o reconhecimento de cada possível organismo virulento, seria esperado que as plantas possuíssem um sistema mais eficiente e elegante para resolver esse problema. Esta é a teoria proposta atualmente para explicar o reconhecimento de organismos pelos vegetais, no que se entente pelo novo “Dogma Central” da fitopatologia e o modelo de invasão (JONES; DANGL, 2006; BENT; MACKEY, 2007; COOK; MESARICH; THOMMA, 2015), descrito mais adiante.

2.3.1 Reconhecimento da presença do patógeno

Um sistema de defesa pré-formado é a primeira barreira que o patógeno deve enfrentar antes de invadir uma planta. Se um microrganismo não consegue passar por essa barreira é provável que essa planta não seja seu hospedeiro, lembrando que as relações de virulência de um patógeno a uma planta são bastante específicas, e a relação de compatibilidade entre patógeno e hospedeiro é uma exceção, e não uma regra. Nesse rol de estratégias estão

barreiras físicas como as ceras encontradas nas folhas, a parede celular e o citoesqueleto e seus microfilamentos de actina (MYSORE; RYU, 2004; SPOEL; DONG, 2012). As plantas também produzem constitutivamente vários metabólitos secundários que podem agir como compostos anti-microbianos na defesa contra microorganismo, dentre eles alguns tipos de saponinas e fitoanticipinas (MYSORE; RYU, 2004; NÜRNBERGER; LIPKA, 2005).

O segundo obstáculo que um patógeno invasor deve ultrapassar são mecanismos de defesa induzidos, conferidos por um sistema complexo e ainda não completamente compreendido devido à sua complexidade e à grande variação entre grupos vegetais. O modelo mais amplamente difundido desse sistema de defesa é representado por um modelo *zig-zag*, dividido em quatro partes (JONES; DANGL, 2006; BENT; MACKEY, 2007) (Figura 4).

A primeira parte do modelo se dá pela detecção de elicitores, tais como componentes genéricos conservados (*Microbe-Associated Molecular Patterns* – MAMPs) presentes na maioria dos microorganismos ou compostos derivados do próprio hospedeiro (*Microbe-Induced Molecular Patterns* – MIMPs – ou *Damage-Associated Molecular Patterns* - DAMPs), oriundos de herbivoria ou injúria. Essas moléculas, que podem ser lipopolissacarídeos, peptideoglicanas, flagelina, entre outros, são reconhecidos por receptores reconhecedores de padrões (*pattern recognition receptors* - PRRs), compostos por proteínas transmembrana com domínio extracelular LRR (*leucine-rich-repeat*) e domínio serina/treonina quinase intracelular (BENT; MACKEY, 2007). Esse reconhecimento resulta em imunidade ativada por MAMPs (*MAMP-triggered imune responses* - MTI), que pode impedir que a colonização do patógeno siga adiante através de respostas como ativação de cascatas de *Mitogen-activated protein kinases* (*MAPK*), transcrição de genes relacionados à resistência, produção de espécies reativas de oxigênio (*ROS*), deposição de calose e fechamento de estômatos (HOU et al., 2013).

Na segunda parte do modelo, patógenos adaptados à infecção de plantas liberam fatores de virulência (efetores) que suprimem a resposta geral da planta. Esses efetores são empregados na interceptação de componentes sinalizadores do hospedeiro, prejudicando a resposta imune basal (SCHWESSINGER; RONALD, 2012).

Na fase três os efetores liberados pelo patógeno são reconhecidos pelo hospedeiro através de proteínas *NBS-LRR* (domínio *LRR* somado a um sítio de ligação de nucleotídeo *NBS*), produtos de genes R, dando origem à imunidade ativada por efetores (*efector-triggered imune responses* - ETI) que resulta em resistência à doença ou provoca resposta hipersensível (HR). Essa resposta é tipicamente associada à morte celular das células infectadas, isolando a

área atacada pelo patógeno, e à liberação de moléculas antimicrobianas, como as enzimas hidrolíticas quitinase e β-1,3-glucanase (SPOEL; DONG, 2012). Outras proteínas do hospedeiro também participam da ativação dos genes R, sendo uma das mais estudadas as *heat shock proteins 90* (*HSP90*), chaperonas que interagem com as proteínas *NBS-LRR* conferindo estabilidade a elas, estando envolvidas em todas as rotas de resistência à doença mediada por proteína R já examinadas (HOU et al., 2013).

Se na primeira fase a planta deve reconhecer um número limitado de MAMPS relativamente conservados entre microorganismos, o mesmo não acontece para a imunidade ativada por efetores. Para a planta alcançar o ETI ela deve detectar efetores altamente polimórficos de diferentes linhagens de patógenos, sendo improvável que a tese proposta por Flor - um gene R (proteína de resistência) para um gene de avirulência avr (efetor) - seja a única regendo dentro da célula vegetal. O que se propõe atualmente é que essas proteínas R na verdade não somente monitoram a presença de efetores diretamente, mas monitoram suas próprias proteínas, que podem ser alvos daqueles. Assim a detecção pela proteína R de alguma anomalia causada pelo efetor na composição celular da planta também desencadearia a resposta de defesa (COOK; MESARICH; THOMMA, 2015).

Na fase quatro a seleção natural leva o patógeno a contornar a ETI, escapando da detecção do sistema imune ou suprimindo as defesas geradas pelo hospedeiro (JONES; DANGL, 2006; BENT; MACKEY, 2007; COOK; MESARICH; THOMMA, 2015).

O modelo *zig-zag* prediz uma coevolução contínua em que as plantas restauram o ETI pela evolução de novos genes R e os patógenos causam a doença quando evitam o reconhecimento (COOK; MESARICH; THOMMA, 2015).

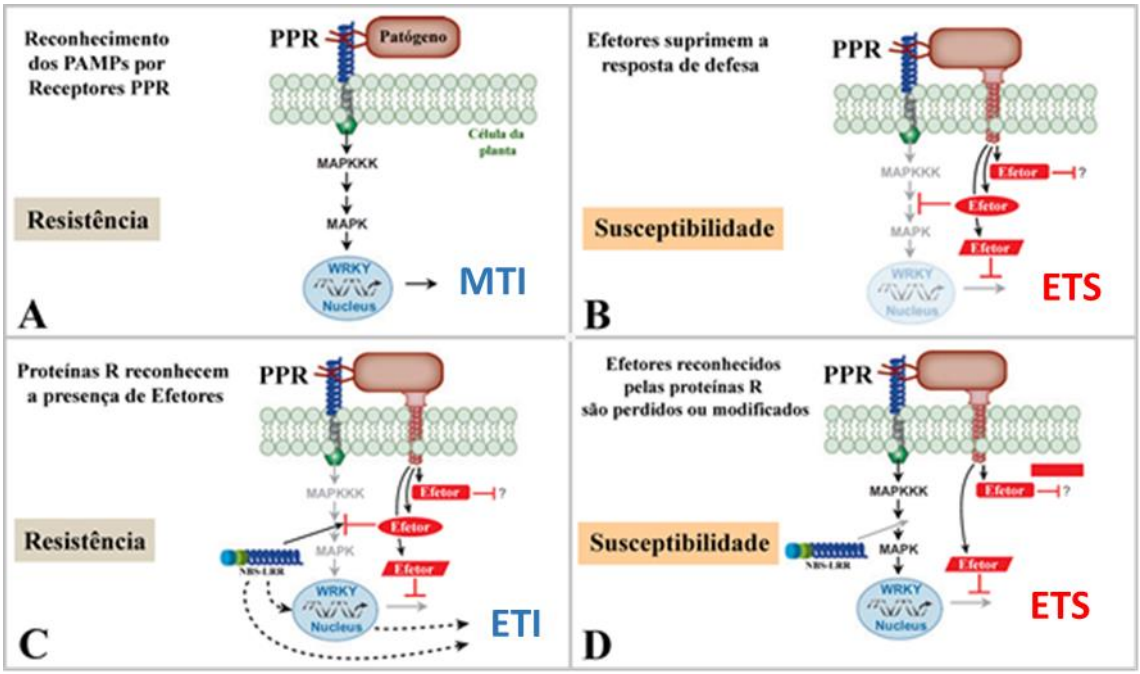


Figura 4 - Modelo evolutivo clássico de resistência a patógenos em plantas. **A** - Detecção de MAMPs por receptores extracelulares no tecido do hospedeiro, ativando a MTI. **B** - Liberação de efetores pelo patógeno, suprimindo a resposta imune basal da planta. **C** - Reconhecimento dos efetores pela planta, que ativa a ETI e restaura a resistência. **D** - O patógeno mais uma vez contorna a resposta imune da planta modificando ou eliminando o efetor que ativou a resposta da planta, ou suprimindo as defesas da planta. Adaptado de Bent e Mackey (2007)

2.3.2 Amplificação do sinal de resistência após a percepção do microrganismo invasor

Após o reconhecimento do microrganismo através de elicitores (MAMPs, DAMPs/MIMPs), vários sinais iniciais são ativados nas células adjacentes ao sítio de infecção, dando origem à MTI (imunidade ativada por MAMPs). Essa resposta é relativamente fraca e não específica, apesar de complexa, envolvendo eventos como influxo de Ca^{2+}, ativação de cascatas de MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinases*), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a indução da síntese de etileno (MENG; ZHANG, 2013). Essas ações iniciais são integradas em complexas e interconectadas rotas sinalizadoras que incluem a ativação de genes de resistência (R), ativação ou repressão de fatores de transcrição (tais como WRKYs e ERFs), fortalecimento da parede celular, síntese de fitoalexinas, resposta de hipersensibilidade e eventualmente resistência em caso de sucesso em deter a invasão do patógeno (HARBORNE, 1999; DUPLESSIS et al., 2009; MENG; ZHANG, 2013). A série de eventos que leva à resposta de resistência da planta ainda envolve a síntese e o fino balanço de fitormônios como o ácido salicílico, jasmonatos e etileno, que irão levar a informação de que a planta foi infectada por um patógeno, para outras regiões da planta ainda não infectadas, preparando-a contra a presença do patógeno.

Microrganismos patogênico são capazes de suprimir a MTI, empregando o uso de proteínas efetoras nas células da planta hospedeira. Os alvos desses efetores são diversos, incluindo resistência à penetração, reconhecimento por PRRs, nível de fitormônios, rotas sinalizadoras, rotas secretórias do hospedeiro, morte celular e supressão de modificações na parede celular (NAIDOO et al., 2014). A segunda camada de defesa das plantas, o ETI, é dado pelo reconhecimento direto ou indireto desses efetores (percepção de interferência nas células vegetais) pelas proteínas R. Esse reconhecimento leva a uma resposta de defesa mais específica, rápida e geralmente efetiva. Essa resposta envolve a explosão oxidativa e a resposta hipersensível (geralmente morte celular), associados à uma extensa mudança na expressão gênica (DODDS; RATHJEN, 2010). A produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) no local de infecção é uma das respostas mais imediatas que seguem o reconhecimento do patógenos (LAMB; DIXON, 1997). Os ROS agem como sinais para a ativação de resposta de defesa e são capazes de se difundir através de membranas, alcançando locais distais ao sítio de produção. A geração de ROS promove o acúmulo de ácido salicílico (SA) e de transcritos de genes relacionados à patogenicidade (PR), sendo também diretamente danosos ao organismo invasor, ou contribuindo para a morte celular, já que a explosão oxidativa tem papel importante no desenvolvimento da resposta hipersensível (NAIDOO et al., 2014).

2.3.3 Papel da parede celular na imunidade contra patógenos

A parede celular é uma estrutura dinâmica que frequentemente determina o resultado da interação entre plantas e patógenos. É uma barreira que patógenos devem transpor para colonizar o tecido do hospedeiro. Enquanto fungos necrotróficos objetivam destruir essa barreira através da ação combinada de enzimas, fungos biotróficos empregam uma degradação mais controlada e localizada a fim de manter as células hospedeiras vivas e absorver seus nutrientes (BELLINCAMPI; CERVONE; LIONETTI, 2014). As plantas, por outro lado, são capazes de perceber perturbações na parede celular, monitorando a integridade de sua estrutura (Figura 5). Quando percebida uma violação a planta pode depositar mais parede celular, tentando conter o avanço do patógeno (CONSONNI; HUMPHRY; PANSTRUGA, 2009).

Fungos biotróficos adquirem nutrientes das células hospedeiras sem causar a morte delas. Esses patógenos superam a superfície externa da planta por pressão mecânica através do apressório, além de utilizar oxidades, esterases, cutinases, lipases e enzimas degradantes de parede celular (CWDEs), tornando essa estrutura da célula mais frouxa (BELLINCAMPI;

CERVONE; LIONETTI, 2014). Em resposta ao ataque, as células vegetais produzem uma estrutura conhecida como *papillae*, um espessamento da parede celular produzido no sítio sob ataque do patógeno. Essa estrutura contém calose, celulose, hemiceluloses, pectinas, lignina e proteínas estruturais (VOIGT, 2014). A *papillae* também é local onde peptídeos antimicrobianos, metabólitos secundários tóxicos e ROS se acumulam (BELLINCAMPI; CERVONE; LIONETTI, 2014). O espessamento da parede celular pode aprisionar a hifa de penetração do fungo, sendo mais resistente à pressão mecânica aplicada pelo apressório, e prevenir a formação do haustório.

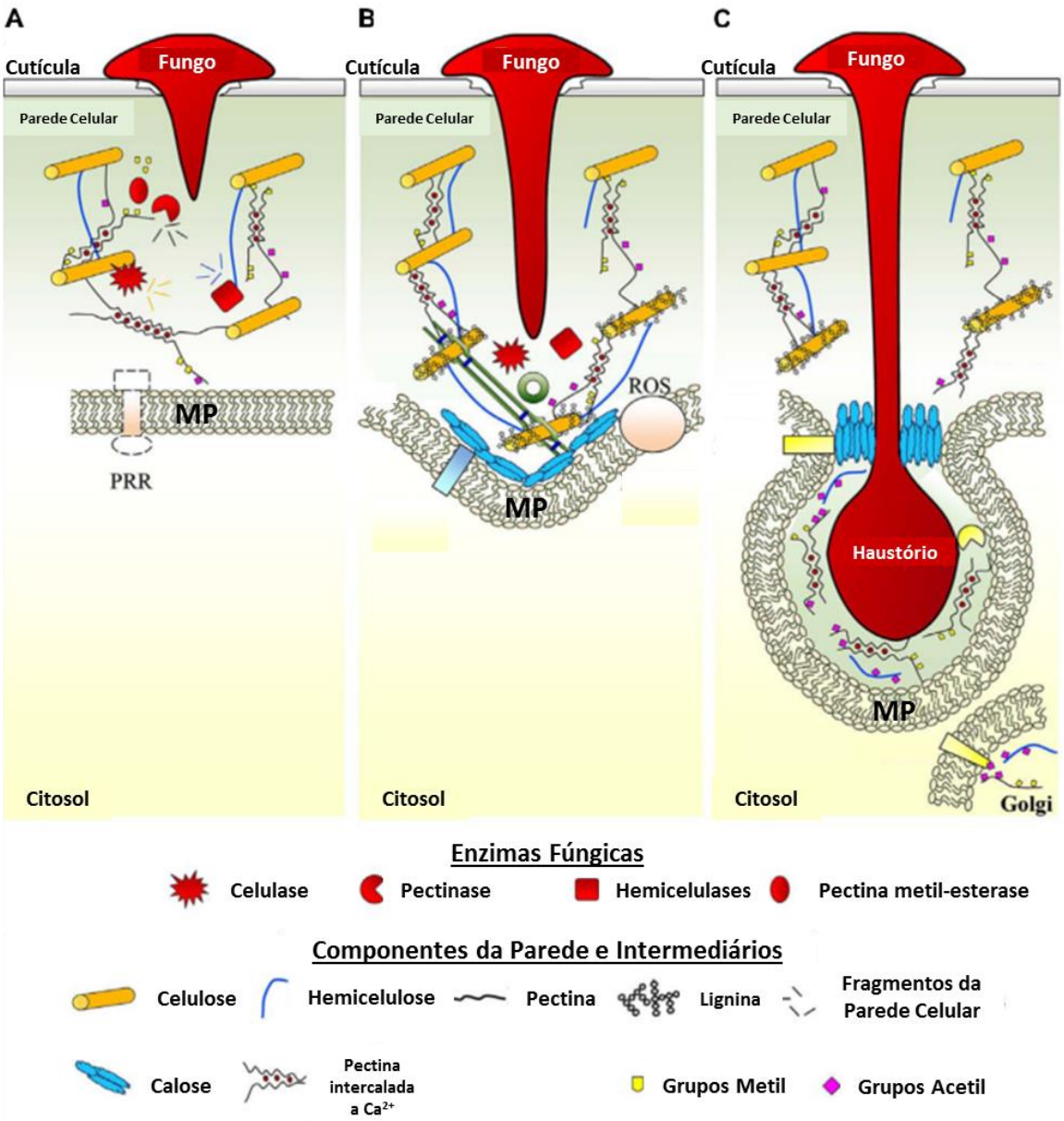


Figura 5 – Dinâmica da parede celular na interação planta/fungo biotrófico. **A** – Os fungos biotróficos secretam enzimas para penetrar a parede celular. **B** – A planta percebe a penetração do fungo por receptores PRR (receptores reconhecedores de padrões) na membrana plasmática (MP) e respondem com reforço da parede celular e acúmulo de espécies reativa de oxigênio (ROS). **C** – Se virulento, o fungo ultrapassa a barreira criada e cria uma interface com a membrana plasmática (MP) da célula vegetal, tendo acesso aos nutrientes da planta. Adaptado de Bellincampi, Cervone e Lionetti (2014)

2.4 Metabólitos Secundários na Resposta de Defesa das Plantas

Diferentemente dos metabólitos primários, os metabólitos secundários são considerados não essenciais para o metabolismo básico da planta, e sua ausência não é deletéria para o vegetal (DU FALL; SOLOMON, 2011), que consegue crescer e se reproduzir mesmo na ausência desses compostos. Apesar disso, eles constituem um grande grupo de moléculas estruturalmente diversificadas, que podem ser produzidas em resposta a diferentes

estímulos ambientais, conferindo atrativos para polinizadores e uma vantagem de sobrevivência contra estresses.

As plantas sintetizam uma grande gama de metabólitos secundários ativos na defesa contra patógenos. Mas apesar de altas concentrações de metabólitos secundários conferirem maior resistência à planta, sua produção constante é custosa, diminuindo sua aptidão reprodutiva e de crescimento (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). Assim os metabólitos secundários relacionados à defesa contra patógeno podem ser divididos em dois tipos. Se são produzidos e estocados constitutivamente pela planta eles são conhecidos como fitoanticipinas. Caso eles sejam sintetizados somente após o reconhecimento da presença do patógeno eles são chamados de fitoalexinas (PIASECKA; JEDRZEJCZAK-REY; BEDNAREK, 2015). Essas definições não levam em consideração sua estrutura química, podendo ser o metabólito uma fitoanticipina em determinada planta e fitoalexina em outra. O metabólito também pode ser tanto um quanto outro em diferentes partes de uma mesma planta.

Os metabólitos secundários podem ser divididos em 3 grupos baseados em suas origens biossintéticas: terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os blocos de construção mais importantes para a biossíntese de metabólitos secundários são derivados de acetil coenzima A, ácido chiquímico, ácido mavelônico e 1-desoxixilulose-5-fosfato (RIBERA; ZUÑIGA, 2012) (Figura 6).

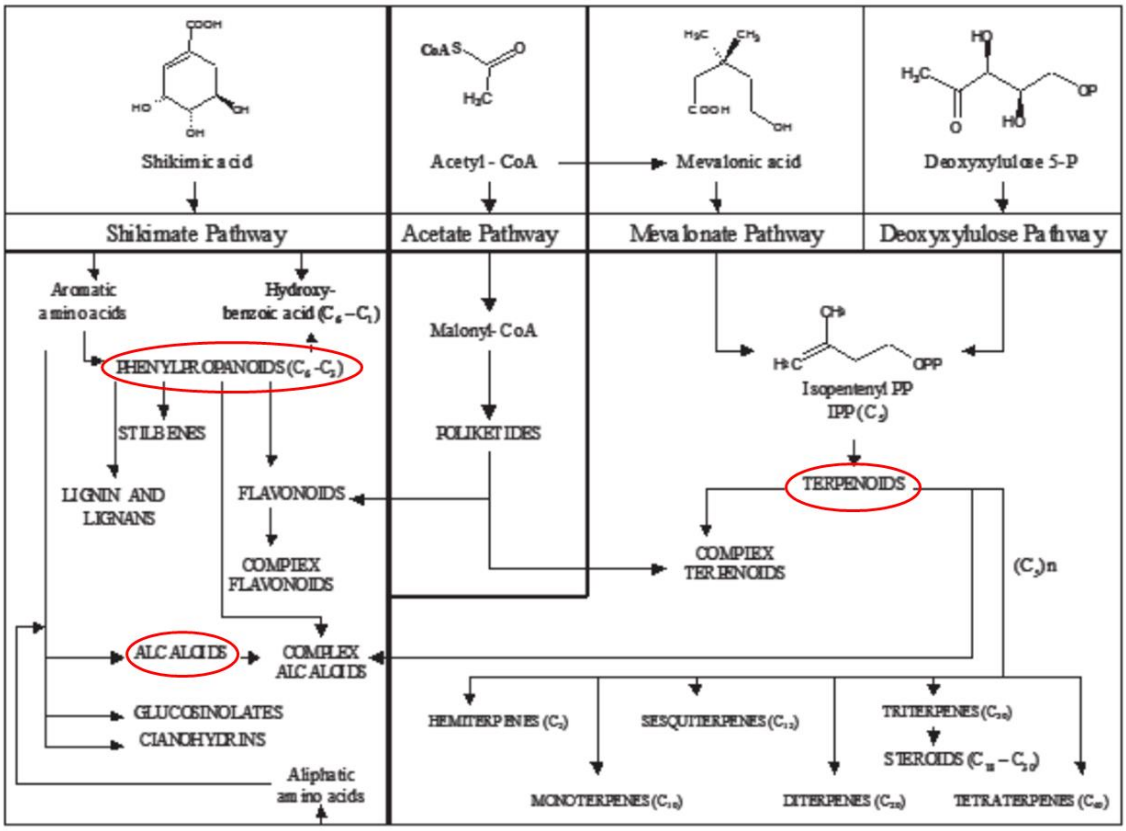


Figura 6 – Rotas biosintéticas de compostos secundários de plantas. Em destaque estão apontados alcalóides, terpenóides e fenilpropanóides, de onde derivam os compostos fenólicos. Retirado de Ribera e Zuñiga (2012)

2.4.1 Terpenóides

Os terpenóides são provavelmente a mais estruturalmente variada classe de produtos naturais de plantas (Figura 7). Eles são produzidos a partir de precursores de 5 carbonos isopentenil difosfato (IPP) ($C_5H_{12}O_7P_2$), derivados da rota do acetato/mavelonato, que se fundem formando polímeros de isopreno, múltiplos de 5 carbonos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os principais terpenóides são monoterpenos (com 10 átomos de C), sesquiterpenos (com 15 átomos de C), diterpenos (20 átomos de C), triterpenos (30 átomos de C), estéróides (27 átomos de C), tetraterpenos (40 átomos de C) e politerpenos. Apesar de terem uma estrutura básica simples, a maioria apresenta estruturas complexas devido à grande variedade de substituintes e formações de anéis secundários (WINK, 2004).

Mono e sesquiterpenos geralmente são voláteis e podem ser isolados como óleos essenciais como o eucaliptol. São normalmente lipofílicos e estocados em células especializadas de óleos, tricomas, etc, e são especialmente abundantes em Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, entre outros grupos de plantas. Funcionam como compostos de defesa química contra herbívoros e microrganismos, mas terpenos voláteis também tem função de atrair insetos polinizadores (WINK, 2004).

Dentre os diterpenos são encontradas estruturas cíclicas extremamente complexas, sendo o hormônio vegetal giberelina um exemplo dessa classe. Triterpenos e esteróides podem ocorrer como agliconas, mas mais frequentemente ocorrem como saponinas. Essas são solúveis em água e desestabilizam membranas, mostrando características de atividade antimicrobiana e antiherbivoria (WINK, 2004).

Carotenóides são os mais importantes membros dos tetraterpenos, sendo precursores da vitamina A. Já o látex usado na produção de borracha é um exemplo de politerpenos com 100 a 10000 unidades de isopreno (WINK, 2004).

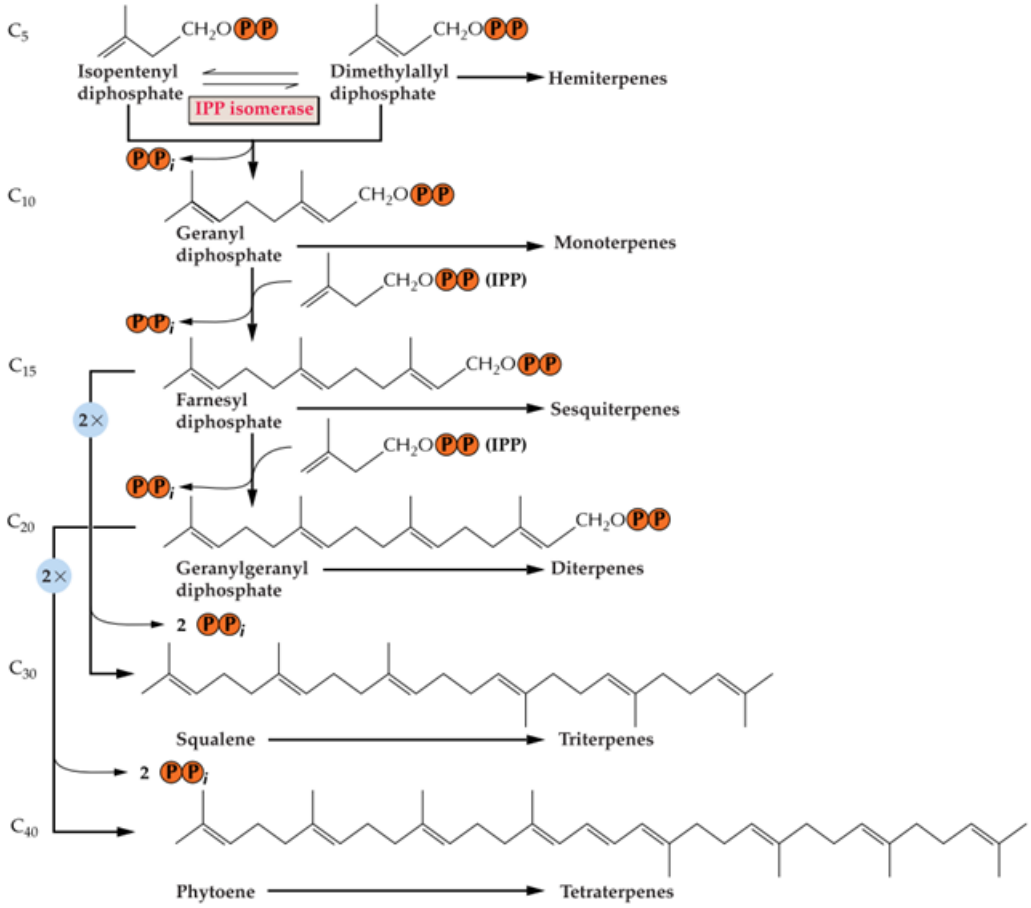


Figura 7 – Biossíntese de terpenóides. A maioria das subclasses de terpenóides são biosintetizadas a partir da unidade básica isopentenil difosfato (IPP). Monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos são produzidos através da adição de unidades de 5 carbonos. Retirado de Croteau, Kutchane e Lewis (2000)

2.4.2 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são majoritariamente derivados das vias metabólicas dos fenilpropanóides e acetato-fenilpropanóides, que por sua vez advém dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Eles são caracterizados como metabólitos aromáticos que possuem ou já possuíram um grupo hidroxila ligado ao anel aromático (fenol) (Figura 8). Talvez o

composto fenólico mais famoso e abundante seja a lignina, molécula importante na transição dos vegetais do ambiente aquático para o ambiente terrestre, conferindo resistência e sustentação às plantas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Compostos fenólicos podem ocorrer como compostos simples, que diferem em graus de hidroxilação e metoxilação. Eles também podem estar conjugados com outros fenilpropanóides ou com aminas (WINK, 2004). Alguns tipos de compostos fenólicos são cumarinas e furanocumarinas, flavonoides, chalconas, catequinas, antocianinas e isoflavonas.

Furanocumarinas podem intercalar a molécula de DNA, sendo mutagênicas e possivelmente carcinogênicas, sendo candidatas a compostos de defesa contra patógenos e herbívoros (WINK, 2004).

Flavonóides, chalconas e catequinas são caracterizados por terem dois anéis aromáticos que carregam fenólicos hidróxi, metoxi e grupamentos de açúcares. Seus grupos fenólicos hidróxi podem interagir com proteínas para formar ligações iônicas e pontes de hidrogênio, e, portanto, conseguem interferir em muitos alvos moleculares. Catequinas são uma classe especial de compostos fenólicos, que podem se polimerizar formando taninos. Essas moléculas possuem um grande número de grupos hidroxílicos que podem interagir com proteínas para formar pontes de hidrogênio, ligações iônicas e até covalentes, servindo de compostos de defesa contra herbívoros e patógenos.

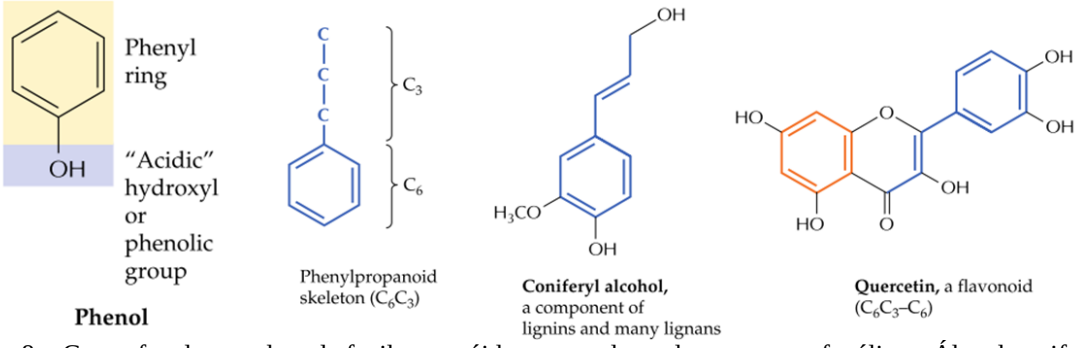


Figura 8 – Grupo fenol, esqueleto de fenilpropanóide e exemplares de compostos fenólicos. Álcool coniferílico é um componente de ligninas e lignanas e a quercetina é um flavonóide encontrado em plantas. Ambos possuem o esqueleto de fenilpropanóide, representado pela cor azul. Adaptado de Croteau, Kutchan e Lewis (2000)

2.4.3 Alcalóides

Essas moléculas, que contém um ou mais átomos de nitrogênio, majoritariamente em anel heterocíclico, são sintetizadas nas plantas a partir de aminoácidos como o triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina e arginina. Uma ou duas transformações podem converter essas

moléculas de metabólitos primários a substratos para um grande número de metabólitos secundários.

Esse grupo inclui compostos muito famosos como a cafeína, codeína, morfina, e estima-se que eles sejam produzidos por cerca de 20% das plantas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Existem ainda entre compostos secundários que contém nitrogênio na molécula os aminoácidos não protéicos, aminas, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos. Os primeiros figuram como antinutrientes ou antimetabólitos, interferindo no metabolismo de microrganismos e herbívoros. Aminas podem ser produtos independentes ou intermediários para a produção de alcalóides (WINK, 2004).

Em plantas que produzem glicosídeos cianogênicos, o estresse sofrido provoca a hidrólise dessa molécula liberando cianeto de hidrogênio (HCN). O HCN é altamente tóxico para animais ou microrganismos pois inibe o transporte de elétrons da cadeia respiratória. Glicosinolatos contém enxofre como elemento adicional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e obtenção do isolado monopustular de *Puccinia psidii*

Assim como descrito por Leite (2012), folhas de *E. grandis* contaminadas com *P. psidii*, provenientes do município de Itapetininga-SP, foram cedidas pela Cia Suzano de Papel e Celulose. Para a retirada e solubilização dos esporos das folhas, as mesmas foram mergulhadas em 200 mL de água Milli-Q acrescida de 0,2% (v/v) de detergente Tween 20 e mantidas em shaker sob agitação de 130 rpm, a 20ºC por 30 minutos. As folhas foram retiradas com a ajuda de uma peneira e a concentração de esporos foi ajustada para 10^5 esporos/mL com o auxílio de uma Câmara de Neubauer. A solução foi transferida para um pulverizador manual e aspergida até saturar sobre folhas de *E. grandis* plantados há aproximadamente 100 dias, a partir de sementes altamente susceptíveis à ferrugem (material M09D1), também cedidas pela Cia Suzano de Papel e Celulose. As plantas foram cobertas por saco plástico para a conservação da umidade e mantidas em câmaras de crescimento (CONVIRON E15), sob condições controladas de temperatura (20ºC) e regime de fotoperíodo de 12 horas de luz (200µmol.m^{-2}.s^{-1}) e 12 horas de escuro. Durante as primeiras 24 horas o material vegetal foi mantido no escuro, sendo posteriormente submetido às condições de fotoperíodo previamente descritas. Após 48 horas o saco plástico foi aberto, sendo mantido nessa condição durante os períodos de luz e fechado durante os períodos de escuro, até o momento da esporulação. As mudas foram irrigadas diariamente e fertilizadas com solução nutritiva composta de PlantProd N-P-K igual a 15-05-30 (0,6 g/L) duas vezes por semana.

Após a esporulação, 9 dias após a inoculação, uma única pústula foi coletada com auxílio de algodão úmido, e cuidadosamente raspada sobre a superfície de outra planta susceptível (M09D1), em uma nova câmara de crescimento (CONVIRON E15), e submetida às mesmas condições anteriormente descritas, a fim de multiplicar o isolado monopustular (nomeado Isolado Max Feffer 1 – MF1). Esse procedimento de reinoculação foi repetido periodicamente para a obtenção de esporos frescos até a conclusão do experimento.

3.2 Seleção de genótipos de *Eucalyptus grandis* resistentes e susceptíveis à *P.psidii*

As plantas de *E. grandis* utilizadas nos experimentos são meio-irmãs, filhas do clone BRASUZ1, que teve seu genoma sequenciado (MYBURG et al., 2014). As árvores de BRASUZ1 plantadas em um pomar de sementes foram polinizadas em um sistema de polinização aberto e as sementes coletadas – cedidas pela empresa Suzano Papel e Celulose - deram origem ao material vegetal que foi selecionado baseado em sua resistência ou suscetibilidade ao isolado MF1 de *P. psidii* (LEITE, 2012). As plantas foram inoculadas

conforme descrito previamente, e avaliadas diariamente segundo a escala estabelecida por (JUNGHANS; ALFENAS; MAFFIA, 2003). Dentre as plantas que se apresentaram altamente susceptíveis ao patógeno (classe S3), a planta nomeada Susceptível_4 foi selecionada para o experimento descrito mais adiante.

Após 30 dias, as plantas inicialmente resistentes foram novamente inoculadas, dessa vez com solução 10 vezes mais concentrada (10^6 esporos/mL). A planta nomeada Resistente_3, com alto nível de resistência (classe S0 com reação de hipersensibilidade do tipo "fleck"), também foi selecionada para o experimento.

As plantas selecionadas foram tratadas com fungicida Bayfidan (2mL/L) e transferidas para vasos plásticos de 5 litros com mistura de substrato (Plantmax) e vermiculita média na proporção de 1:1. O material vegetal foi mantido em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura (26ºC) e posteriormente submetido à clonagem.

Para fim de simplificação, daqui em diante as plantas serão referidas somente como Resistente (R) ou Susceptível (S), assim como seus clones.

3.3 Clonagem e multiplicação do material vegetal selecionado

As plantas Resistente (R) e Susceptível (S) transferidas para vasos de 5 litros se desenvolveram por 4 meses antes de serem podadas a 30 centímetros da base para a emissão de novos ramos, fisiologicamente aptos a enraizamento. Elas foram mantidas em casa de vegetação, em condições controladas de temperatura (26ºC) até os ramos atingirem o desenvolvimento ideal para o preparo de estacas.

As plantas Resistente e Susceptível tiveram brotações coletadas e acondicionadas em bandejas com água para evitar a perda de turgescência até o momento do preparo das estacas. As estacas mediam cerca de 10 centímetros de comprimento e as folhas foram cortadas transversalmente para reduzir a área de transpiração e evitar o efeito guarda-chuva (quando as folhas da estaca funcionam como barreira física, impedindo o molhamento do substrato) (ALFENAS et al., 2009). Após o preparo, as bases das estacas foram tratadas com ácido indolbutírico (AIB), a 1000 partes por milhão (ppm), veiculado em talco comercial. As estacas foram então transferidas para tubetes preenchidos com substrato (Plantmax) peneirado e vermiculita superfina na proporção 3:1 previamente umedecidos. As estacas em tubetes foram mantidas em casa de enraizamento dotada de sistema de irrigação por nebulização por 30 dias e temperatura entre 30 e 35ºC. Decorrido esse período as mudas foram transferidas para área de aclimatação coberta por sombrite 50%, e após 7 dias foram transferidas para canteiro a céu aberto para rustificação e crescimento. Após cerca de 50 dias, as mudas dos

genótipos Resistente e Susceptível foram transferidas para vasos plásticos de 5L montados conforme previamente descrito.

Após cerca de 4 meses de desenvolvimento, os clones foram podados a cerca de 30 centímetros da base, estimulando a emissão de novos ramos. Após a emissão dos ramos, as plantas passaram a ser podadas semanalmente para manutenção do tecido vegetal juvenil, uma vez que folhas fisiologicamente jovens são o principal alvo do patógeno.

Esse processo de clonagem foi repetido mais uma vez a fim de renovar os clones selecionados, sendo o lote mais jovem de plantas utilizado na montagem do experimento de metabolômica e proteômica.

3.4 Delineamento Experimental

O experimento foi delineado em blocos ao acaso com parcelas subdivididas no tempo, com duas câmaras de crescimento representando dois blocos, e seis repetições biológicas para cada tratamento (Resistentes ou Susceptíveis inoculadas) e controle (Resistentes ou Susceptíveis falso-inoculadas). A exceção foi feita para a condição pré-inoculação (0hpi), em que haviam doze repetições biológicas, havendo somente as condições Resistente e Susceptível. As posições das plantas dentro das câmaras foram sorteadas como diagramado na Figura 9 e as plantas foram aclimatadas dentro das câmaras de crescimento por uma semana, antes do experimento ser iniciado.

Cada câmara abrigava seis plantas Resistentes (R) e seis plantas Susceptíveis (S), com metade das plantas de cada genótipo sendo inoculadas como descrito no item 3.1, com concentração ajustada de 10^5 esporos/mL, e metade sendo falso-inoculada com solução de água acrescida de 0,5% (v/v) de Tween 20, sem o inóculo. Cada planta foi ensacada individualmente para evitar contaminações.

Os intervalos de coleta pré e pós-inoculação foram propostos por Leite (2012) após estudos de microscopia acompanhando a penetração e colonização do fungo na planta. Os intervalos de coleta foram 0h (plantas não inoculadas), 6h (emissão do tubo de germinação e formação do apressório), 12h (desenvolvimento da hifa de penetração), 18h (penetração nas plantas suscetíveis e resposta de defesa nas plantas resistentes), 24h (formação da célula mãe do haustório nas plantas Susceptíveis) e 72h pós-inoculação (colonização nas plantas Susceptíveis). Em cada horário foram coletados de três a quatro ápices de ramos das plantas inoculadas e falso-inoculadas. As folhas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, e mantidas a -80ºC até o início das extrações de proteínas, metabólitos e DNA. Os sintomas das plantas usadas no experimento foram acompanhados e fotografados durante

onze dias, período que compreende a inoculação, penetração, colonização do hospedeiro pelo fungo, esporulação de *P. psidii* e infecções secundárias.

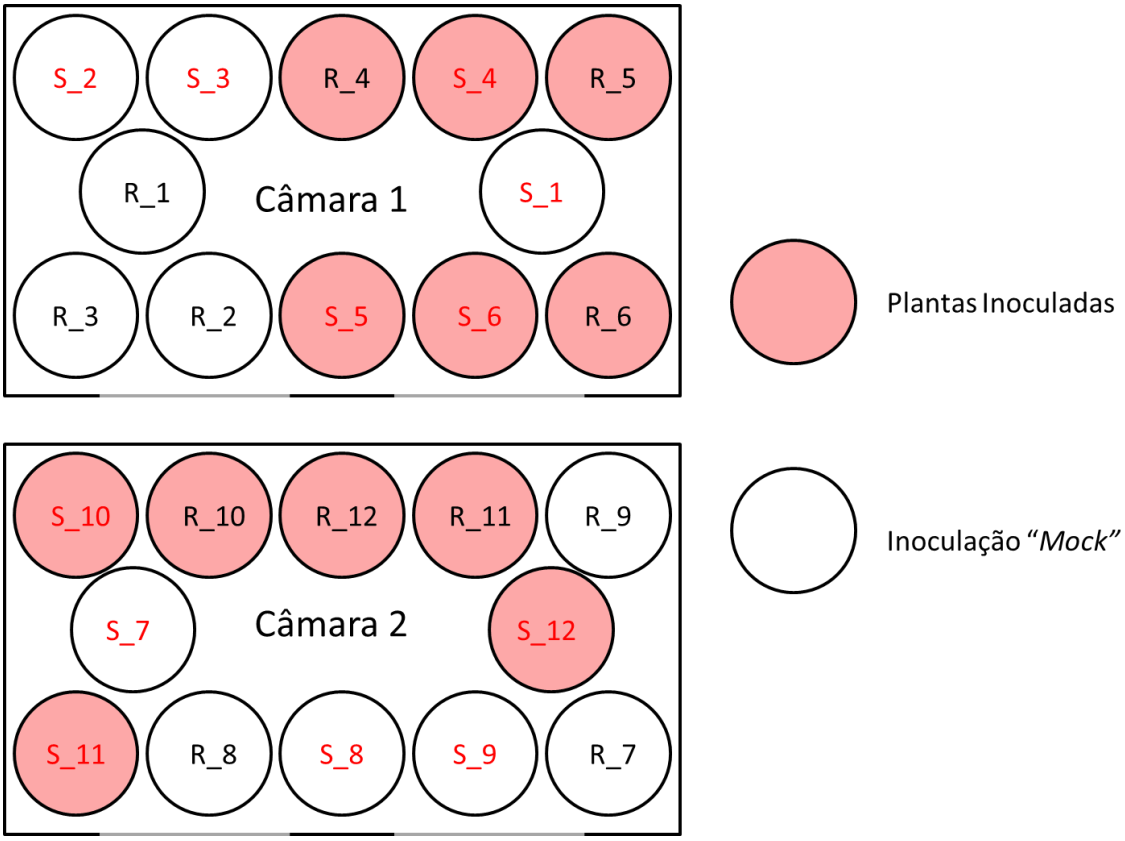


Figura 9 - Delineamento experimental. Cada câmara representa um bloco e cada planta é uma parcela. As esferas coloridas em vermelho representam plantas que foram inoculadas e as brancas falso-inoculadas (*mock*). R são as plantas Resistentes e as S são as Susceptíveis, acompanhadas pelo número da repetição

3.5 PCR para detecção de presença ou ausência de *P. psidii*

3.5.1 Extração de DNA

Para atestar a presença do patógeno *P. psidii* nas plantas inoculadas e sua ausência nas plantas falso-inoculadas, o material coletado após 72 horas de inoculação foi submetido à extração de DNA e amplificação de região específica do DNA do fungo.

Selecionou-se aleatoriamente 2 materiais resistentes inoculados, 2 materiais susceptíveis inoculados, 2 materiais resistentes falso-inoculados e 2 materiais susceptíveis falso-inoculados, sendo um de cada câmara de crescimento. A extração do DNA total de folhas de eucalipto foi realizada com o kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Aproximadamente 50 mg de material foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido juntamente com 8 mg de PVP-40 e 16 mg de sílica autoclavada. Após maceração do material, a extração continuou de acordo com as instruções do fabricante.

Para análise da qualidade do DNA extraído foi realizada eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose (1%) com 1 mg/ml de brometo de etídeo. Após a eletroforese o gel foi fotodocumentado em luz UV (ImageMaster VDS – Pharmacia Biotech). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro Nanocell (*Thermo Scientific*), diluídas para concentração de 10 ng/µL e mantidas a temperatura de -20°C.

3.5.2 Detecção do patógeno por meio de PCR convencional

A detecção do patógeno MF-1 em plantas de *E. grandis* (clones S04 e R03) foi realizada por meio de PCR convencional (GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems), utilizando o par de primers IGS-7/IGS-9 (Tabela 1) desenvolvidos para detecção de *Puccinia psidii* (dados não publicados) utilizando-se o programa *online* OligoPerfect Design Software (www.thermofisher.com/oligoperfect.html). Para tanto foram utilizadas as amostras de DNA extraídas como descrito no tópico anterior. Além disso utilizou-se DNA de uredósporos de *P. psidii* (MF-1) como controle positivo da reação.

A reação de amplificação foi realizada utilizando os seguintes reagentes: 1x Taq DNA Buffer, 3,7 mM $MgCl_2$, 0,2 mM DNTP, 2 pmol de cada primer (*forward* e *reverse*), 1,25 U taq DNA polimerase (Thermo), 0,25 µl de BSA (1mg/mL) e 1 µl de DNA (10 ng/µl), em uma reação com volume final de 25 µl. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Para finalizar, um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos gerados na reação de PCR foram analisados por meio de eletroforese (3V/cm) em gel de agarose (1,5%) e TBE (0.5%). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 mg/mL) e fotodocumentado em luz UV.

Tabela 1 - *Primers* de cobertura de região intergênica (IGS) utilizado no presente estudo

Primers	**Sequência (5'-3')**	**Região Alvo**
IGS-7 (*forward*)	CAAAGTTATTTCTGGATCAC	Região intergênica
IGS-9 (*reverse*)	CATTCTAGTGAATTTTCTTTAC	do gene rDNA

3.6 Proteômica

3.6.1 Extração proteica

Para as análises de proteômica, as folhas das plantas coletadas nos períodos 6, 12, 18 e 24hpi (horas pós-inoculação), resultantes do experimento anteriormente descrito, foram pré-

trituradas em almofariz com nitrogênio líquido para facilitar a pesagem do material. Para cada horário e tratamento foram feitas misturas de duas em duas amostras, pesando-se 50 mg de cada amostra em microtubos plásticos de 2 mL (Axygen), totalizando 100 mg por tubo, sendo que cada grupo de seis repetições biológicas deu origem a três misturas de amostras. A trituração foi finalizada em moinho de bola MM400 (Retch), homogeneizando a pulverização das amostras. A cada tubo com material triturado foi adicionado 0,8 mL de tampão de extração [0,5M Tris-HCl pH 7,5; 0,7M Sacarose; 0,1M Cloreto de Potássio; 50mM EDTA; 1mM PMSF; 2% (v/v) β-mercaptoetanol e 1% (m/v) PVPP] (HURKMAN; TANAKA, 1986), seguido de agitação em agitador tridimensional GyroMini (Labnet), em gelo, por 30 minutos. Após esse passo, foram adicionados 0,8 mL de solução fenólica saturada em Tris-HCl pH 7,5 e mantidos, novamente, sob agitação tridimensional em gelo por 30 minutos, seguido de centrifugação por 30 minutos a 10.000 *g* e 4ºC. O sobrenadante foi recolhido e o processo de adição de tampão de extração, seguido de agitação e centrifugação, foi repetido mais três vezes.

Depois da última centrifugação, o sobrenadante foi coletado em novos microtubos, e a eles foram adicionados 1,2 mL de solução 0,1M de acetato de amônio em metanol, e mantidos em geladeira por 18 horas, para precipitação das proteínas. No dia seguinte os *pellets* precipitados foram submetidos à centrifugação por 20 minutos a 16.000 *g* e 4ºC. Terminada esta etapa, seguiram-se etapas de lavagem do *pellet*, duas vezes com a mesma solução de 0,1M de acetato de amônio em metanol, em geladeira por 2 horas, e uma com acetona, também em geladeira por 2 horas. Após cada etapa de lavagem, os tubos foram centrifugados por 30 minutos, a 16000 *g* e 4ºC, o sobrenadante descartado, e mais 1,2mL de solução de lavagem adicionado. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos em dissecador, a 4º C (geladeira), por 24 horas, e as proteínas totais foram ressuspendidas em 0,4 mL tampão de solubilização (7M Uréia, 2M Tiuréia, 10mM DTT e 0,4% v/v Triton X-100). Essa ressuspensão foi feita agitando-se os tubos em gelo por cerca de três horas, em agitador tridimensional. Por fim os tubos foram centrifugados por 30 minutos, a 16000 *g* e 4ºC; recuperou-se o sobrenadante em um novo tubo, que foi estocado em ultrafreezer.

3.6.2 Dessalinização das amostras

A dessalinização foi realizada utilizando-se filtros Amicom 3KDa (Millipore), substituindo-se o tampão de solubilização por tampão de bicarbonato de amônio 50mM e pH 8,5, seguindo as normas do fabricante. Primeiramente a coluna foi hidratada com 400 µL água grau MS (Sigma-Aldrich) e centrifugada a 14000 *g* e 15ºC até o volume atingir 100 µL

na coluna. Após isso, toda a solução de proteína foi adicionada à coluna e centrifugada como anteriormente descrito. Após essa centrifugação passou-se a adicionar 300µL de tampão de bicarbonato de amônio 50mM e centrifugada a 14000 *g* e 15ºC até atingir o volume de 100µL. Este passo foi realizado 3 vezes. Terminada a última centrifugação, as amostras foram recolhidas da coluna e armazenadas em microtubos até a digestão.

3.6.3 Quantificação de Proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se um kit comercial de quantificação de proteínas da BioRad e um espectrofotômetro Hitachi modelo U-3300. Foram feitas medições de absorbância sob comprimento de onda de 595nm, com duas repetições. As médias das repetições foram usadas na equação da reta da curva padrão, obtendo-se a concentração de proteína nas soluções.

3.6.4 Verificação de qualidade do extrato proteico

Após a quantificação, o extrato proteico foi submetido à verificação da qualidade das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (LAEMMLI, 1970). Para isso foram utilizados 5 µg de proteína somado à quantidade suficiente de tampão de desnaturação para completar 15 µL (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) Glicerol, 10% (m/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol e 1% (m/v) Bromofenol Blue). As amostras foram mantidas a 100ºC (banho-maria) por 60 segundos e aplicadas nos géis, que foram submetidos à voltagem constante de 100 volts. Soluções com 5 µg de BSA (albumina de soro bovino) também foram corridas no gel para verificar a eficiência das quantificações.

Finalizada a corrida, os géis foram transferidos para solução fixadora (40% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético) por uma hora, para imobilizar as proteínas nos géis. Após a fixação, os géis foram transferidos para solução corante de *Comassie Blue G250*, por 18 horas, de acordo com o protocolo de Candiano et al. (2004), e lavados em água deionizada.

3.6.5 Digestão das amostras complexas

Uma alíquota de 50 µg de proteína de cada amostra foi separada e a elas foram adicionados 25 µL de 2% (v/v) *RapiGest SF* (Waters) seguido de incubação por 15 minutos a 80ºC. Em seguida, as amostras foram reduzidas adicionando-se 2,5 µL 100mM ditiotreitol (DTT), e mantidas por 30 minutos a 60ºC. Após a redução, foram alquiladas com a adição de 2,5 µL de 100mM iodoacetamida (IAA), e mantidas no escuro, à temperatura ambiente, por

30 minutos. Assim, as amostras estavam prontas para digestão, por 16 horas, com 10 µL de solução 50ng/µL de tripsina, a 37ºC. O bloqueio da tripsina se deu com o acréscimo de 10 µL de 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), e incubação a 37ºC por 90 minutos. Para finalizar, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 *g* e 6ºC, e o sobrenadante transferido para outro tubo. Essa solução de proteínas digeridas foi então seca em concentrador à vácuo (Concentrador 5301, *Eppendorf*).

3.6.6 Purificação das amostras

Às amostras secas a vácuo foram adicionados 50µL de solução 0,1% TFA em H_2O cada uma foi separada em 5 tubos com 10µL cada. Após esse passo cada uma foi purificada utilizando micro colunas de fase reversa (*Reverse phase Zip-Tip C18, Millipore*). Para isso, as colunas foram equilibradas em solução A [100% acetonitrila (ACN), 0,1% (v/v) TFA], solução B [50% (v/v) ACN:H_2O, 0,1% (v/v) TFA] e solução C [100 % H_2O, 0,1% (v/v) TFA], respectivamente. Após o equilíbrio, as amostras proteicas puderam ser ligadas à coluna, seguindo-se lavagem com solução D [95% H_20, 5% (v/v) metanol, 0,1% (v/v) TFA]. Para a eluição dos peptídeos, 10µL de solução B foram aspirados e acondicionados em tubos de vidro borosilicato (Waters Total Recovery vials), juntando-se novamente as alíquotas separadas inicialmente. Seguiu-se nova concentração a vácuo.

3.6.7 LC-MS^E

As amostras foram ressuspendidas em 32 µL de solução de formiato de amônio 20 mM pH10 acrescida de 8 µL de padrão interno glicogênio-fosforilase de coelho (P00489) 100 *f*mol/µL. Os peptídeos foram sequenciados no espectrômetro de massas *Synapt* G2 HDMS (Waters, Manchester, UK), acoplado ao sistema UPLC *NanoAcquity*, com tecnologia 2D (Waters). Na primeira dimensão, os peptídeos foram separados em coluna XBridge BEH 130, C18, 5 µm (300 µm x 50 mm) (Waters, Manchester, UK), através de gradiente de 3 a 45% de solvente B [0,1% (v/v) ácido fórmico em ACN], ao fluxo de 2 µL/min. Os peptídeos eluídos da coluna de primeira dimensão foram capturados por uma coluna C18 Symmetry (5 µm, 180 µm x 20 mm) (Waters, Manchester, UK). A separação, na segunda dimensão, foi realizada em uma coluna HSS T3 (1.8 µm, 75 µm x 100 mm) (Waters, Manchester, UK), usando-se um gradiente binário de 7 a 40% de acetonitrila, em 0,1% (v/v) de ácido fórmico durante 20 minutos, a um fluxo de 350 nL.min-1.

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) Synapt MS, equipado com uma fonte nanolockspray

operando no modo positivo (Waters, Manchester, UK). Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo "V", com poder de resolução mínimo de 12500. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana ($[M+2H]^{2+}$=785,84206 daltons) a 200 fmol.μL^{-1} e a mesma solução foi empregada para o *lock mass* utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo MS^E (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo *trap* do '*T-wave*' CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de *m/z* entre 50 e 2000.

3.6.8 Análise dos dados

Os espectros de massas foram processados utilizando o programa *ProteinLynx GlobalServer* (PLGS) versão 2.5.1, com o banco de dados de proteínas de *Eucalyptus grandis* disponível no *Phytozome* (https://phytozome.jgi.doe.gov), contando com 46315 proteínas. Os parâmetros de processamento incluíram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de três íons-fragmento correspondentes por peptídeo; mínimo de 7 íons-fragmento correspondentes por proteína; mínimo de 2 peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso-positivos (FDR) a 4%.

Para identificar e quantificar as proteínas, as intensidades do espectro foram calculadas pelo método estequiométrico, de acordo com o padrão interno, por análise de MS^E e normalizado pela função de "auto-normalização" do próprio PLGS. A quantidade e sequência dos peptídeos correspondentes e fentomols (*f*mols) foram obtidos baseados na média dos três peptídeos mais abundantes, determinado em cada experimento individual (SILVA et al., 2006), considerando os dados de 3 réplicas biológicas por amostra. A taxa de descoberta de falso-positivos para identificação de peptídeos e proteínas foi determinada baseada na busca em um banco de dados reverso, gerado automaticamente pelo programa PLGS 2.5.1. Todas as proteínas encontradas foram identificadas com uma confiança acima de 95%. Somente as proteínas identificadas em pelo menos duas das três réplicas biológicas foram consideradas para as análises posteriores.

Proteínas que foram apenas identificadas, mas não quantificadas em todas as amostras, foram eliminadas para simplificar o processo de análise. Para as proteínas restantes

foram calculadas médias dos valores de quantificação das réplicas biológicas, omitindo-se o valor zero do cálculo quando esse estava presente na repetição. Essas tarefas foram realizadas por linhas de comando no programa R. As proteínas foram identificadas e nomeadas considerando a anotação do genoma do eucalipto publicada por Myburg et al. (2014).

As proteínas de aparecimento único – encontradas em uma única condição – foram analisadas separadamente. As proteínas comuns a mais de uma condição tiveram suas médias de quantificação transformadas adicionando-se 1 a todos os valores com o objetivo de não haver valores zerados, o que dificultaria o desenvolvimento dos passos seguintes. Após a transformação dos dados foi calculado para cada proteína o log2 da razão entre tratamento inoculado e controle (log2(inoculado/controle)) para se obter o resultado de abundância diferencial das proteínas dentro de cada genótipo. Considerou-se que houve diferença significativa entre planta inoculada e controle quando a razão obtida foi <-2 ou >2. Valores que não ultrapassaram o limiar estabelecido não foram considerados diferencialmente abundantes.

As proteínas comuns foram agrupadas livremente por processo biológico em que estão envolvidas na célula. Esses grupos foram criados filtrando termos de ontologia gênica (GOs) relacionados à **resposta imune / estresse** (GO:0006950, GO:0006952, GO:0006979, GO:0009607, GO:0004096, GO:0004601, GO:0006801, GO:0004650, GO:0004784); **energia** (GO:0006096, GO:0030976, GO:0006006, GO:0015986, GO:0005739, GO:0004129, GO:0006108, GO:0030060, GO:0006754, GO:0008121, GO:0006122, GO:0044262); **parede celular / produção de carboidratos** (GO:0015977, GO:0015979, GO:0006094, GO:0006098, GO:0005985, GO:0009765, GO:0042651, GO:0009496, GO:0009507, GO:0005975, GO:0009521, GO:0016168, GO:0019684, GO:0009767).

3.7 Metabolômica

3.7.1 Extração de Metabólitos

Para o estudo de metabolômica foram utilizadas as seis repetições biológicas de todos os períodos de coleta (6, 12, 18, 24 e 72hpi), resultantes do experimento citado anteriormente (ítem 3.4), com exceção da condição pré-inoculação (0hpi), que teve doze repetições biológicas por nenhuma das plantas ser inoculada. As folhas das plantas foram pré-trituradas em almofariz com nitrogênio líquido, pesadas (~25mg), e a trituração foi finalizada em moinho de bola Retch MM400 por 60 segundos a 20 Hz, homogeneizando a pulverização das amostras. Após esse procedimento foram adicionados 500µl de solvente de extração composto de clorofórmio/água/metanol (20/20/60%) (GULLBERG et al., 2004), contendo

quercetina como padrão interno (50 pmol). As soluções foram homogeneizadas em vórtex (MS1 Minishaker - IKA) por 30 segundos e moinho de bola por 60 segundos a 20Hz.

Após o procedimento anterior as amostras foram sonicadas por 15 minutos (UltraCleaner 1600A - Unique) em gelo e centrifugadas (Centrifuge 5415R - Eppendorf) por 10 minutos à velocidade de 16.000 *g* e 6º C de temperatura. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millex (MilliQ) de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) e 0,22 µm de porosidade. Seguiu-se a secagem de uma alíquota de 50 µl das amostras em concentrador a vácuo (Concentrator 5301 - Eppendorf) e ressuspensão no mesmo volume de tampão de extração.

3.7.2 Separação e Análise de Metabólitos - Modo Negativo

Os metabólitos foram analisados por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC-MS) acoplada a espectrômetro de massas. As amostras foram primeiramente injetadas em um cromatógrafo Acquity (Waters, Manchester, UK) com uma coluna de fase reversa (C18 BEH, 2.1x100 mm, 1.7 µm) condicionada a 35ºC. Os solventes de eluição foram A: água com 0,1% de ácido fórmico e o B: acetonitrila dopado com 0,1% de ácido fórmico. No início da corrida, o gradiente foi de 95% A e 5% B. O gradiente aumentou de forma linear para 75% A e 25% B nos próximos 6 minutos. Inverteu-se a polaridade para 25% A e 75% B em 6 minutos. 5% A e 95% B foram estabelecidos pelo próximo 1 minuto. A condição inicial foi restabelecida para a lavagem da coluna por 1 minuto. O tempo total da corrida foi de 14 minutos.

Após a separação no cromatógrafo líquido, as amostras foram automaticamente injetadas e analisadas em um equipamento Q-TOF Ultima API (Waters, Manchester, UK), de alta resolução, com ionização por ESI no modo negativo, nas condições: temperatura da fonte de 150°C, temperatura de dessolvatação de 450°C, voltagem do capilar de 3 kV e a voltagem do cone 35 V. O fluxo de nitrogênio no cone foi de 50 L/hr e de desolvatação foi de 550 L/hr. Os espectros foram adquiridos na faixa de *m/z* 100-1200.

O equipamento foi previamente calibrado com uma solução padrão de 0,05 mM de formiato de sódio em solução de 90:10 de ACN:H_2O, que também foi usada como *lock-mass*, normalizando os valores de *m/z* durante a corrida. O fluxo dos solventes foi de 0,5 $mL.min^{-1}$.

Foram analisadas 2 réplicas técnicas de cada uma das réplicas biológicas, totalizando 12 conjuntos de dados para cada tratamento e controle pós-inoculação e 24 conjuntos de dados para plantas Resistentes e Susceptíveis pré-inoculação.

3.7.3 Pré-processamento dos Dados

Após os metabólitos serem separados no UPLC Acquity (Waters, Manchester, UK) e analisados no modo negativo pelo espectrômetro de massas QTOF Ultima (Waters, Manchester, UK), os dados gerados foram pré-processados no programa MarkerLynx (Waters, Manchester, UK). Esse programa é responsável pela remoção de ruídos, alinhamento de picos, deconvolução, normalização pelo TIC (contagem total de íons) da quercetina e detecção de picos, determinando sua intensidade e quais desses representam íons (possíveis metabólitos).

Para esse pré-processamento foi considerado 1 minuto como tempo inicial de retenção e 10 minutos como tempo de retenção final. O maior *m/z* considerado foi 1000 e o mais baixo 100, a uma tolerância de erro de massa de 0,1 dalton. A tolerância de tempo de retenção foi de 0.5 minuto e o valor mínimo de intensidade de pico foi 300. A quercetina (C15H9O7, 301.0348 daltons) foi usada como padrão interno, com tempo de retenção determinado em 5.18 minutos, considerando uma tolerância de massa de 0,1 daltons e erro de tempo de retenção de 0.05 minutos.

Após essa etapa os dados de área de pico foram exportados para um arquivo Excel (Microsoft) onde os valores foram normalizados pelo peso fresco das amostras correspondentes, anotados anteriormente à extração. Os íons que apresentaram valor zero em mais de 50% das amostras dentro de cada grupo tiveram todos valores zerados dentro do grupo. Essa estratégia foi aplicada para eliminar falso-positivos.

3.7.4 Normalização e Análise Estatística dos Dados

Os dados pré-processados foram analisados pelo programa *online* Metaboanalyst 3.0 (XIA et al., 2015), gerando análises de variância (ANOVA), teste-t, análises multivariadas como PCA e PLS-DA e importância das variáveis nas projeções multivariadas (VIPs). As tabelas de área de picos gerados pelo programa MarkerLynx foram importadas no Metaboanalyst 3.0 e filtradas por “intervalo interquantil” (*Interquantile Range* - IQR). Os dados foram normalizados por transformação em log (*log transformation*) e dimensionamento por Pareto (*Pareto scaling*), tornando os dados mais comparáveis. Todos os dados gerados de pré e pós-inoculação foram comparados conjuntamente por PCA para se ter uma visão global dos fatores “genótipo” e “infecção”. As demais comparações analisadas foram entre as condições “plantas Resistentes X plantas Susceptíveis” pré-inoculação para procurar por fitoanticipinas; “Resistentes inoculadas X Resistentes falso-inoculadas” nos diferentes horários, procurando por fitoalexinas; “Susceptíveis inoculadas X Susceptíveis falso-

inoculadas” nos diferentes horários, procurando por biomarcadores de infecção. As variáveis (possíveis metabólitos) que mais contribuíram para a separação dos grupos comparados (VIPs) foram selecionadas para a fragmentação e identificação tentativa, como descrito a seguir.

3.7.5 Fragmentação e Identificação de Metabólitos

Os experimentos de fragmentação (MS/MS) foram realizados nas mesmas condições da fonte de ionização descritas anteriormente, com o intuito de auxiliar na elucidação das estruturas de possíveis metabólitos secundários. Para a fragmentação dos íons selecionados foram utilizados três valores de energia de colisão: 20 eV, 30 eV e 50eV.

O banco de dados Metlin (https://metlin.scripps.edu) foi utilizado para a procura dos metabólitos escolhidos através de suas massas moleculares, utilizando-se erro de massa de até 100 ppm e considerando o aducto $[M-H]^-$. As estruturas das moléculas foram importadas e fragmentadas teoricamente pelo programa ACD/MS Structure ID suite (ACD/Labs, Toronto, Canadá). Os fragmentos propostos pelo programa foram comparados aos fragmentos gerados pela técnica de MS/MS, e sua identificação foi aceita ou refutada de acordo com suas similaridades.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos sintomas

Após a inoculação e falsa inoculação do patógeno, os sintomas da doença foram acompanhados nas plantas e o resultado foi o mesmo demonstrado no estudo de Leite (2012). As plantas Resistentes inoculadas apresentaram primeiramente uma leve deformação nas folhas (Figura 10), sendo notadas ondulações nas bordas, que possuem contorno homogêneo e regular em plantas sadias. Outro sintoma foi o aparecimento de manchas cloróticas, mais evidentes a partir do sexto dia após a inoculação. Esses são sinais típicos da reação de hipersensibilidade da planta à presença ao fungo. As plantas foram acompanhadas até 15 dias após a inoculação, mas não houve esporulação nas plantas Resistentes, e os sintomas anteriormente descritos desapareceram aos poucos até sua extinção.

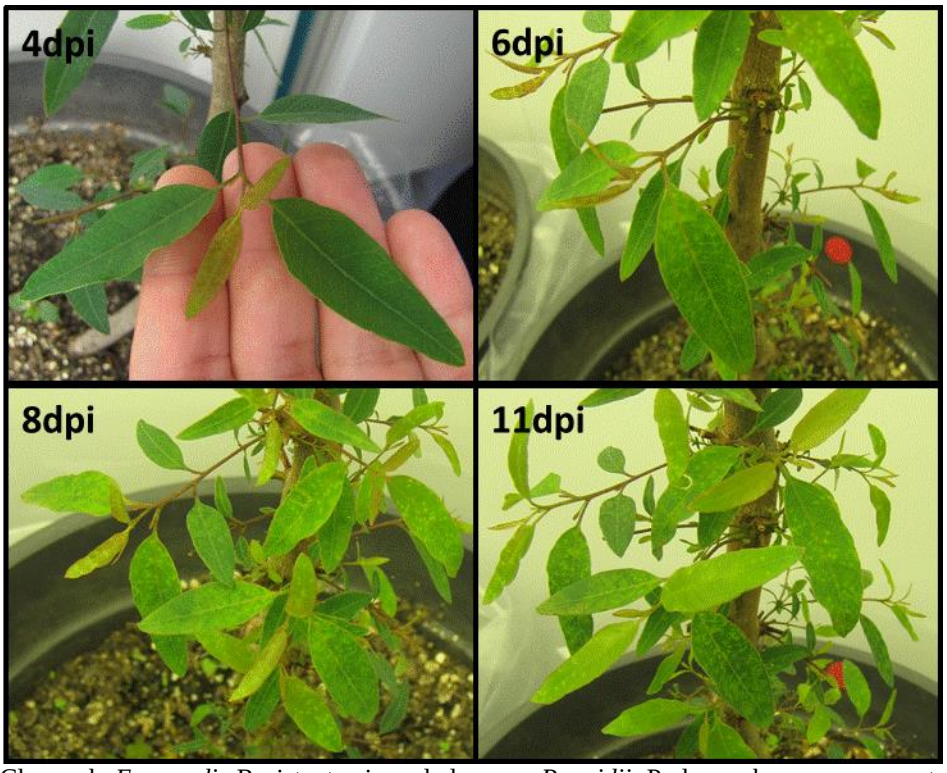


Figura 10 – Clones de *E. grandis* Resistentes inoculadas com *P. psidii*. Pode-se observar a resposta da planta à ferrugem quatro, seis, oito e onze dias pós-infecção (dpi). Não há evolução do patógeno na planta, que tem sucesso em impedir o avanço da doença

As plantas Susceptíveis inoculadas foram igualmente acompanhadas, com as folhas sofrendo deformação e aparecimento de manchas cloróticas mais intensas do que nas plantas Resistentes (Figura 11). Oito dias após a inoculação já era possível observar as primeiras pústulas emergindo da superfície foliar das plantas. Onze dias após a inoculação as plantas

Susceptíveis já estavam completamente tomadas pela ferrugem, com aumento na massa de esporos até quinze dias após a inoculação, momento em que o acompanhamento foi cessado.

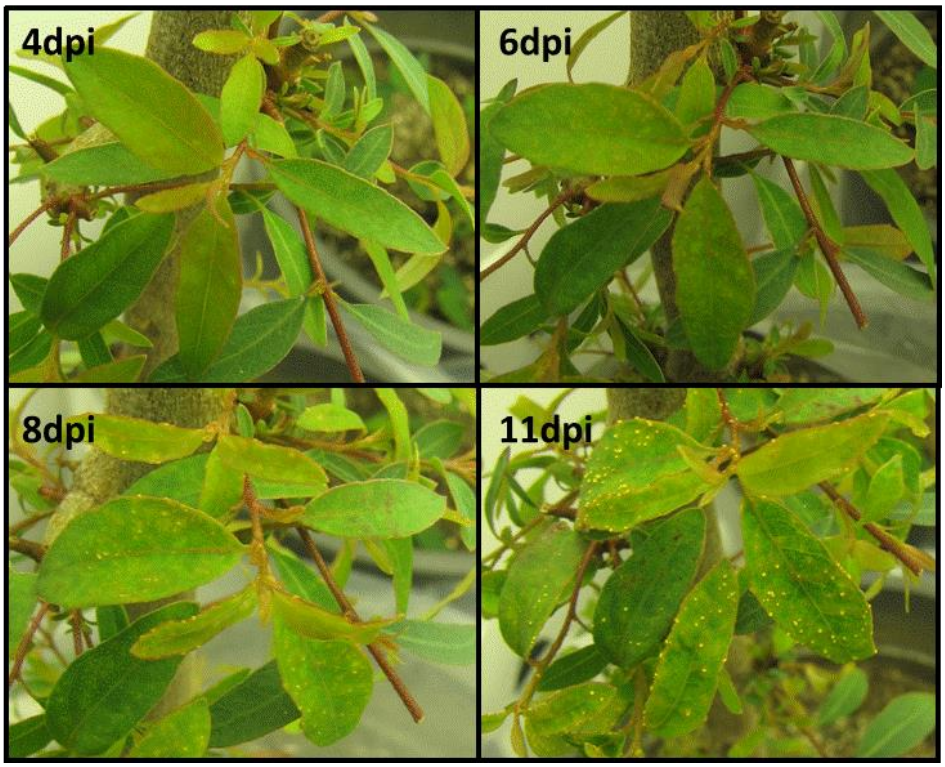


Figura 11 – Clones de *E. grandis* Susceptíveis inoculadas com *P. psidii*. Pode-se observar a evolução da ferrugem quatro, seis, oito e onze dias pós-infecção (dpi). Os esporos emergem a partir do oitavo dia pós-infecção e passam a causar infecções secundárias

Quanto às plantas falso inoculadas, elas também foram observadas durante o período de quinze dias, sem o aparecimento de sintomas ou pústulas (Figura 12). A completa ausência de *P. psidii* nessas plantas foi comprovada por PCR, utilizando-se sequência específica para a detecção do patógeno.

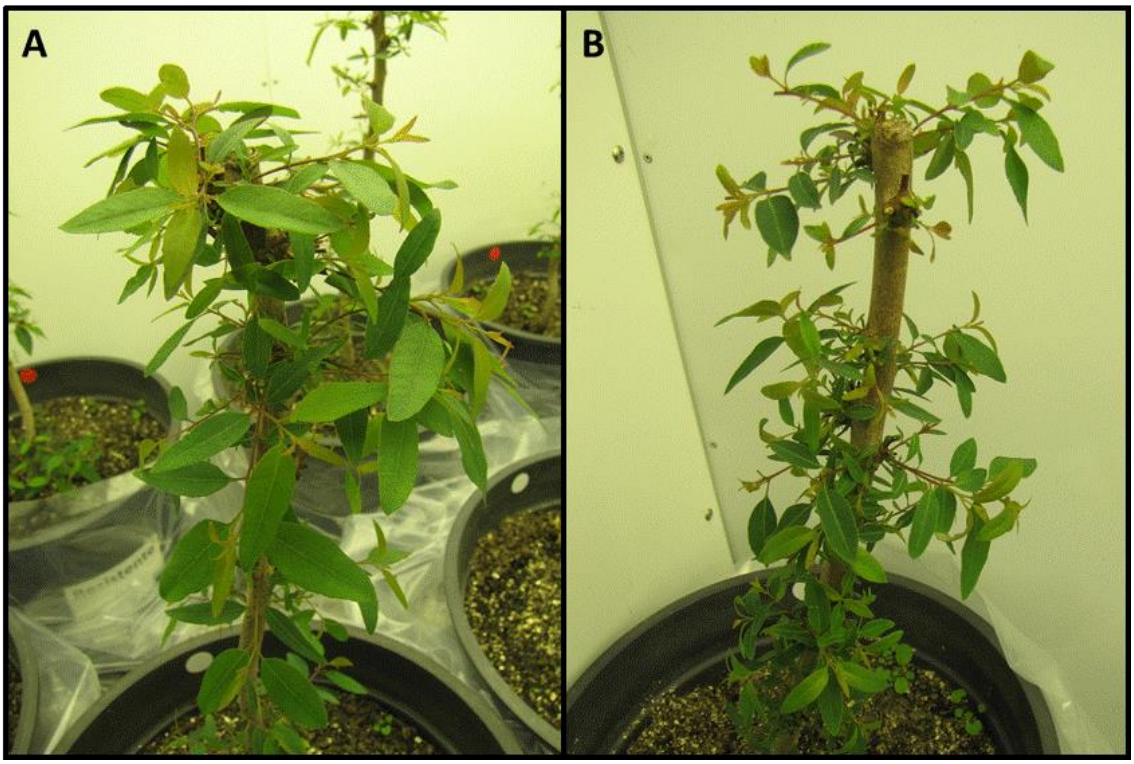


Figura 12 – Plantas falso-inoculadas 11 dias após aspersão de solução de água acrescida de Tween 20. (**A)** Clone Resistente; (**B)** Clone Susceptível. Nenhum sintoma de infecção por *P. psidii* foi detectado nas plantas controle

4.2 Ausência do fungo nas plantas falso inoculadas

O DNA das amostras Resistentes e Susceptíveis, após 72 horas de inoculação foi extraído com sucesso, com quantidade suficiente para as reações de PCR, e sem grande degradação, como é possível ver na Figura 13. As soluções de DNA foram utilizadas para as reações de PCR, que foram corridas em gel de eletroforese para visualização ou não da amplificação da região intergênica do patógeno (Figura 14). O que se pode observar é que os *primers* utilizados detectaram o fungo nas quatro amostras inoculadas (R_6, R_12, S_6, S_12), assim como para o controle positivo contendo somente DNA do patógeno, mas não amplificou a amostra de DNA das plantas falso-inoculadas (R_3, R_6, S_3, S_6) ou controle negativo (Branco). Isso comprova que não houve contaminação por *P. psidii* nas plantas falso-inoculadas, apesar de estarem no mesmo ambiente das plantas inoculadas. O isolamento das plantas com sacos plásticos individuais foi eficiente em evitar a contaminação.

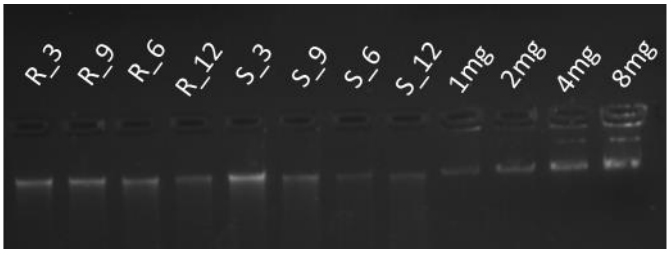


Figura 13 - Qualidade da extração de DNA. O gel de agarose permite observar o sucesso da extração de DNA, sem degradação do ácido nucléico. **R_3** e **R_9** são plantas Resistentes controle (falso-inoculadas); **R_6** e **R_12** são plantas Resistentes inoculadas; **S_3** e **S_9** são plantas Susceptíveis controle (falso-inoculadas); **S_6** e **S_12** são plantas Susceptíveis inoculadas. As últimas quatro bandas contém DNA com concentrações conhecidas, variando de 1 a 8 mg

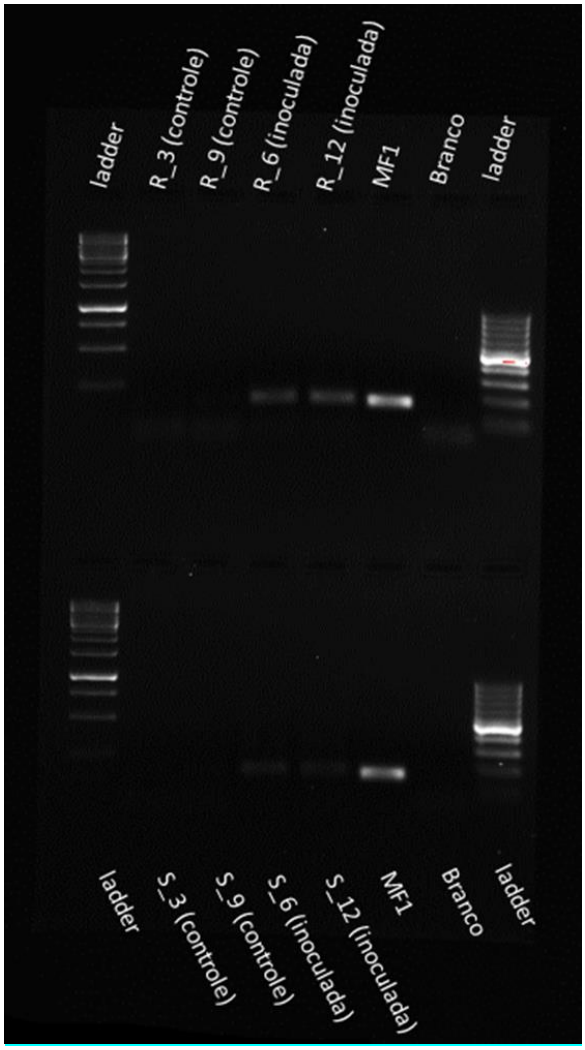


Figura 14 – Gel de agarose da amplificação da região intergênica (IGS) de *P. psidii*. Não houve amplificação nas amostras de controle negativo (**Branco),** controle Resistentes (**R_3** e **R_9**) ou controle Susceptíveis (**S_3** e **S_9**), comprovando a eficiência do método empregado para evitar contaminações indesejáveis com *P. psidii*. As plantas inoculadas Resistentes (**R_6** e **R_12**) e Susceptíveis (**S_6** e **S_12**), assim como o controle positivo MF1 (isolado de *P. psidii*), apresentaram amplificação, comprovando a presença do patógeno

4.3 Resultados Proteômica

4.3.1 Rendimento e qualidade das extrações de proteína

As soluções dessalinizadas resultantes da extração proteica foram quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o método de Bradford (1976) para avaliar o rendimento obtido. As concentrações variaram de 1,81 a 7,05 µg/µl (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantificação dos extratos proteicos em µg/µl

Tempo	Amostra	Rep_1 (absorbância de UV em 280nm)	Rep_2 (absorbância de UV em 280nm)	Média (absorbância de UV em 280nm)	Quantificação (µg/µl)
06hpi	R_C_1	0.171	0.207	0.189	3.552631579
	R_C_2	0.088	0.105	0.0965	1.813909774
	R_C_3	0.15	0.168	0.159	2.988721805
	R_T_1	0.26	0.275	0.2675	5.028195489
	R_T_2	0.28	0.299	0.2895	5.441729323
	R_T_3	0.261	0.27	0.2655	4.990601504
	S_C_1	0.233	0.23	0.2315	4.351503759
	S_C_2	0.324	0.306	0.315	5.921052632
	S_C_3	0.274	0.259	0.2665	5.009398496
	S_T_1	0.292	0.329	0.3105	5.836466165
	S_T_2	0.305	0.32	0.3125	5.87406015
	S_T_3	0.305	0.305	0.305	5.733082707
12hpi	R_C_1	0.21	0.24	0.225	4.229323308
	R_C_2	0.201	0.21	0.2055	3.862781955
	R_C_3	0.287	0.285	0.286	5.37593985
	R_T_1	0.208	0.256	0.232	4.360902256
	R_T_2	0.322	0.302	0.312	5.864661654
	R_T_3	0.247	0.25	0.2485	4.671052632
	S_C_1	0.226	0.214	0.22	4.135338346
	S_C_2	0.342	0.361	0.3515	6.607142857
	S_C_3	0.227	0.258	0.2425	4.558270677
	S_T_1	0.31	0.313	0.3115	5.855263158
	S_T_2	0.27	0.27	0.27	5.07518797
	S_T_3	0.326	0.34	0.333	6.259398496
18hpi	R_C_1	0.243	0.236	0.2395	4.501879699
	R_C_2	0.178	0.174	0.176	3.308270677
	R_C_3	0.278	0.283	0.2805	5.272556391
	R_T_1	0.325	0.321	0.323	6.071428571
	R_T_2	0.276	0.272	0.274	5.15037594
	R_T_3	0.342	0.409	0.3755	7.058270677
	S_C_1	0.28	0.286	0.283	5.319548872
	S_C_2	0.301	0.302	0.3015	5.667293233
	S_C_3	0.316	0.286	0.301	5.657894737
	S_T_1	0.301	0.292	0.2965	5.573308271
	S_T_2	0.225	0.247	0.236	4.436090226
	S_T_3	0.224	0.256	0.24	4.511278195
24hpi	R_C_1	0.304	0.346	0.325	6.109022556
	R_C_2	0.23	0.202	0.216	4.060150376
	R_C_3	0.28	0.3	0.29	5.45112782
	R_T_1	0.261	0.273	0.267	5.018796992
	R_T_2	0.303	0.32	0.3115	5.855263158
	R_T_3	0.293	0.246	0.2695	5.065789474
	S_C_1	0.226	0.229	0.2275	4.276315789
	S_C_2	0.299	0.277	0.288	5.413533835
	S_C_3	0.225	0.225	0.225	4.229323308
	S_T_1	0.258	0.306	0.282	5.30075188
	S_T_2	0.321	0.321	0.321	6.033834586
	S_T_3	0.215	0.233	0.224	4.210526316

Alíquotas contendo 5 µg dessas soluções foram corridas em gel 1D PAGE (gel de eletroforese de poliacrilamida) para verificar as quantificações e atestar a qualidade das extrações de proteína. Como mostrado na Figura 15, as extrações foram de boa qualidade, sem degradação proteica e com quantificação por espectrofotometria precisa, o que pode ser comprovado pelas bandas de proteínas com intensidade muito similares nos géis. As amostras proteicas foram submetidas à digestão e os peptídeos resultantes purificados em micro colunas de fase reversa. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas e os dados obtidos foram processados e analisados estatisticamente.

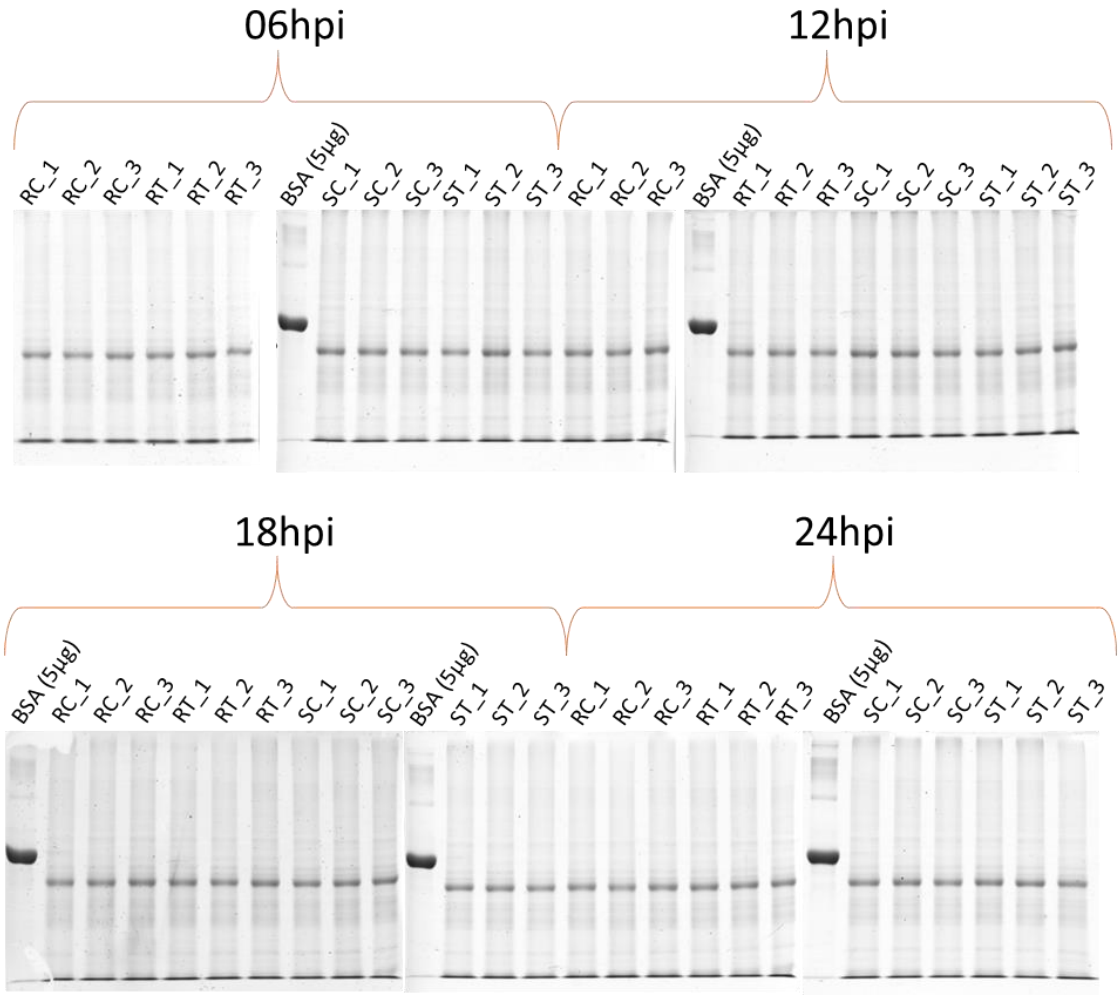


Figura 15 - Géis para checar a qualidade de extração e a quantificação de proteínas totais. Os colchetes indicam o período de coleta. RC refere-se a amostras de plantas Resistentes Controle (falso-inoculadas); RT refere-se a amostras de plantas Resistente Tratamento (inoculadas); SC refere-se a amostras de Susceptíveis Controle; ST refere-se a amostras Susceptíveis Tratamento. Os números referem-se à repetição biológica

4.3.2 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Após o processamento dos dados de proteômica pelo programa *Protein Lynx Global Server* (PLGS), um total de 5503 proteínas diferentes foram identificadas, considerando todas as amostras (total de setenta e duas). Proteínas que foram apenas identificadas, mas não quantificadas em todas as amostras, foram eliminadas para simplificar o processo de análise. Como procedimento padrão foram apenas consideradas para análise estatística proteínas quantificadas em duas ou três réplicas biológicas. Para as proteínas restantes foram calculadas médias dos valores de quantificação das réplicas biológicas, eliminando-se o valor zero do cálculo quando esse estava presente na repetição. Essas tarefas foram realizadas por linhas de comando no programa R, chegando-se a um total de 1314 proteínas (Figura 16), as quais foram identificadas e nomeadas considerando a anotação do genoma do eucalipto publicada por Myburg et al. (2014).

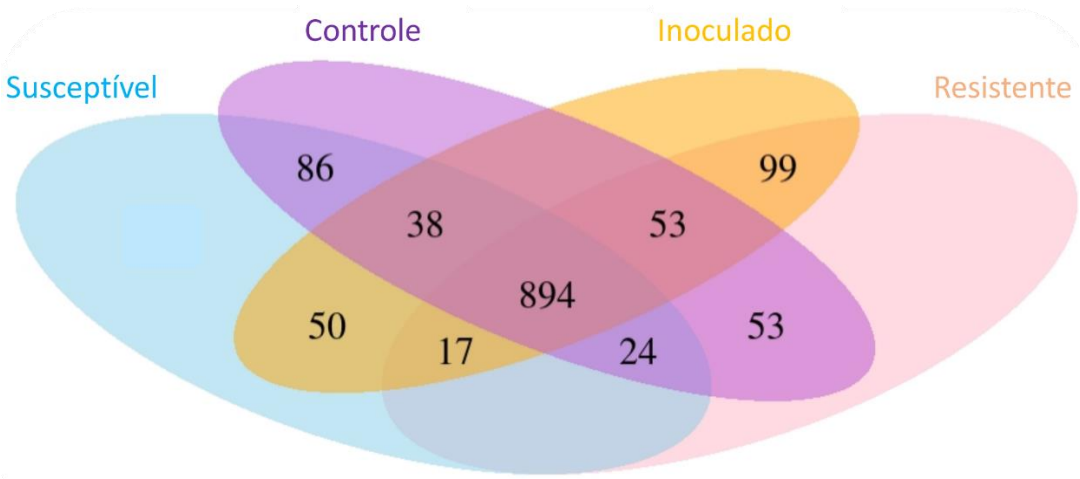


Figura 16 - Diagrama de Venn representando o total de proteínas quantificadas na análise de proteômica. As proteínas estão separadas por genótipo e tratamento, com as proteínas comuns entre as condições representadas nas intersecções dos balões

4.3.3 Distribuição de proteínas nos diferentes tempos pós-inoculação

Para cada horário foram calculados o total de proteínas quantificadas tanto nas plantas controle (falso-inoculadas) como nas plantas tratamento (inoculadas), além daquelas somente encontradas nas plantas controle ou somente nas plantas tratamento. Pelos gráficos pode-se observar que dentro do genótipo Resistente há uma maior quantidade de proteínas exclusivas por horário nas plantas inoculadas, quando essas são comparadas aos seus controles (Figura 17). Isso vale para todos os horários observados.

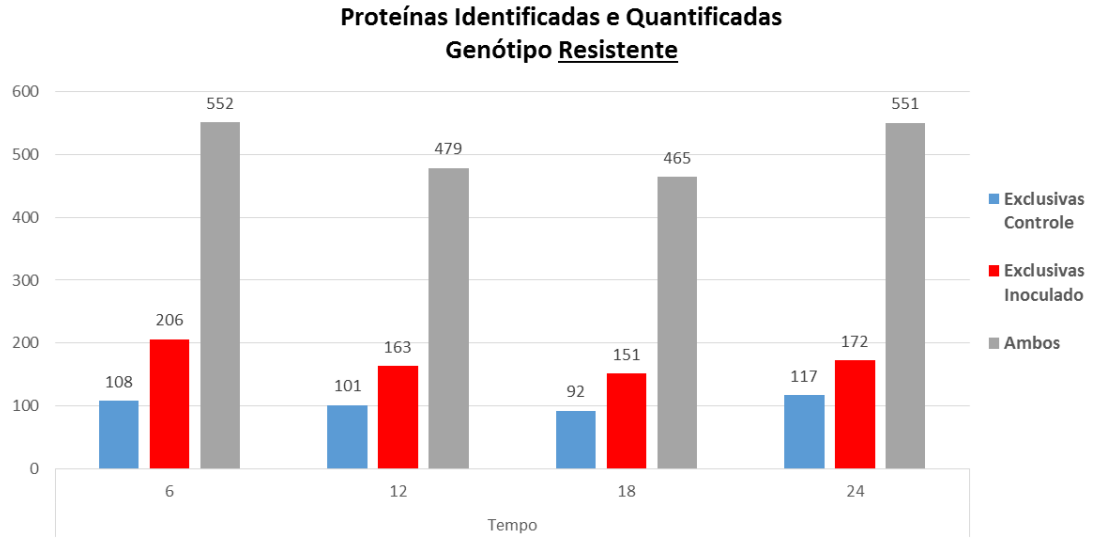


Figura 17 - Distribuição de proteínas exclusivas e comuns entre plantas falso-inoculadas (controle) e inoculadas (tratamento) no genótipo Resistente. Comparativamente é possível observar um maior número de proteínas exclusivas por horário nas plantas inoculadas quando comparadas a seus controles

A situação é invertida no genótipo Susceptível (Figura 18). Nesse caso há uma maior quantidade de proteínas exclusivas por horário nas plantas controle quando comparadas aos tratamentos inoculados. Isso sugere respostas diferentes dos genótipos diante do ataque do patógeno.

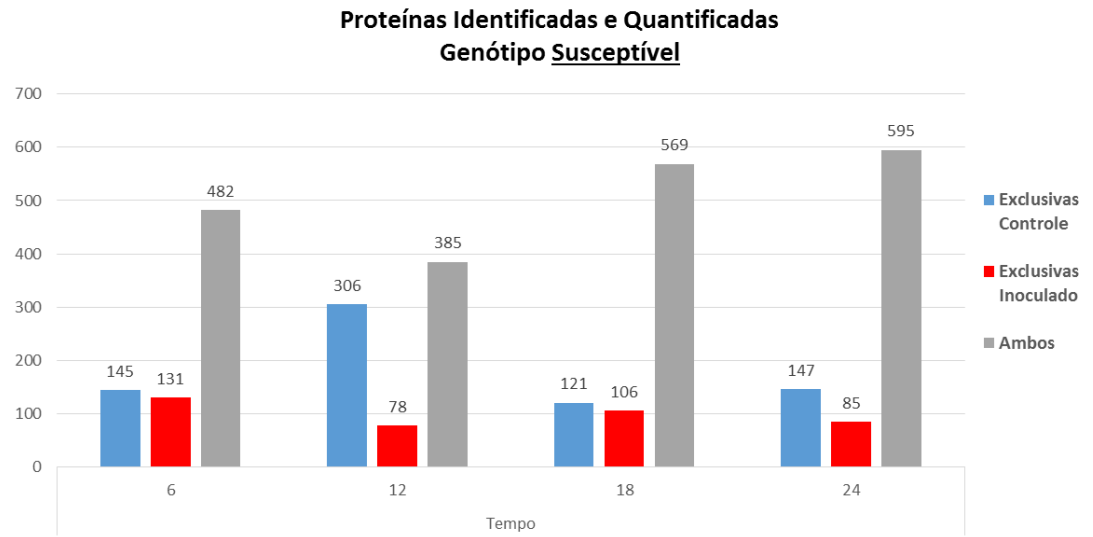


Figura 18 - Distribuição de proteínas exclusivas e comuns entre plantas falso-inoculadas (controle) e inoculadas (tratamento) no genótipo Susceptível

4.3.4 Proteínas Exclusivas

277 proteínas foram identificadas e quantificadas em um único genótipo e tratamento (E.g. Resistente inoculada), não se considerando os tempos, dentre as quais 246 são tempo-exclusivas e, portanto, ocorreram em apenas um genótipo, tratamento e horário. Dessas 277

proteínas, as unicamente presentes nas plantas inoculadas, tanto Resistentes como Susceptíveis, foram analisadas separadamente das demais e estão enumeradas nas tabelas abaixo (Tabela 3) com suas respectivas identificações, genótipos, tratamentos e horários em que foram encontradas.

Tabela 3 – Proteínas encontradas em uma única condição. Estão indicadas a condição, número de acesso no Phytozome (*Eucalyptus grandis*), identificação e período de coleta em que a proteína foi encontrada (continua)

Condição	Número de acesso da proteína	Proteína	Tempo (hpi)			
			6	12	18	24
Resistente Inoculado	Eucgr.L01179.1	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein	*			
	Eucgr.A02734.2	heat shock protein 90.1	*			
	Eucgr.F01822.1	Photosystem II reaction center PsbP family protein	*			
	Eucgr.F03876.1	post-illumination chlorophyll fluorescence increase	*			
	Eucgr.G02885.1	soybean gene regulated by cold-2	*			
	Eucgr.J01253.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	*			
	Eucgr.C03703.1	phosphofructokinase 3	*			
	Eucgr.C00903.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	*			
	Eucgr.A01927.1	aspartate aminotransferase 1	*			
	Eucgr.J01348.1	FTSH protease 6	*			
	Eucgr.G03362.2	carotenoid cleavage dioxygenase 1	*			
	Eucgr.I01041.2	sinapoylglucose 1	*			
	Eucgr.I01959.2	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	*			
	Eucgr.K03601.1	peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3	*			
	Eucgr.J03051.1	Single hybrid motif superfamily protein	*			
	Eucgr.D00629.1	thioredoxin family protein	*			
	Eucgr.F02299.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	*			
	Eucgr.H04206.2	ILITYHIA	*			
	Eucgr.B01380.1	Alpha-1,4-glucan-protein synthase family protein	*			
	Eucgr.F00742.1	HIS HF	*			
	Eucgr.E01246.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	*			
	Eucgr.H00092.2	potassium channel beta subunit 1	*			
	Eucgr.C03953.2	ATP binding	*			
	Eucgr.K01196.1	rhamnose biosynthesis 1	*			
	Eucgr.F03661.5	ubiquitin family protein	*			
	Eucgr.K01190.1	Amidase family protein	*			
	Eucgr.F00026.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	*			
	Eucgr.K01051.1	DOMON domain-containing protein / dopamine beta-monooxygenase N-terminal domain-containing protein	*			
	Eucgr.D02530.1	DNAJ homologue 2	*			
	Eucgr.H03409.1	ATP synthase subunit beta	*			
	Eucgr.H04089.1	calcium-dependent lipid-binding family protein	*			
	Eucgr.A02676.1	plastidic pyruvate kinase beta subunit 1	*			
	Eucgr.H03606.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein		*		

Tabela 3 – Proteínas encontradas em uma única condição. Estão indicadas a condição, número de acesso no Phytozome (*Eucalyptus grandis*), identificação e período de coleta em que a proteína foi encontrada (continuação)

Condição	Número de acesso da proteína	Proteína	Tempo (hpi)			
			6	12	18	24
Resistente Inoculado	Eucgr.E03189.1	heat shock cognate protein 70-1		*		
	Eucgr.C01900.1	UDP-glucosyl transferase 88A1		*		
	Eucgr.L01372.1	Zinc-binding dehydrogenase family protein		*		
	Eucgr.J01387.1	SPIRAL1-like1		*		
	Eucgr.F01221.1	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein		*		
	Eucgr.F01883.4	gamma carbonic anhydrase 1		*		
	Eucgr.F04458.1	mercaptopyruvate sulfurtransferase 1		*		
	Eucgr.A01683.3	thylakoid lumen 15.0 kDa protein		*		
	Eucgr.J01663.1	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5		*		
	Eucgr.I02169.1	regulatory particle triple-A 1A		*		
	Eucgr.J01253.2	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein		*		
	Eucgr.H03220.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase		*		
	Eucgr.E01881.2	myo-inositol monophosphatase like 1		*		
	Eucgr.H03281.1	importin alpha isoform 1		*		
	Eucgr.J02955.1	AMP-dependent synthetase and ligase family protein		*		
	Eucgr.J01142.2	glutathione transferase lambda 2		*		
	Eucgr.C00638.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit, mitochondrial		*		
	Eucgr.K01360.1	Aldolase-type TIM barrel family protein		*		
	Eucgr.H04490.1	glycoside hydrolase family 2 protein		*		
	Eucgr.G00417.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein		*		
	Eucgr.F02173.1	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein		*		
	Eucgr.G01798.1	mitochondrial editing factor 9		*		
	Eucgr.B02118.3	GDP-D-mannose 3\',5\'-epimerase			*	
	Eucgr.H04047.1	DNA-binding enhancer protein-related			*	
	Eucgr.F01173.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein			*	
	Eucgr.F01378.2	Chalcone-flavanone isomerase family protein			*	
	Eucgr.L03163.1	O-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL) isoform A1			*	
	Eucgr.H00143.2	ATP citrate lyase (ACL) family protein			*	
	Eucgr.J00164.2	biotin/lipoyl attachment domain-containing protein			*	
	Eucgr.B02642.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein			*	
	Eucgr.G02737.6	binding to TOMV RNA 1L (long form)			*	
	Eucgr.B03930.1	copper/zinc superoxide dismutase 2				*
	Eucgr.L02175.1	glutamine synthetase 2				*
	Eucgr.I02418.1	pyrophosphorylase 1				*
	Eucgr.I00659.1	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 6				*
	Eucgr.K02968.1	Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate decarboxylase family protein				*
	Eucgr.J00325.1	alpha-galactosidase 1				*
	Eucgr.B01266.3	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein				*
	Eucgr.C00803.1	aleurain-like protease				*
	Eucgr.L02460.1	Peroxidase superfamily protein				*

Tabela 3 – Proteínas encontradas em uma única condição. Estão indicadas a condição, número de acesso no Phytozome (*Eucalyptus grandis*), identificação e período de coleta em que a proteína foi encontrada (continuação)

Condição	Número de acesso da proteína	Proteína	Tempo (hpi)			
			6	12	18	24
Resistente Inoculado	Eucgr.H02477.1	Melibiase family protein				*
	Eucgr.C01003.1	NADP-malic enzyme 3				*
	Eucgr.D01707.1	ARM repeat superfamily protein				*
	Eucgr.A01109.3	aspartic proteinase A1				*
	Eucgr.A00911.1	cytochrome P450, family 97, subfamily B, polypeptide 3				*
	Eucgr.F03633.1	Insulinase (Peptidase family M16) family protein				*
	Eucgr.G03242.1	uridine 5\'-monophosphate synthase / UMP synthase (PYRE-F) (UMPS)				*
	Eucgr.E01261.1	Phosphoribulokinase	*	*		
	Eucgr.B01163.1	glutamine synthetase 2	*	*		
	Eucgr.B03593.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	*	*		
	Eucgr.F03916.2	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	*	*		
	Eucgr.A01044.1	HEAT SHOCK PROTEIN 89.1	*	*		
	Eucgr.E01071.1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha	*	*		
	Eucgr.J01052.1	carboxyesterase 20	*	*		
	Eucgr.A02908.3	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein			*	*
	Eucgr.J02556.1	Translation initiation factor IF6	*		*	
	Eucgr.F03307.1	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	*		*	
	Eucgr.H04787.1	annexin 2	*		*	*
	Eucgr.F01221.4	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	*			*
	Eucgr.H02913.2	isopropyl malate isomerase large subunit 1		*		*
Susceptível Inoculado	Eucgr.B02864.2	Aldolase superfamily protein	*			
	Eucgr.L00600.1	ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	*			
	Eucgr.I02018.2	voltage dependent anion channel 1	*			
	Eucgr.A01929.1	ribosomal protein large subunit 16A	*			
	Eucgr.C03704.2	Insulinase (Peptidase family M16) protein	*			
	Eucgr.H01253.1	20S proteasome beta subunit G1	*			
	Eucgr.K03171.2	diaminopimelate epimerase family protein	*			
	Eucgr.B03803.1	methyl-CPG-binding domain 11	*			
	Eucgr.G03362.1	carotenoid cleavage dioxygenase 1	*			
	Eucgr.H00462.1	translation initiation factor 3 subunit H1	*			
	Eucgr.C03995.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	*			
	Eucgr.A00344.1	secretion-associated RAS super family 2	*			
	Eucgr.K01283.2	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily		*		
	Eucgr.J00008.3	triosephosphate isomerase		*		
	Eucgr.B02755.3	high cyclic electron flow 1		*		
	Eucgr.G02764.1	dehydroascorbate reductase 2		*		
	Eucgr.C00769.1	sucrose synthase 4		*		
	Eucgr.H00243.2	Clp ATPase		*		
	Eucgr.J02836.1	ATPases;nucleotide binding;ATP binding;nucleoside-triphosphatases;transcription factor binding		*		
	Eucgr.E03410.4	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein		*		

Tabela 3 – Proteínas encontradas em uma única condição. Estão indicadas a condição, número de acesso no Phytozome (*Eucalyptus grandis*), identificação e período de coleta em que a proteína foi encontrada (conclusão)

Condição	Número de acesso da proteína	Proteína	Tempo (hpi)			
			6	12	18	24
Susceptível Inoculado	Eucgr.G00401.1	cleavage and polyadenylation specificity factor 73-I		*		
	Eucgr.B01777.5	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein			*	
	Eucgr.B03930.4	copper/zinc superoxide dismutase 2			*	
	Eucgr.H01876.1	Zinc-binding dehydrogenase family protein			*	
	Eucgr.L01136.3	pyruvate decarboxylase-2			*	
	Eucgr.D02357.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein			*	
	Eucgr.A00739.3	elongation factor P (EF-P) family protein			*	
	Eucgr.A02178.2	alpha-L-arabinofuranosidase 1			*	
	Eucgr.I01982.1	casein lytic proteinase B3			*	
	Eucgr.A02097.2	glutamate dehydrogenase 1			*	
	Eucgr.H02737.2	Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein			*	
	Eucgr.H03316.5	Galactose mutarotase-like superfamily protein			*	
	Eucgr.H00026.1	glycine-rich RNA-binding protein 4			*	
	Eucgr.I00205.1	NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex subunit O			*	
	Eucgr.A00084.1	ribosomal protein S15A			*	
	Eucgr.G03401.1	Ribosomal protein L6 family protein			*	
	Eucgr.H03028.2	Ribosomal protein L14				*
	Eucgr.E03917.2	Inositol monophosphatase family protein				*
	Eucgr.F02260.3	adenine phosphoribosyl transferase 1				*
	Eucgr.I02673.1	Peroxidase superfamily protein				*
	Eucgr.I01492.1	Alanyl-tRNA synthetase, class IIc				*
	Eucgr.E01170.4	Pectinacetylesterase family protein				*
	Eucgr.B01189.1	methionine sulfoxide reductase B 2				*
	Eucgr.F02035.1	Uncharacterised protein family (UPF0172)				*
	Eucgr.F02483.2	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein				*
	Eucgr.H01195.2	Peptide chain release factor 1				*
	Eucgr.B03692.1	Photosystem II 5 kD protein				*
	Eucgr.K03247.1	Ribosomal protein L11 family protein	*		*	
	Eucgr.F02744.5	alcohol dehydrogenase 1		*	*	

Dentre as proteínas unicamente encontradas nas plantas Resistentes inoculadas e, portanto, sob ataque do patógeno, destacam-se *heat shock protein 90.1, ilityhia* no período 6hpi; *NB-ARC domain-containing disease resistance protein* no período 12hpi; *copper/zinc superoxid dismutase 2, peroxidase superfamily protein* no período 24hpi. Essas proteínas são apenas 5 das 81 encontradas somente no genótipo Resistente Inoculado. Elas estão diretamente relacionadas à estresse, sendo uma delas uma proteína R (*NB-ARC domain-containing disease resistance protein*) e outra diretamente relacionada a resistência mediada por proteína R (*heat shock protein 90.1*). A proteína *ilityhia* está relacionada à imunidade de

plantas e à resposta sistêmica adquirida e as duas proteínas que ocorrem 24hpi estão relacionadas ao estresse oxidativo.

Algumas das proteínas exclusivamente encontradas nas plantas Susceptíveis inoculadas foram *ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1* no período 6hpi; às 12hpi foram encontradas *sucrose synthase 4* e *high cyclic electron flow 1;* e no período de 24hpi foram encontradas *Pectinacetylesterase family protein* e uma *Peroxidase superfamily protein*. As proteínas *ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1* (6hpi) e *sucrose synthase 4* (12hpi) são responsáveis pela produção de carboidratos. No período de 24 horas pós-inoculação são encontrados uma *Peroxidase superfamily protein*, indicando que a planta tenta controlar espécies reativas de oxigênio e uma *Pectinacetylesterase family protein*, que pode ter função no afrouxamento da parede celular das células vegetais, a fim de facilitar a absorção de nutrientes na interface entre planta e patógeno.

4.3.5 Cálculo de expressão diferencial das proteínas comuns e separação por GO termos e palavras chave

Novecentos e trinta e cinco proteínas foram encontradas tanto nas plantas Resistentes como Susceptíveis. Abaixo segue a tabela do total de proteínas com abundância diferencial (Tabela 4). Nela é possível observar que em todos os tempos das plantas Resistentes existem mais proteínas com abundância aumentada do que diminuída, porém quando se analisa as proteínas das plantas Susceptíveis o inverso é observado, com mais proteínas com abundância diminuída do que aumentada.

Tabela 4 - Número de proteínas com abundância diferencial nos dois genótipos de *E. grandis*, 6, 12, 18 e 24 horas pós-inoculação

	Proteínas com abundância diferencial							
Genótipo	6hpi		12hpi		18hpi		24hpi	
	Up	*Down*	*Up*	*Down*	*Up*	*Down*	*Up*	*Down*
Resistente	203	156	187	150	191	132	216	175
Susceptível	192	196	124	317	171	177	168	206

Pela dificuldade de se trabalhar com o volume de dados gerado optou-se por separar as proteínas por termos de ontologia gênica (*GO terms*) e palavras chaves. Foram escolhidos os seguintes temas para agrupamento de proteínas, incluindo livremente mais de um termo de ontologia gênica: resposta imune / estresse, energia e parede celular / produção de carboidratos. As proteínas separadas no agrupamento resposta imune / estresse estão catalogadas no Anexo B (Tabela 10); as proteínas separadas no agrupamento energia estão

catalogadas no Anexo C (Tabela 11) e as proteínas separadas no agrupamento parede celular / produção de carboidratos estão catalogadas no Anexo D (Tabela 12). Essa separação foi feita a fim de facilitar a visualização e procura de proteínas relacionadas ao mesmo processo biológico.

Para proteínas comuns com comportamento interessante foram criados gráficos comparativos dos genótipos Resistente e Susceptível com o objetivo de se avaliar a resposta da mesma proteína tanto no genótipo incompatível (Resistente) como no compatível (Susceptível). A discussão descrita mais à frente, porém, analisa as proteínas como um todo, relacionando-as. Os gráficos podem ser visualizados logo adiante, no ítem “Discussão”.

4.4 Metabolômica - Modo Negativo

Após o alinhamento de picos, deconvolução e *peak peaking* pelo programa MarkerLynx, uma lista de 732 possíveis metabólitos com seus respectivos *m/z* e tempo de retenção foi gerada, compreendendo as amostras controle e inoculadas dos dois genótipos, em todos os tempos de coleta (0, 6, 12, 18, 24 e 72 horas pós inoculação). A fim de eliminar falso-positivos, íons que possuíam valor zero em mais de 50% das amostras dentro de cada grupo tiveram valores zerados para todas as amostras dentro do grupo. Dessa forma, foram eliminados 214 falso-positivos da análise por estarem com valores zerados em todas as amostras, e somente os 518 restantes foram utilizados para as análises seguintes.

Os dados foram submetidos a análises multivariadas de PCA (Análise de componentes principais) e PLS-DA (análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais) pelo programa Metaboanalyst (XIA et al., 2015). A PCA é uma análise não supervisionada e, portanto, não exige conhecimento a priori de quais grupos serão analisados. Ela permite a observação da tendência de separação/formação de grupos nas amostras analisadas e permite também que amostras discrepantes (*outliers*) sejam identificadas (SENGUPTA et al., 2011). Já a PLS-DA é um método de regressão linear supervisionado, que permite a classificação ou agrupamento (*clustering*) das amostras, e é utilizada para determinar quais são as variáveis responsáveis por predizerem as classes (grupos formados), explicando assim a variabilidade entre os dados (RUBINGH et al., 2006). O modelo de OPLS-DA é julgado utilizando-se dois parâmetros. R^2 é a variação total explicada nos dados e Q^2 explica a extensão de separação entre duas classes, assim como a previsibilidade do modelo (SENGUPTA et al., 2011).

Todos os dados foram analisados conjuntamente por meio de um PCA, obtendo-se uma visão ampla da separação entre as condições experimentais produzida em função das variáveis presentes em cada condição (Figura 19).

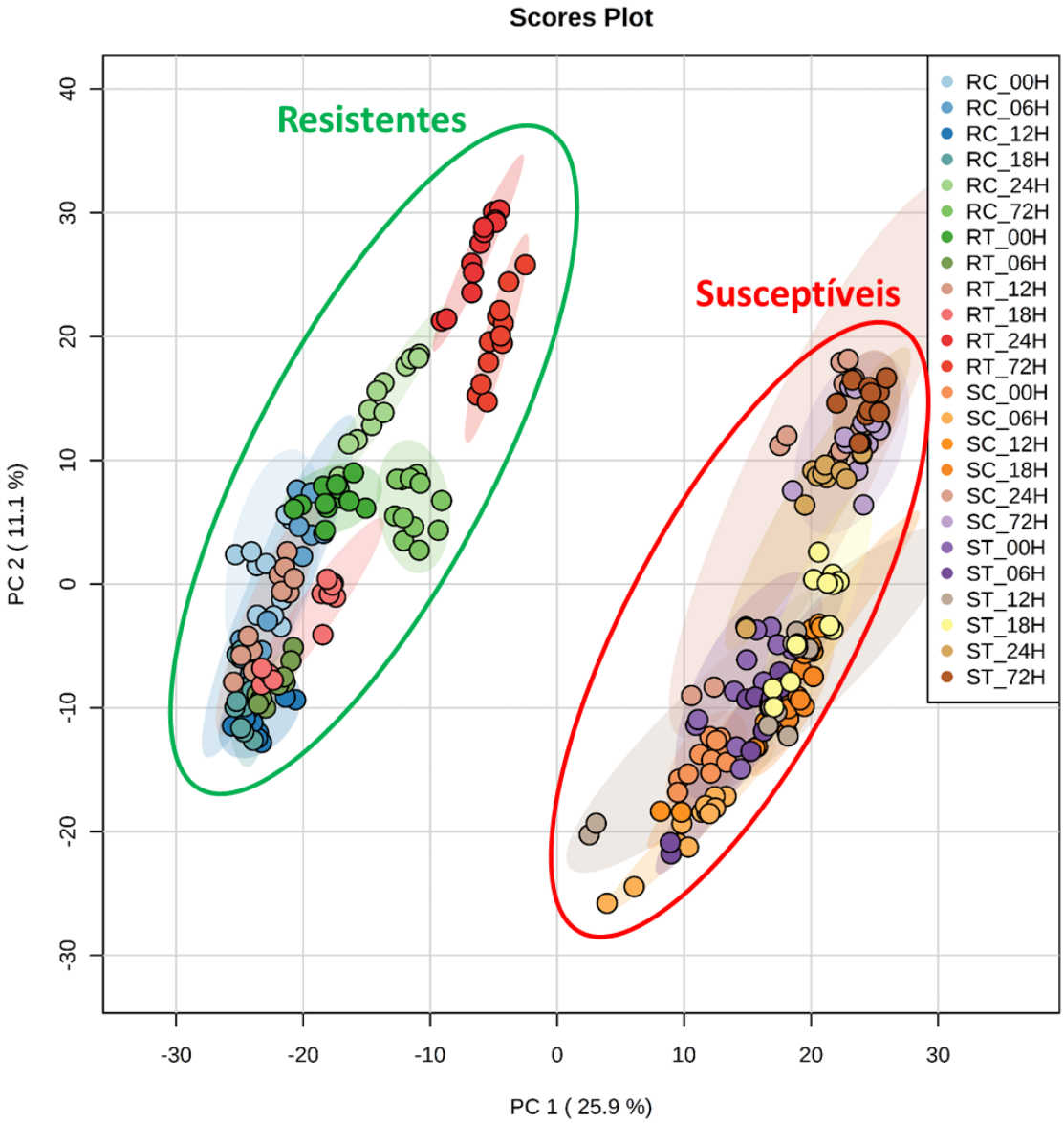


Figura 19 - PCA contendo as amostras de pré inoculação (0h) e de 6, 12, 18, 24, 72 horas pós inoculação em ambos os genótipos. **RC** - Resistente controle (falso-inoculado). **RT** – Resistente tratamento (inoculado). **SC** – Susceptível controle (falso-inoculado). **ST** – Suscetível tratamento (inoculado)

4.4.1 Procura por fitoanticipinas

Supondo-se que as plantas Resistentes possam apresentar diferentes moléculas pré-formadas na composição das folhas que conferem proteção contra o ataque de *P. psidii* ou outros microorganismos não patogênicos, buscou-se nesse genótipo fitoanticipinas, a fim de encontrar metabólitos presentes nas plantas que dificultam o sucesso do fungo durante a infecção.

Os dados de metabolômica dos genótipos Resistente e Susceptível no período de 0hpi foram comparados por análise de PLS-DA (Figura 20). Nesse caso, como ainda não havia sido estabelecida a condição de inoculação ou falsa inoculação, comparou-se exclusivamente a condição genótipo e, portanto, havia 12 repetições biológicas de cada condição experimental

somadas a duas repetições técnicas (total de 24 repetições). A soma dos compontes é igual a 50,4%, evidenciando o contraste inato entre os dois genótipos.

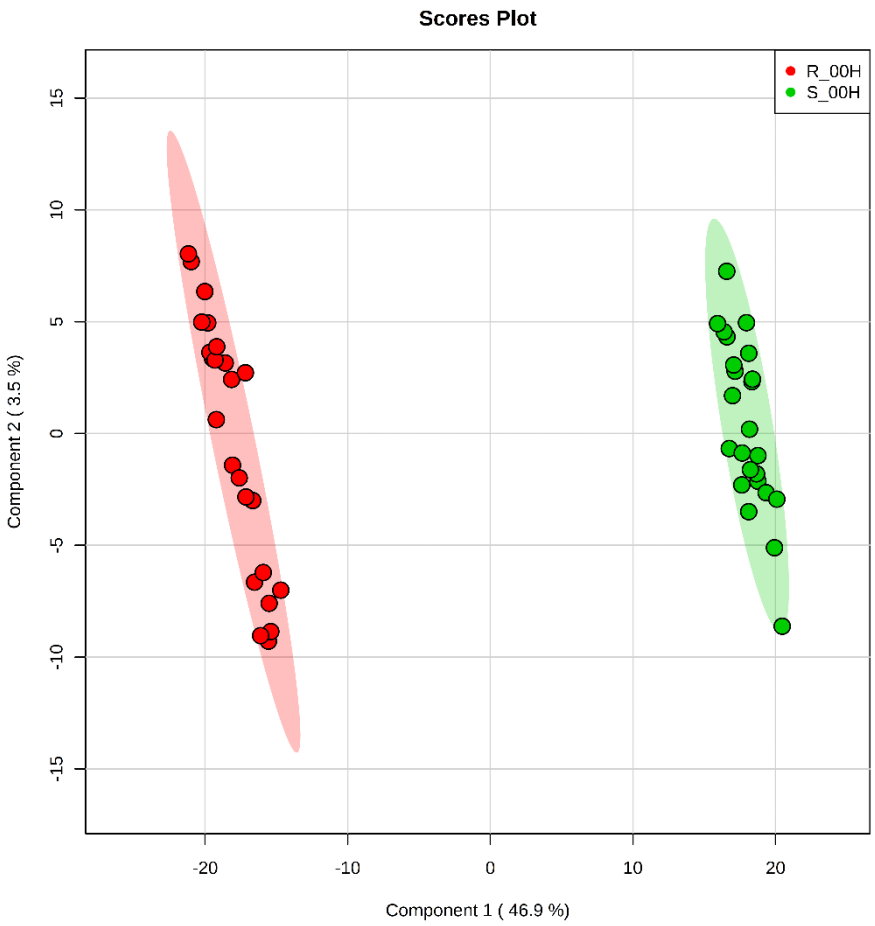


Figura 20 - Gráfico de PLS-DA compreendendo os genótipos Resistente e Susceptível antes da inoculação pelo patógeno. Os parâmetros estatísticos do modelo criado são R^2=0,991; Q^2=0,988

Uma das opções de análise que podem ser feitas após a geração do PLS-DA é a procura pelas variáveis que mais contribuíram para a separação dos grupos comparados. Essa análise de VIPs (*Variable Importance in the Projection*) foi utilizada e confirmada por *teste t*, para a escolha das moléculas a serem fragmentadas pelo método MS/MS. Observando-se a exclusividade dos metabólitos no tratamento resistente, ou sua presença entre os íons mais importantes na projeção de PLS-DA, dezessete metabólitos putativos (*m/z*) foram selecionados para serem fragmentados e terem suas estruturas elucidadas. Eles estão destacados na figura a seguir (Figura 21).

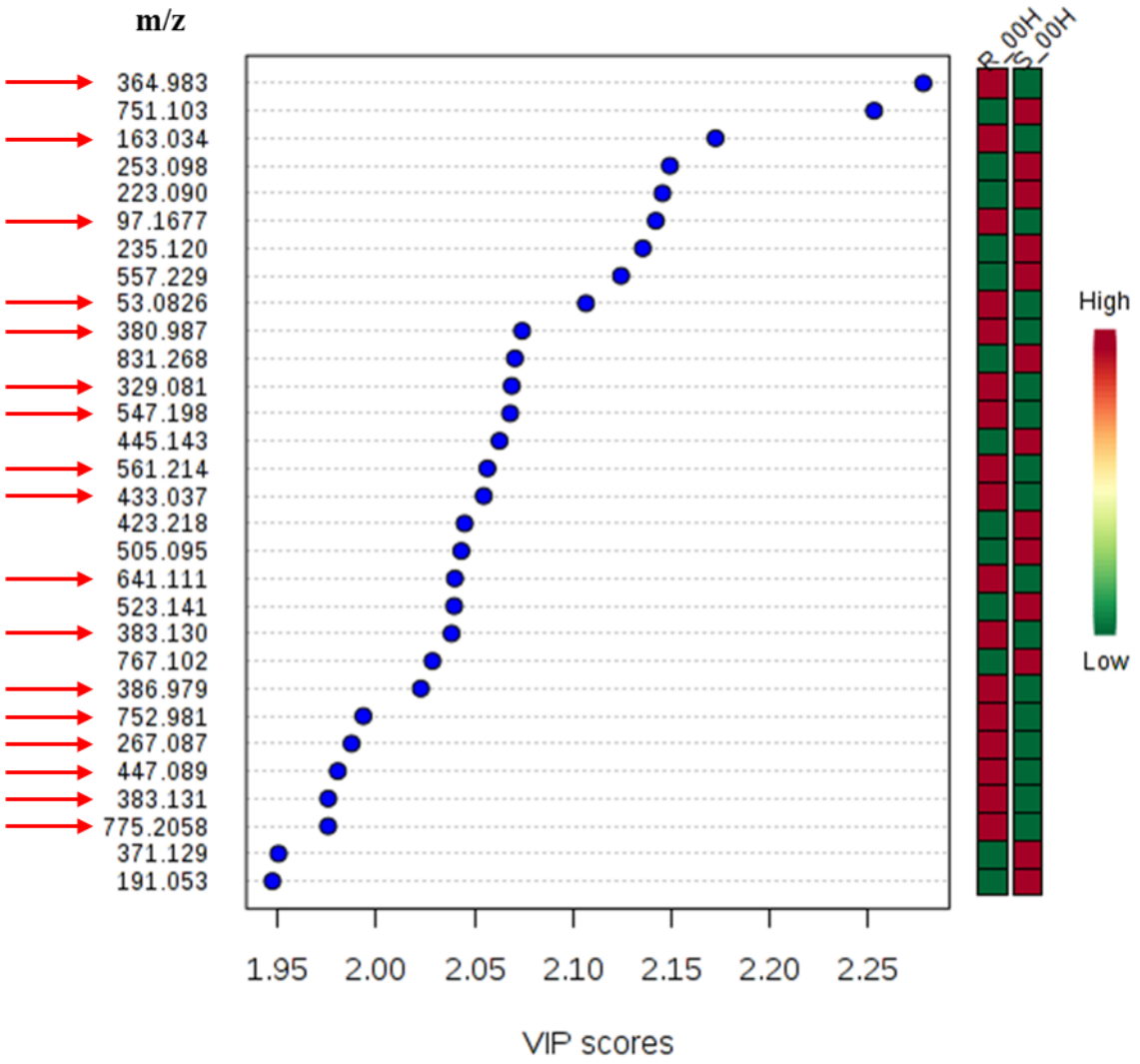


Figura 21 - Variáveis que mais contribuíram para a separação dos grupos Resistente e Susceptível. As setas vermelhas destacam os íons (*m/z*) escolhidos para a técnica de fragmentação e possível identificação. Eles são mais intensos ou somente foram detectados no genótipo Resistente

Após a fragmentação dos metabólitos selecionados, os *m/z* dos íons precursores foram buscados no banco de dados METLIN, ajustado para o modo negativo e com limite de erro de até 100 ppm. As estruturas que se encaixaram dentro dos perfis procurados foram importadas e fragmentadas teoricamente pelo programa ACD/MS Structure ID suite (ACD/Labs, Toronto, Canadá). Essas fragmentações foram comparadas com os espectros reais gerados pela técnica de MS/MS e as correspondências foram avaliadas a fim de determinar se os fragmentos eram equivalentes. A partir dessa análise foram identificadas 3 moléculas: Tyrosyl-Serine, 4,6'-Dihydroxy-2',3',4'-trimethoxychalcone e Allithiamine (Tabela 5). Os espectros de fragmentação dessas moléculas são apresentados no Anexo A.

Tabela 5 - Moléculas candidatas a fitoanticipinas, encontradas exclusivamente nas plantas Resistentes antes da inoculação por *P. psidii*

Condição	*m/z* do precursor ionizado	Molécula identificada	Erro de massa (ppm)	Massa da molécula identificada	Banco de dados	Classe
Resistente pré inoculação	267.1027	Tyrosyl-Serine	15	268.1059	HMDB	Dipeptídeo
	329.0963	4,6'-Dihydroxy-2',3',4'-trimethoxychalcone	20	330.11.03	LMID	Flavonóide
	353.1076	Allithiamine	10	354.1184	HMDB	Diazina

4.4.2 Procura por moléculas produzidas após a inoculação com o patógeno (fitoalexinas)

Além de procurar por fitoanticipinas, objetivou-se também procurar por metabólitos secundários produzidos após o contato da planta com o patógeno. Para esse estudo as amostras inoculadas foram comparadas aos seus controles falso-inoculados por meio de análises de PLS-DA (Figuras 22 e 23). Com os gráficos gerados é possível observar a mudança que a presença do patógeno causa no perfil metabólico das plantas. Possíveis metabólitos apontados como VIP’s nas plantas Resistentes inoculadas e não detectados nas plantas Susceptíveis (Tabela 6) foram selecionados para fragmentação e identificação pelos mesmos critérios usados no item anterior (item 4.4.1). O mesmo foi feito para possíveis metabólitos detectados nas plantas Susceptíveis inoculadas e ausentes nas plantas Resistentes (Tabela 7). Uma lista com os 11 metabólitos identificados pode ser vista na Tabela 8, com seus respectivos genótipos, horários, informações de identificação e classificação. Os espectros de fragmentação dessas moléculas são demonstrados no Anexo A.

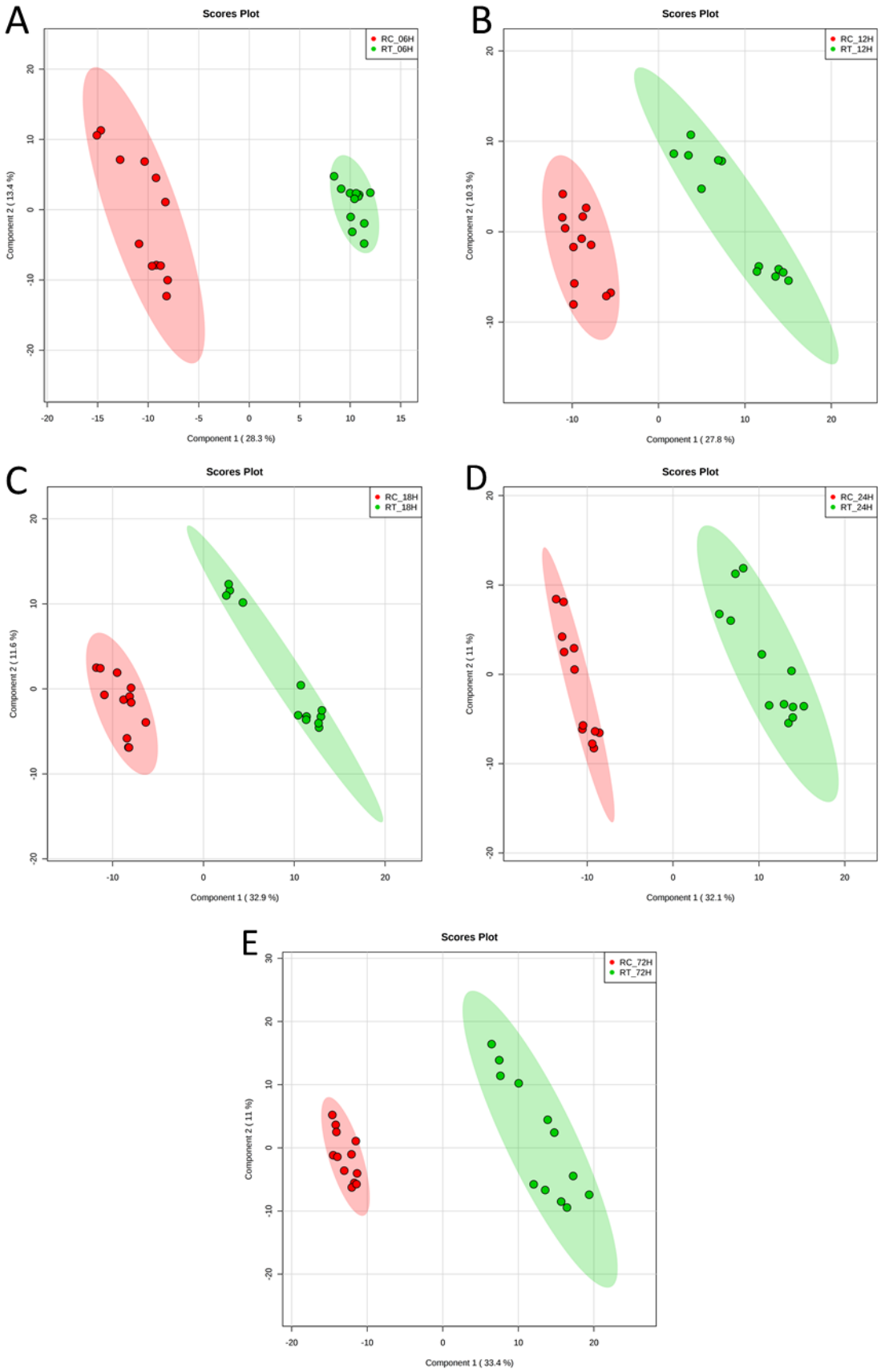


Figura 22 - PLS-DA's das comparações entre plantas inoculadas e seus controles nas plantas Resistentes. Os parâmetros estatísticos dos modelos estão descritos a seguir. **A)** 6 hpi (R^2=0,971; Q^2=0,932); **B)** 12hpi (R^2=0,868; Q^2=0,766); **C)** 18hpi (R^2=0,888; Q^2=0,805); **D)** 24hpi (R^2=0,948; Q^2=0,901); **E)** 72hpi (R^2=0,949; Q^2=0,903)

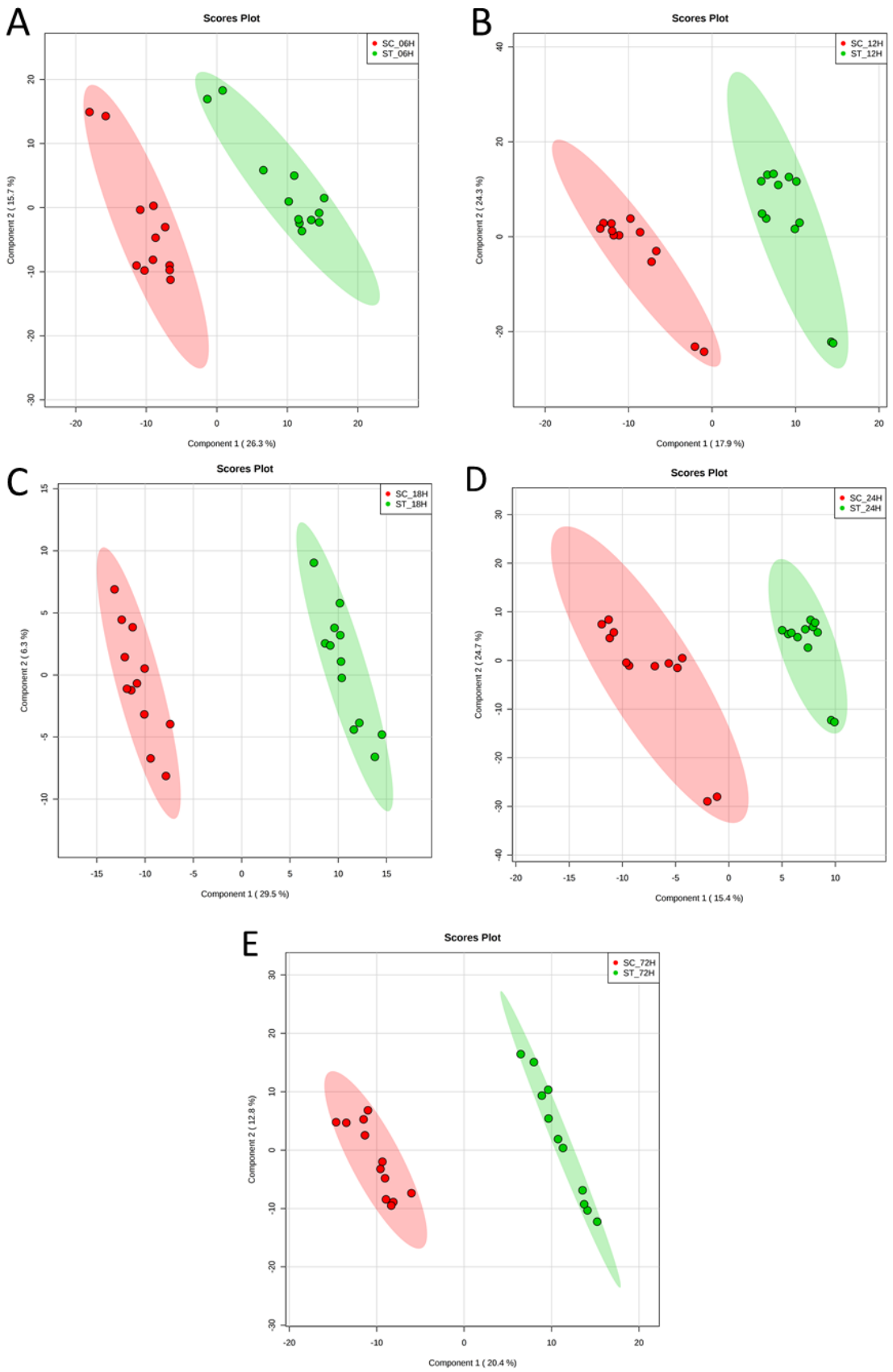


Figura 23 - PLS-DA's das comparações entre plantas inoculadas e seus controles nas plantas Susceptíveis. Os parâmetros estatísticos dos modelos estão descritos a seguir. **A)** 6 hpi (R^2=0,839; Q^2=0,75); **B)** 12hpi (R^2=0,873; Q^2=0,706); **C)** 18hpi (R^2=0,971; Q^2=0,944); **D)** 24hpi (R^2=0,878; Q^2=0,581); **E)** 72hpi (R^2=0,947; Q^2=0,0,872)

Tabela 6 - *m/z* detectados exclusivamente nas plantas Resistentes inoculadas selecionados para fragmentação por MS/MS. Não foram encontrados *m/z* detectados em 12hpi ausentes nas plantas Susceptíveis

m/z	***Fold Change*** **R_06hpi**	***Fold Change*** **R_12hpi**	***Fold Change*** **R_18hpi**	***Fold Change*** **R_24hpi**	***Fold Change*** **R_72hpi**
476.056	7.4441	-	-	-	-
551.004	7.7138	-	-	-	-
777.274	8.4837	-	-	-	-
963.159	-	-	6.1257	-	-
547.201	-	-	6.2145	-	-
761.093	-	-	-	4.9996	-
893.219	-	-	-	6.6167	-
877.240	-	-	-	6.6087	-
784.983	-	-	-	4.8769	-
253.071	-	-	-	6.0669	-
649.174	-	-	-	4.7041	-
297.099	-	-	-	5.9173	-
557.168	-	-	-	5.7369	-
535.253	-	-	-	5.2986	-
537.198	-	-	-	5.3122	-
683.156	-	-	-	5.7268	-
285.057	-	-	-	-	8.4314
845.082	-	-	-	-	8.495
466.024	-	-	-	-	7.8375
965.086	-	-	-	-	7.6978
447.094	-	-	-	-	7.7119
603.094	-	-	-	-	8.1392
435.090	-	-	-	-	7.2319
757.237	-	-	-	-	7.1425
759.140	-	-	-	5.3493	7.2615
449.270	-	-	-	5.1566	7.4876

Tabela 7 - m/z encontrados exclusivamente nas plantas Susceptíveis inoculadas selecionados para fragmentação por MS/MS. Não foram encontrados m/z detectados em 06hpi e ausentes nas plantas Resistentes

m/z	***Fold Change*** **S_06hpi**	***Fold Change*** **S_12hpi**	***Fold Change*** **S_18hpi**	***Fold Change*** **S_24hpi**	***Fold Change*** **S_72hpi**
783.3	-	1.2509	-	-	-
539.228	-	11.048	-	-	-
811.334	-	10.477	-	-	-
797.318	-	10.957	-	-	-
828.253	-	-	-	6.397	-
655.255	-	-	-	8.2649	-
657.271	-	-	-	6.7868	-
481.096	-	-	-	-	9.3693
483.078	-	-	-	-	9.527
479.030	-	-	-	-	10.453
886.530	-	-	-	-	10.544
467.029	-	-	-	-	1.1528
477.100	-	-	-	-	9.9247
993.028	-	-	-	-	10.052
695.396	-	-	-	-	10.561
885.168	-	-	-	-	10.21
253.104	-	-	8.0221	7.3958	-

Tabela 8 - Identificação e caracterização de metabólitos encontrados em plantas inoculadas com *P. psidii*

Condição	***m/z* do precursor ionizado**	**Molécula identificada**	**Erro de massa (ppm)**	**Massa da molécula identificada**	**Banco de dados**	**Classe**
Resistente 24h	253.1107	L-Furosine	34	254.1267	HMDB	Ácido orgânico
	537.2724	PG(20:1(11Z)/0:0)	88	538.3271	LMID	Glicerofosfoglicerol
	557.2949	PI(15:0/0:0)	38	558.2805	LMID	Glicerofosfoinositol
	877.4591	PI(18 3(6Z,9Z,12Z) 20 5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	32	878.4945	LMID	Glicerofosfoinositol
	893.4359	PI(17:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	92	894.5258	LMID	Glicerofosfoinositol
Resistente 72h	285.0914	2',6',beta-Trihydroxy-4'-methoxychalcone	51	286.0841	LMID	Flavonóide
	447.1358	Androechin	13	448.1369	LMID	Flavonóide
Susceptível 24h	253.1331	Histidinyl-Valine	9	254.1379	HMDB	Ácido Carboxílico
Susceptível 72h	477.1391	Lindleyin	2	478.1475	HMDB	Ácido Graxo
	695.4024	PA(18 3(9Z,12Z,15Z) 18 1(9Z))	91	696.473	LMID	Glicerofosfato

PG= *Phosphatidylglycerol*; PI= *Phosphatidylinositol*; PA= *Phosphatidic acid*

5 DISCUSSÃO

5.1 Proteômica

Com a idéia de estudar uma espécie com ciclo de vida longo sob a infecção de um patógeno, escolheu-se o par *Eucalyptus grandis* X *Puccinia psidii*, sendo o primeiro representante do gênero florestal mais plantado no mundo e de cultura altamente disseminada no Brasil para a produção de uma série de *commodities*, e o segundo uma importante doença que aflige não somente essa espécie florestal, mas também outras plantas pertencentes ao mesmo grupo das mirtáceas.

A resistência do *E. grandis* e seus híbridos à *P. psidii* vem sendo explorada para a obtenção de genótipos superiores desde que a doença se mostrou um problema nas plantações comerciais há mais de 70 anos (JOFFILY, 1944), e alguns poucos trabalhos moleculares objetivaram buscar as bases de resistência dessa espécie contra o patógeno (JUNGHANS et al., 2003; MOON et al., 2007; LEITE, 2012). No trabalho de Leite (2012) criou-se um sistema modelo para o estudo da ferrugem, do qual a presente tese é continuação, e o conhecimento gerado naquele estudo somado à publicação do genoma do *E. grandis* em 2014 (MYBURG et al., 2014) fornecem bases sólidas para as análises de proteômica e metabolômica discutidas neste trabalho.

5.1.1 Proteínas encontradas em apenas uma condição

Algumas proteínas identificadas no estudo de proteômica foram detectadas e quantificadas em apenas uma condição experimental, em um ou mais tempos de coleta pós-inoculação com o patógeno e, portanto, foram catalogadas e analisadas isoladamente.

Observando-se as proteínas encontradas somente nas plantas Resistentes (R) inoculadas, e portanto não identificadas nas Resistentes controle ou Susceptíveis, estão presentes as proteínas *heat shock protein 90.1* (HSP90 - Eucgr.A02734.2) e *ILITYHIA* (ILA - Eucgr.H04206.2) às 6hpi e a proteína R *NB-ARC domain-containing disease resistance protein* (Eucgr.G00417.1) no período 12hpi. Takahashi et al. (2003) foram os primeiros a proporem a importância da chaperona HSP90 na resistência de *Arabidopsis thaliana* contra *Pseudomonas syringae*, funcionando conjuntamente às proteínas RAR1 e SGT1 no processo de resistência desencadeado por uma série de genes R. Essa proteína está envolvida na maturação, estabilização e ativação de proteínas chave em eucariotos, como sinalizadoras, receptores de hormônios e fatores de transcrição, tendo proteínas ligadas à imunidade como principais alvos (KADOTA; SHIRASU, 2012). A produção dessa proteína é induzida quando a planta é desafiada pelo patógeno e a mutação de seu gene codante leva a perda de resistência

da planta contra o patógeno e a resposta de hipersensibilidade é atenuada. A importância dessa proteína também foi levantada por Botër et al. (2007), sendo sua presença necessária para o acúmulo da proteína Rx, proteína R de batata (*Solanum tuberosum*), e por Rani et al. (2015), que descreveram produção diferencial de HSP90 durante a interação de não-hospedeiro entre *Citrus sinensis* e *Xanthomonas oryzae*.

A participação da proteína *ILITYHIA* na resposta de defesa contra patógenos foi levantada mais recentemente, em 2010 por Monaghan e Li. Sendo cunhada em homenagem a deusa grega do nascimento por ter função atribuída à embriogênese, os pesquisadores descobriram que o knockout de seus genes em *A. thaliana* levam à maior susceptibilidade à *P. syringae*, postulando sua importância na defesa basal do hospedeiro e seu requerimento na defesa mediada por genes R.

A detecção das proteínas HSP90 e ILITYHIA no período de 6hpi indica que os clones de *E. grandis* Resistentes inoculados percebem a presença do patógeno mesmo antes de sua penetração, que só ocorre a partir do período de 12hpi, com o desenvolvimento da hifa de penetração (LEITE, 2012). Não é claro se esse reconhecimento é feito por receptores de padrões moleculares ou pela detecção de efetores liberados pelos patógenos, mas sugere-se que no primeiro momento de estudo a planta lança mão da estratégia de PTI (imunidade desencadeada pela percepção de padrão molecular), preparando-se para uma possível infecção por um microrganismo virulento. Essa sugestão é feita, pois em um segundo momento (12hpi) o hospedeiro produz uma maior quantidade da proteína *NB-ARC domain-containing disease resistance protein*, representante típica da resistência do tipo ETI (imunidade desencadeada por percepção de efetores), e portanto mais específica, através de proteínas de resistência R. O domínio NB-ARC da proteína é composto por um subdomínio funcional de ATPase e um subdomínio de ligação a nucleotídeos, e toda essa estrutura funciona como um interruptor. Dependendo de sua conformação o estado de ativação de toda a proteína R é definido (OOIJEN et al., 2008). Essa classe de proteína é reconhecidamente um ativador de todo o sistema de defesa da planta, desencadeando reações em cadeia que levam à resistência contra o patógeno através da produção de uma série de metabólitos secundários, modificações celulares, e sinais a serem emanados a outras regiões do hospedeiro (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997). Wen et al. (2015) identificaram uma proteína NB-ARC sendo superexpressa em *Vitis pseudoreticulata* quando infectadas pelo míldio *Erysiphe necator*. Essa proteína foi caracterizada, clonada e usada para transformar *A. thaliana*, reforçando a resistência da planta contra bactérias e fungos fitopatogênicos e mais uma vez apontando sua importância na resposta imune de plantas.

Outras proteínas reguladoras positivas de resposta imune também foram detectadas, como a chaperona HSC70-1 *(heat shock cognate protein 70-1* - Eucgr.E03189.1*)* (12hpi), que é comumente superexpressa em condições estressantes (GOU et al., 2015) e que atua, juntamente com a proteína HSP90, no fechamento de estômatos (CLEMENT et al., 2011), e a proteína HSP89-1 (*heat shock protein 89.1* - Eucgr.A01044.1) (6 e 12hpi), pertencente ao grupo das HSP90. Apesar da *P. psidii* não entrar preferencialmente pelos estômatos da superfície foliar, a planta pode conter o avanço não somente desse basidiomiceto, mas de outros microorganismos oportunistas.

Respostas mais específicas são percebidas nas plantas Resistentes desafiadas pelo patógeno, como a produção de componentes da parede celular, sugerindo que a planta fortalece essa estrutura a fim de dificultar a penetração de organismos estranhos, assim como descrito por Moon et al. (2007) em trabalho com *E. grandis* e *P. psidii*, Rani et al. (2015) em estudo envolvendo *Citrus sinensis* e *Xanthomonas oryzae*, e Liang et al. (2014) em estudo com híbridos de populus e *Septoria musiva*.

A parede celular tem como componentes principais a celulose, hemiceluloses, pectina e lignina (MALINOVSKY; FANGEL; WILLATS, 2014), e uma defesa associada à parede celular, como seu reforço estrutural, pode ser suficiente para deter o avanço do patógeno, eliminando inclusive a necessidade de respostas mais custosas como a resposta de hipersensibilidade (UNDERWOOD, 2012). Foram encontradas as proteínas *Alpha-1,4-glucan-protein synthase family protein* (Eucgr.B01380.1) (papel na produção de celulose) e *rhamnose biosynthesis 1 (*RHM1 - Eucgr.K01196.1 - papel na produção de pectina) no período 6hpi, *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5* (XTH5 - Eucgr.J01663.1 - papel na produção de hemicelulose) no período 12hpi, *GDP-D-mannose 3\',5\'-epimerase* (GME - Eucgr.B02118.3 - provável papel na produção de parede celular não celulósica (GILBERT et al., 2009)) no período 18hpi e *xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 6* (XTH6 - Eucgr.I00659.1 - papel na produção de hemicelulose) no período 24hpi. Como *P. psidii* não tem sucesso depois do período de 18hpi, supõe-se que essa estratégia da planta resistente se mostra promissora. O grande número de proteínas relacionadas à síntese de parede celular detectadas apenas nas plantas Resistentes inoculadas é notável e a reestruturação dessa estrutura em resposta ao ataque de *P. psidii* parece ter um papel essencial na resposta imune de *E. grandis* contra *P. psidii*, determinando a sorte das plantas. Essa resposta é rápida o suficiente para evitar a formação do haustório, estrutura que não foi encontrada nas plantas resistentes em nenhum dos períodos estudados por Leite (2012).

Notou-se também uma modificação no metabolismo energético das plantas, com um número de proteínas relacionadas à glicólise e à hidrólise de carboidratos complexos, indicando um aumento no consumo energético, possivelmente drenado para a resposta imune. É notável a presença das proteínas *phosphofructokinase 3* (PFK3 - Eucgr.C03703.1) e *plastidic pyruvate kinase beta subunit 1* (PKP1 - Eucgr.A02676.1) em 6hpi, *NADP-malic enzyme 3* (NAPDP-ME3 - Eucgr.C01003.1) e *Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate decarboxylase family protein* (PDC1 - Eucgr.K02968.1) em 24hpi, e *pyruvate dehydrogenase E1 alpha* (PDHA1 - Eucgr.E01071.1) em 6 e 12hpi, todas ligadas ao processo da glicólise; *Amidase family protein* (Eucgr.K01190.1) (6hpi), que hidrolisa amido, podendo fornecer substrato para a produção de energia através da glicólise e do ciclo de Krebs ou para a produção de parede celular; e *NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit, mitochondrial* (Eucgr.C00638.1) (12hpi), enzima da cadeia respiratória. Em estudo de proteôma de plantas de caju infectados por *Lasiodiplodia theobromae* (CIPRIANO et al., 2014) a maioria das proteínas reguladas durante o resposta à infecção eram do metabolismo de energia, sugerindo sua importância no processo de imunidade. Foi então postulado no estudo que as mudanças no metabolismo energético estão associadas à alocação de energia requerida durante o processo de defesa. O mesmo foi observado em estudo de transcritoma com *A. thaliana* infectadas por agentes virulentos, avirulentos e elicitores derivados de patógenos (LESS et al., 2011), em que os transcritos associados à produção de energia foram superexpressos, como os relacionados à glicólise, rota da pentose fosfato, ciclo de Krebs, cadeia transportadora de elétrons e biossíntese de ATP. O processo de defesa contra a ferrugem do eucalipto também requer especial fornecimento de energia, vide a quantidade de proteínas relacionadas ao metabolismo energético produzidas durante a infecção.

Quando sob o ataque de microrganismos, as plantas sintetizam uma miríade de compostos secundários que criam um ambiente nocivo para os invasores e entre esses compostos estão terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). UDP-glicosiltranferases atuam na produção e ativação de hormônios vegetais e compostos secundários (LI et al., 2001; ROSS et al., 2001; LANGLOIS-MEURINNE; GACHON; SAINDRENAN, 2005), assim como as lambda glutationa transferases (DIXON; EDWARDS, 2010). Essas duas classes de proteínas também foram identificadas e quantificadas nas plantas Resistentes inoculadas sob as formas *UDP-Glycosyltransferase superfamily protein* (Eucgr.E01246.1) (6hpi), *UDP-glucosyl transferase 88A1* (UGT88A1 - Eucgr.C01900.1) e *glutathione transferase lambda 2* (GSTL2 - Eucgr.J01142.2) (12hpi), podendo gerar compostos capazes de mudar o destino da *P. psidii* na planta. Também foi

identificada uma *Chalcone-flavanone isomerase family protein* (Eucgr.F01378.2) (18hpi), participante da via de produção de flavonoides. Devido à natureza e função dessas proteínas elas podem estar envolvidas na produção dos compostos secundários estudados no presente trabalho, descritos anteriormente e discutidas mais adiante. Os metabólitos identificados possivelmente contribuem com a complexa resposta de defesa contra patógenos.

Por último, nas plantas Resistentes inoculadas foram encontradas proteínas que controlam a resposta oxidativa das plantas, sinal indicativo do sucesso no reconhecimento do patógeno e necessário para a resposta de defesa (APEL; HIRT, 2004; HELLER; TUDZYNSKI, 2011). As proteínas identificadas foram a *copper/zinc superoxide dismutase 2* (SOD2 - Eucgr.B03930.1) e *Peroxidase superfamily protein* (PRX25 - Eucgr.L02460.1), ambas no período de 24hpi, quando não é mais visto o avanço do patógeno nas plantas Resistentes e, portanto, quando a planta se recupera da resposta imune lançada contra *P. psidii*. Essas proteínas agem na destoxificação de ROS, e são sinal de que a plantas têm que lidar com a explosão oxidativa acionada na resposta imune. As espécies reativas de oxigênio não somente agem diretamente contra o microorganismo invasor, mas também estão implicadas na sinalização celular associada à indução da resposta de defesa, HR, reorganização da parede celular, produção de fitoalexinas e deposição de calose. Taxas elevadas de ROS induzem a biossíntese de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, catalase e glutationa S-transferase (O'BRIEN et al., 2012).

Proteínas quantificadas e identificadas exclusivamente nas plantas Susceptíveis inoculadas mostram que esses clones apresentam uma resposta diferente ao serem desafiados pelo patógeno, que acaba levando ao insucesso da resposta imune, subvertida pelo patógeno. No período de 6hpi é encontrada, nas plantas Susceptíveis inoculadas, uma proteína *ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1* (APL1 - Eucgr.L00600.1), subunidade maior da ADP-glucose pirofosforilase, que catalisa o primeiro passo da biossíntese de amido, principal açúcar de reserva das plantas. No período de 12hpi foi encontrada a proteína *sucrose synthase 4* (SUS4 - Eucgr.C00769.1), responsável pela produção do principal carboidrato de transporte de plantas. Essas evidências mostram que a *P. psidii* germina e se ancora à parede foliar (presença de apressório às 6hpi) e inicia a penetração (hifa de penetração às 12hpi) sem que a planta susceptível note a presença dele, já que esses processos metabólicos tendem a diminuir quando a planta detecta com sucesso a presença do patógeno (LESS et al., 2011; ROJAS et al., 2014). A ausência dessas proteínas ou proteínas similares nas plantas Resistentes inoculadas sugere que nelas a produção de carboidratos é minimizada quando um microrganismo é detectado, e a produção de energia através da glicólise, ciclo de Krebs e

respiração direciona essa energia produzida para o estabelecimento da resposta de defesa. Apesar das plantas Susceptíveis produzirem proteínas do metabolismo energético, como a *triosephosphate isomerase* (TPI - Eucgr.J00008.3) (12hpi) e a *pyruvate decarboxylase-2* (PDC2 - Eucgr.L01136.3) (18hpi), a contínua produção das proteínas das vias biossintéticas de carboidratos sugere que esses clones não conseguem detectar a presença do patógeno, ao menos nos primeiros estágios de desenvolvimento do basidiomiceto.

Diferentemente das plantas Resistentes, que indicam fortalecer suas paredes celulares através da produção de proteínas que atuam na biossíntese de celulose, hemicelulose e pectina, as plantas Susceptíveis parecem fazer o contrário. Montes et al. (2008) estudaram modificações nas paredes celulares de órgãos de *A. thaliana* provocadas por alterações no gene codante da enzima *alpha-L-arabinofuranosidase 1* (ARAF1 - Eucgr.A02178.2), que no presente estudo foi identificada e quantificada somente nas plantas Susceptíveis inoculadas no período 18hpi. Neste estudo foi proposto o provável envolvimento dessa enzima na dissolução da matriz da parede celular. Também nas plantas Resistentes foi encontrada uma *Pectinacetylesterase family protein* (PAE - Eucgr.E01170.4) no período 24hpi, que em estudo em *A. thaliana* feito por Vercauteren et al. (2002) tem sua produção modulada por nematoides, que provocam um aumento na produção da proteína e consequentemente afrouxam a parede celular nas raízes das plantas, facilitando sua penetração. Propõe-se então que o patógeno *P. psidii*, a partir das 18hpi, libere efetores que também modulam a reconformação da parede celular controlada pela própria planta, de forma a facilitar sua penetração. Além do hospedeiro não investir no reforço da parede celular ele é levado a desconstruí-la. Essa frente de batalha parece ser a mais importante na interação entre *E. grandis* e *P. psidii*, e o resultado decorrente desse embate define se interação será compatível ou incompatível.

Nos primeiros dois períodos pós-inoculação (6 e 12hpi) há evidências de que as plantas Susceptíveis não detectam o patógeno, mas a partir do terceiro período de estudo observa-se uma mudança no comportamento da planta. Em 18hpi foi encontrada a proteína *copper/zinc superoxide dismutase 2* (SOD2 - Eucgr.B03930.4), diferente da encontrada nas plantas Resistentes, e em 24hpi a *Peroxidase superfamily protein* (PRX71 - Eucgr.I02673.1), ambas exemplares de enzimas destoxificadoras de espécies reativas de oxigênio. Como discutido anteriormente, essas proteínas são indicativos da detecção do patógeno, porém sabe-se que as plantas Susceptíveis são incapazes de empregar resposta imune com êxito. Propõe-se que a partir desse período pós-inoculação a planta perceba a presença do patógeno. Ou sua resposta é tardia ou é insuficiente para frear o avanço de *P. psidii* em seus tecidos foliares.

5.1.2 Análise de proteínas comuns

Como pode ser observado nos resultados descritos no ítem 4.3.5 (Tabelas 4), em todos os períodos pós-inoculação as plantas Resistentes possuem comparativamente um maior número de proteínas *upregulated* (mais abundantes), enquanto as plantas Susceptíveis apresentam um maior número de proteínas *downregulated*. A partir desses dados numéricos é possível ter um vislumbre das diferentes respostas dos genótipos ante o ataque do patógeno. As plantas Resistentes empregam um maior arsenal de moléculas e estratégias para anular o ataque do fungo, enquanto as plantas Susceptíveis diminuem em abundância a maior parte das proteínas, especialmente no período 12hpi, quando o fungo começa a se entremear no tecido vegetal.

A maioria das proteínas identificadas e quantificadas foram encontradas em ambos os genótipos, em plantas inoculadas e falso-inoculadas e em mais de um horário pós-inoculação. Essas proteínas são, portanto, produzidas nas plantas mesmo quando em condições não estressantes, mas variações de concentração nos tecidos infectados por *P. psidii* indicam que elas são tanto moduladas como importantes moduladores da homeostase celular em situação de ataque por patógeno.

*Leucine-rich repeat (*LRR*) family proteins* são proteínas trans-membrana que percebem padrões moleculares de patógenos e desencadeiam resposta de defesa basal conhecida como PTI (*pattern-triggered immunity*) (BOLLER; FELIX, 2009). No presente trabalho, dentre as proteínas quantificadas em mais de uma condição experimental foram encontradas duas *LRR family proteins*, e ambas apresentam comportamentos interessantes (Figura 24). A primeira proteína tem domínio kinase (*LRR protein kinase family protein* - Eucgr.B02903.1) e aumenta em quantidade nas plantas Resistentes inoculadas logo no primeiro momento de estudo (6hpi), voltando a quantidades semelhantes ao controle a partir de 12hpi. A mesma proteína é negativamente regulada nas plantas Susceptíveis inoculadas no período de 12hpi, voltando a quantidades semelhantes ao controle depois deste período. A segunda proteína (*LRR family protein* - Eucgr.B03671.1) é negativamente regulada nas plantas Susceptíveis inoculadas nos períodos 6 e 18hpi e continua constante nas Resistentes inoculadas. Como uma das *LRR family proteins* é positivamente regulada nas plantas Resistentes inoculadas, reforça-se a hipótese que as plantas Resistentes são capazes de detectar a presença de um provável organismo patogênico antes mesmo dele penetrar seu tecido foliar, preparando-se para uma possível invasão aumentando a quantidade de proteínas de “vigilância” responsáveis pelo PTI. As plantas Susceptíveis, entretanto, são possivelmente

ludibriadas, levando à regulação negativa de proteínas de detecção de patógenos, dificultando e prejudicando a percepção de corpos estranhos.

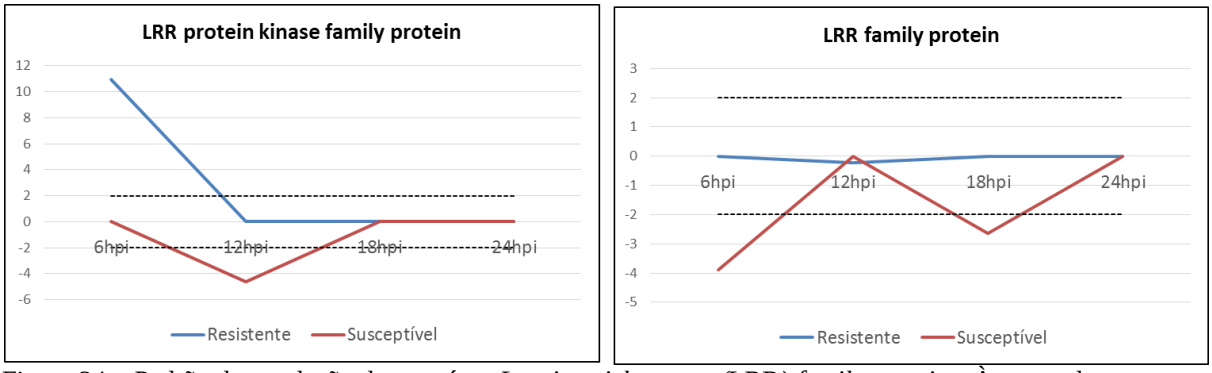


Figura 24 – Padrão de regulação de proteínas *Leucine-rich repeat (*LRR*) family proteins*. À esquerda econtra-se o gráfico de variação da *LRR protein kinase family protein*. À direita encontra-se a *LRR family protein*

Outro sinal de que a estratégia do patógeno é realizada com sucesso nas plantas Susceptíveis é o controle positivo da proteína *Pectin lyase-like superfamily protein* (Eucgr.E00105.1) (Figura 25). Essa proteína é responsável pela reorganização da parece celular, mais especificamente degradando pectina (CAO, 2012). Nas plantas Susceptíveis inoculadas essa proteína é negativamente regulada em 6hpi, mas positivamente regulada em 18hpi, período em que o patógeno já está penetrando no tecido do hospedeiro (LEITE, 2012), e mesmo período em que foi encontrada a proteína *alpha-L-arabinofuranosidase 1*, identificada e quantificada apenas nas plantas Susceptíveis inoculadas. Nas plantas Resistentes, porém, a proteína *Pectin lyase-like superfamily protein* tem produção reprimida de 12 até 24 hpi, e somado à presença das proteínas *Alpha-1,4-glucan-protein synthase family protein*, RHM1, XTH5, GME, XTH6, detectadas somente nas plantas Resistentes inoculadas, reforça-se a hipótese de que a planta resistente fortaleça a parede celular das células, criando uma barreira física mais difícil para o patógeno superar.

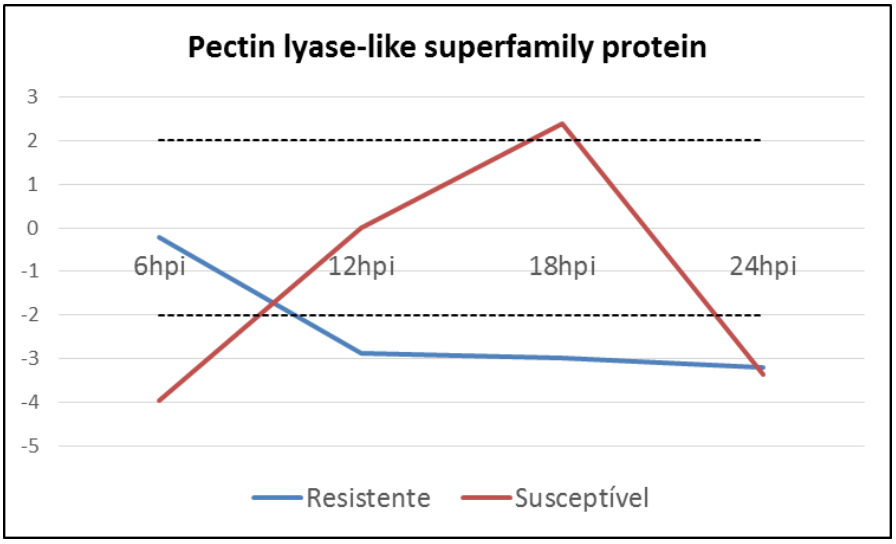


Figura 25 - Padrão de regulação da proteína *Pectin lyase-like superfamily protein*

Duas glicosil hidrolases (GH38 - Eucgr.I01600.1; e GH3 - Eucgr.J00605.1) tem variações preferencialmente de aumento nas plantas Susceptíveis (Figura 26). GH38 tem um aumento pontual em 12hpi nas plantas Susceptíveis, o que também ocorre em 6hpi nas plantas Resistentes, mas que volta a valores estáveis a partir de 12hpi. GH3 aumenta em 6 e 24hpi nas plantas Susceptíveis e se mantém estável nas plantas Resistentes. Essas enzimas são importantes na degradação de parede celular, tendo papel na organização dessa estrutura. Outras três proteínas, agora com papel na síntese de parede (KWON, 2005), também merecem atenção. *Beta-d-xylosidase 4* (XYL4 - Eucgr.G00649.1) e *Alfa-xylosidase 1* (XYL1 - Eucgr.G02327.1) se mantém em concentrações constantes durante os quatro períodos de coleta nas plantas Resistentes, e *alfa-galactosidase 1* (AGAL1 - Eucgr.J00326.1) tem regulação positiva em 12hpi (Figura 26). Porém, nas plantas Susceptíveis, essas enzimas possuem comportamentos bastante variáveis. XYL4 diminui em 18hpi, assim como XYL1, após aumento em 6hpi, e AGAL1 diminui em 12hpi e aumenta somente em 24hpi, quando o patógeno já possui hifas secundárias se espalhando dentro do hospedeiro. Aqui, mais uma vez há evidências do controle do hospedeiro pelo fungo nas plantas Susceptíveis a fim de facilitar sua penetração e absorção de nutrientes, e enrijecimento da parede celular nas plantas Resistentes, conferindo maiores dificuldades ao basidiomiceto.

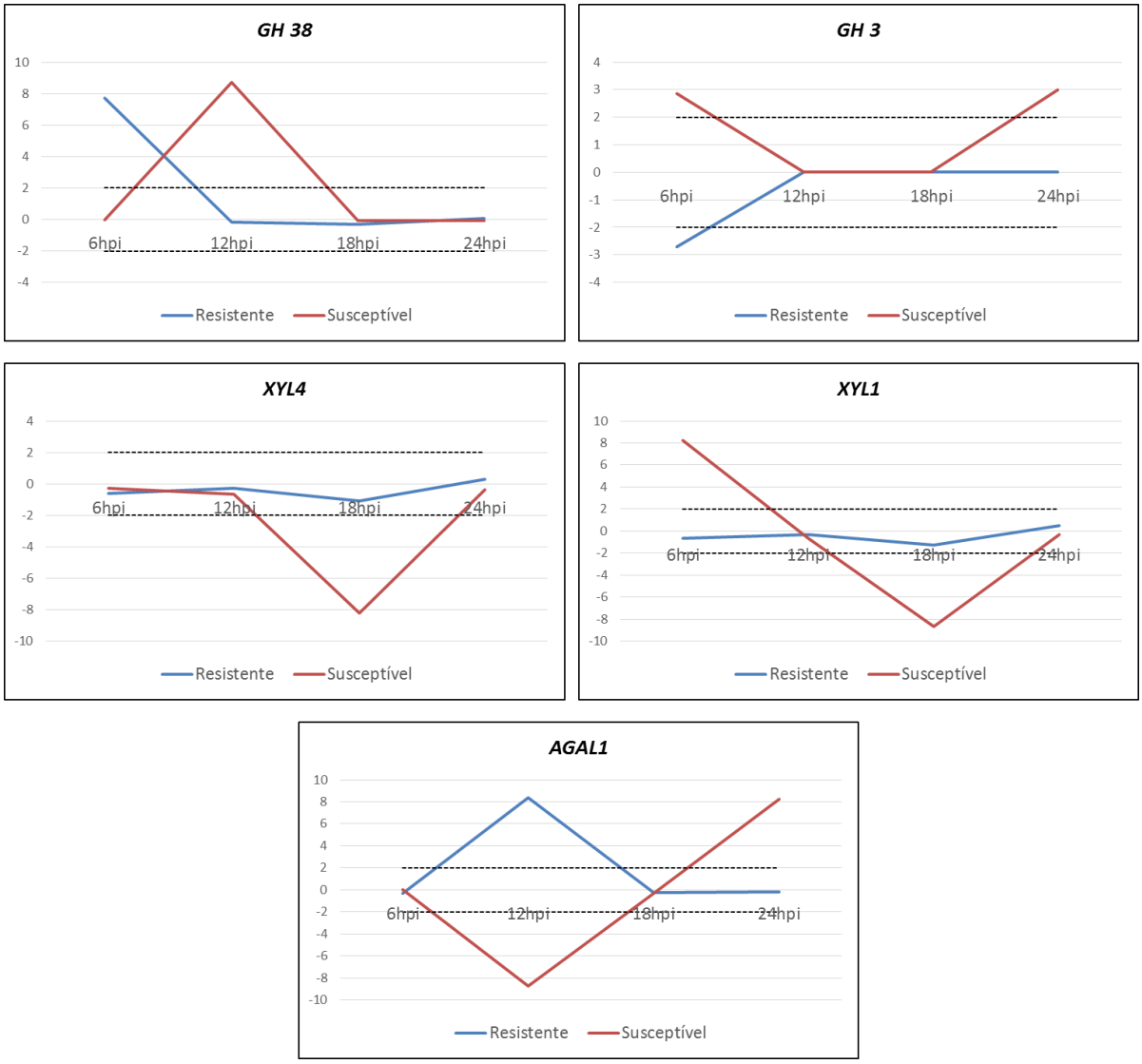


Figura 26 – Padrão de regulação de proteínas relacionadas à organização da parede celular. GH38 *e* GH3 referem-se a glicosil hidrolases. XYL4 e XYL1 referem-se a, respectivamente, *Beta-d-xylosidase 4 e Alfa-xylosidase 1*. AGAL1 *refere-se a Alfa-galactosidase*

Germins e *germin-like proteins* são proteínas onipresentes em todos os tecidos vegetais e se encaixam nos grupos PR-15 e PR-16 (*pathogenesis related*) de proteínas relacionadas à patogenicidade. Elas são glicoproteínas associadas à matriz extracelular e alguns estudos sugerem seu papel no reforço da parede celular, impedindo a expansão da célula (SHARMA et al., 2008; AFROZ; MUHAMMAD, 2011). Duas dessas proteínas, mais especificamente duas *germin 3* (Eucgr.C03354.1 e Eucgr.F04417.1), foram positivamente reguladas nas plantas de *E. grandis* Resistentes inoculadas, em 6, 18 e 24hpi, e uma delas negativamente regulada em 12 e 24hpi nos *E. grandis* Susceptíveis inoculados (Figura 27). Outra proteína que parece acompanhar o mesmo comportamento de resposta das *germin 3* é a *Stress responsive alpha-beta barrel domain protein* (Eucgr.J00434.1), que também é positivamente regulada nas plantas Resistentes inoculadas em 18hpi e negativamente regulada

nas plantas Susceptíveis em 12 e 24hpi (Figura 27). Essas proteínas, porém, têm função desconhecida, mas visto seu comportamento durante a infecção pelo patógeno em *E. grandis* sugere-se sua importância na montagem da resposta imune já que sua concentração aumenta em momentos chave nas plantas Resistentes e diminui nas Susceptíveis. Nas plantas Susceptíveis o controle negativo tanto de *germin 3* quanto de *Stress responsive alpha-beta barrel domain protein* podem ser um reflexo das modificações metabólicas derivadas de outras vias alvo de efetores fúngicos ou o resultado direto dos mesmos, apesar da primeira hipótese ser mais plausível visto que não há relatos na literatura dessas proteínas serem interceptadas por efetores.

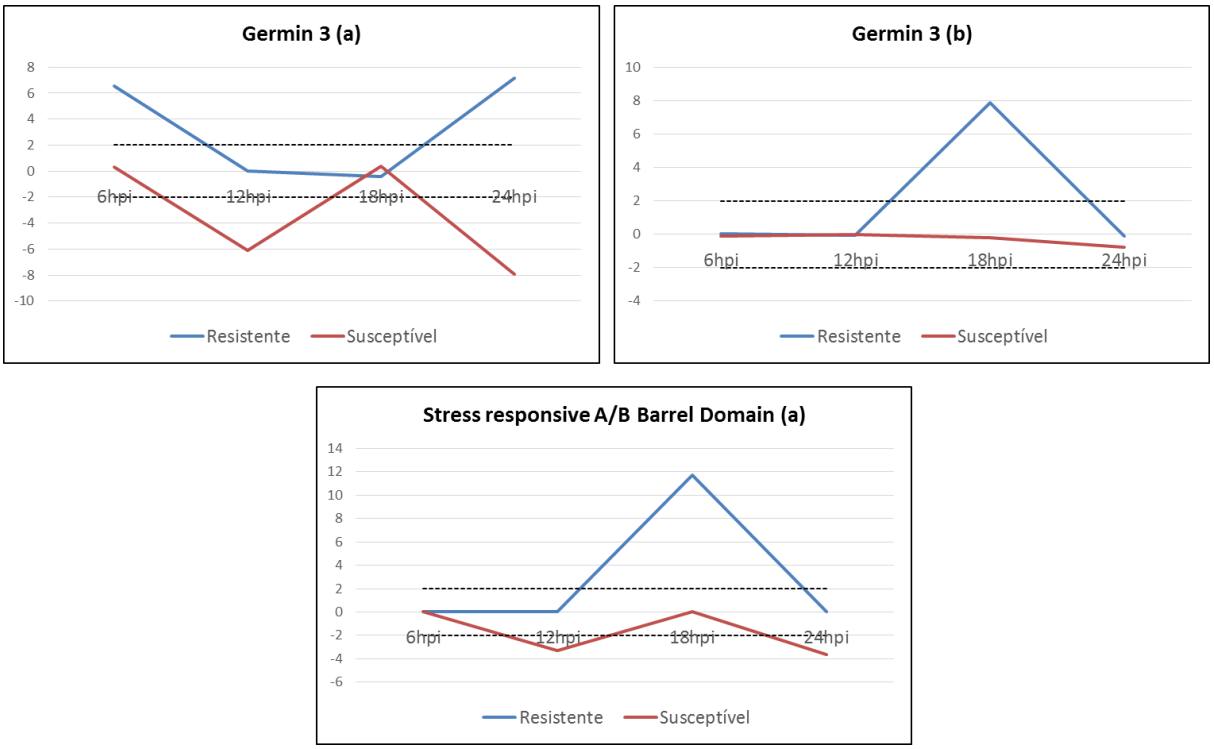


Figura 27 – Padrão de regulação de proteínas relacionadas à estresse. Variação durante o tempo de duas *Germin 3* (a- Eucgr.C03354.1; b- Eucgr.F04417.1) e uma *Stress responsive alpha-beta barrel domain protein*

É interessante observar o comportamento durante os períodos pós-inoculação das duas proteínas do complexo *ADP glucose pyrophosphorylase* (*ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1 (*APL1 - Eucgr.B01108.2*)* e *ADP glucose pyrophosphorylase small subunit 1 (*APS1 - Eucgr.K01372.1*)*). Assim como observado na literatura (LESS et al., 2011; TAUZIN; GIARDINA, 2014; PUSZTAHELYI; HOLB; PÓCSI, 2015) em interações de patógenos com arabidopsis, milho e batata doce, houve uma regulação negativa das enzimas produtoras de amido nas plantas Resistentes, partindo de uma quantidade superior nas plantas Resistentes inoculadas em 6hpi até uma regulação negativa em 24hpi. Os artigos

anteriormente citados sugerem que uma diminuição da quantidade de amido dispõe uma maior concentração de substrato para outras rotas metabólicas que favorecem a resposta imune. Porém o comportamento das plantas Susceptíveis é totalmente contrastante. Nas plantas Susceptíveis a quantidade das proteínas *ADP glucose pyrophosphorylase* partem de uma regulação negativa ou neutra em 6 e 12hpi para uma regulação positiva em 18 e 24hpi, lembrando que outra APL1 foi detectada somente nas plantas Susceptíves (Ítem 5.1.1). Esse comportamento das plantas Susceptíveis confirma a suspeita de que não somente a planta é incapaz de conter o avanço de *P. psidii* como este consegue modular o metabolismo primário do hospedeiro.

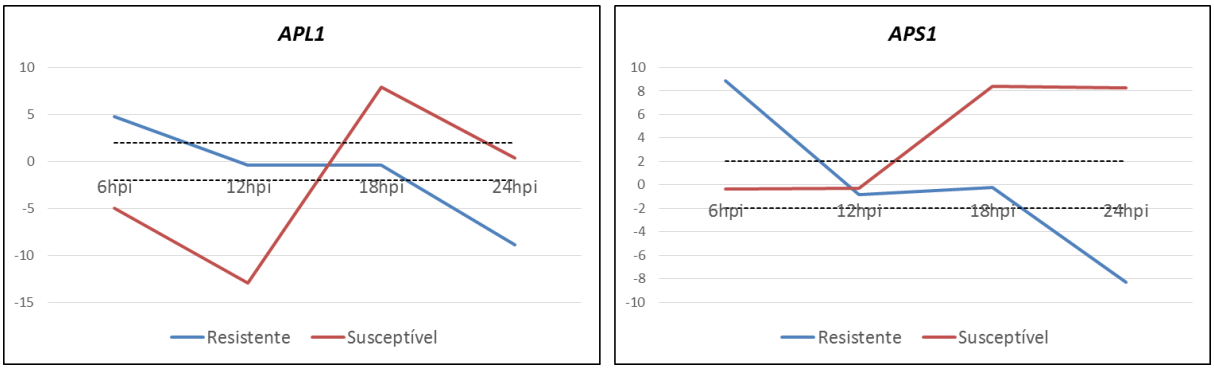


Figura 28 – Padrão de regulação de proteínas relacionadas à síntese de amido. APL1 refere-se a *ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1* e APS1 refere-se a *ADP glucose pyrophosphorylase small subunit 1*

5.2 Metabólitos secundários

Antes ou após o contato do patógeno com o hospedeiro as plantas produzem um arsenal de metabólitos secundários, diferentes de espécie para espécie vegetal, que auxiliam na promoção da resistência contra possíveis organismos virulentos. Para prevenir que microrganismos não as molestem, as plantas podem produzir, anteriormente à infecção, fitoanticipinas, e quando desafiadas por patógenos elas empregam uma resposta imune variada, investindo em várias frentes de defesa, sendo uma delas a produção de fitoalexinas, ambos grupos de metabólitos secundários. Essas moléculas não são utilizadas nas rotas metabólicas essenciais para a sobrevivência das plantas, mas derivam de vias principais (metabolismo primário) ou são intermediárias das mesmas, podendo conferir maior aptidão às plantas que as produzem por atuarem em papéis importantes, como por exemplo, na produção de moléculas danosas a organismos patogênicos ou que detém o avanço dos mesmos.

A técnica de metabolômica aplicada no presente estudo é mais rápida e analiticamente mais simples do que a técnica de proteômica, porém, a identificação das moléculas é mais

custosa do que a empregada no estudo de ácidos nucléicos ou proteínas, visto que os metabólitos secundários são altamente variáveis e não modulares, com estruturas bastante complexas. Um fator que torna impeditiva a identificação tentativa de um grande número de moléculas na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é a necessidade de fragmentar cada uma delas isoladamente. Tendo em mãos esses fragmentos é possível montar a molécula original como um quebra-cabeças, utilizando-se um modelo de mesmo *m/z* já identificado em um banco de dados. Conhecendo as particularidades na realização da técnica de metabolômica, foram feitas comparações entre amostras controle e tratamento com a finalidade de procurar possíveis metabólitos biomarcadores de resistência, moléculas biomarcadoras de resposta imune e sinais da infecção por patógeno em *E. grandis* quando desafiadas pelo patógeno *P. psidii*.

O gráfico de PCA (análise de componentes principais) contendo todas as amostras (Figura 19) deixa claro a diferença inata entre as plantas Resistentes e Susceptíveis, evidência que fica ainda mais explícita no gráfico de PLS-DA comparativo entre plantas Resistentes e Susceptíveis antes das mesmas serem colocadas em contato com o patógeno, com soma de componentes igual a 50,4%. A partir desse resultado é plausível supor que a técnica de metabolômica pode ser utilizada na identificação de linhagens de *E. grandis* resistentes ao patógeno ao compará-las com plantas susceptíveis, a partir de um *fingerprinting* metabólico das amostras. Mais exemplos e testes devem ser realizados para que tal suspeita seja comprovada, e em caso de confirmação da hipótese, o exemplo poderia ser extrapolado a outras espécies vegetais.

Ao analisar as plantas Resistentes e Susceptíveis antes do contato com o patógeno, foram identificados 3 metabólitos que se mostraram importantes nas plantas Resistentes na separação dos componentes no gráfico de PLSDA: *Tyrosyl-Serine* (dipeptídeo), *4,6'-Dihydroxy-2',3',4'-trimethoxychalcone* (classe: flavonóide) e *Allithiamine* (subclasse: diazina). Por serem diferencialmente mais intensos nas plantas R, as três moléculas são candidatas a biomarcadores de resistência em *E. grandis*.

Os flavonóides são derivados das vias metabólicas da pentose fosfato, chiquimato e fenilpropanóides. Eles estão presentes em altas concentrações em folhas e na casca de frutas e estão envolvidos em processos de defesa importantes como resistência a UV, pigmentação e resistência a doenças (PUSZTAHELYI; HOLB; PÓCSI, 2015). Flavonóides são conhecidos por alterar a permeabilidade de microrganismos e por interagir com proteínas de membranas, causando deformação na estrutura e funcionalidade dessas moléculas. Em estudo envolvendo *Eucalyptus globulus* e o patógeno *Mycosphaerella sp.*, Hantao et al. (2014) identificaram

tentativamente 2 moléculas, *5,7,4'-trimethoxyflavone* e *2-methyl-5,7,8-trimethoxyisoflavone*, possíveis biomarcadores da doença nas folhas de *E. globulus*, ambos classificados como flavonóides. Bollina et al. (2010) e Wojakowska e Muth (2013) também apontaram vários flavonóides como metabólitos relacionados a resistência contra patógenos em estudo envolvendo cevada infectada por *Fusarium graminearum*, e *Lupinus angustifolius* inoculado com *Colletotrichum lupini*. A identificação tentativa, no presente trabalho, da molécula *4,6'-Dihydroxy-2',3',4'-trimethoxychalcone*, descoberta há quase 40 anos em *Chromolaena odorata* (BARUA et al., 1978), é portanto corroborada por outros estudos que apontam flavonóides como fatores relacionadas à resposta imune em plantas ou biomarcadores de doença em plantas.

Tyrosyl-Serine é um dipeptídeo, mas sua função é desconhecida, podendo ser apenas um produto da digestão proteica incompleta ou intermediário de uma via metabólica. Já *Allithiamine* é um metabólito pertencente ao grupo das diazinas e derivados, que por possuírem um anel de pirimidina (anel contendo 4 átomos de carbono e 2 átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3), são importantes em vários processos biológicos pois o anel está presente em várias vitaminas, ácidos nucléicos e coenzimas (SOLANKEE et al., 2007). *Allithiamine* é uma forma de vitamina B1 que ocorre em *Allium sativum* (alho) e *Allium schoenoprasum* (cebolinha), e apesar de não ser citado na literatura como responsável por conferir resistência a patógenos, aparece no presente estudo como variável importância na separação de plantas Resistentes e Susceptíveis. Além disso divide características comuns com *2-aminopyrimidine*, fungicida ainda utilizado para controle de patógenos (HOLLOMON, 2003).

Também foram tentativamente identificados metabólitos que aumentaram em intensidade após o contado de *E. grandis* com o patógeno *P. psidii*. Nas plantas Resistentes no período de 24hpi foram identificados 5 metabólitos, um deles derivado de aminoácido e quatro glicerofosfolipídeos. O ácido orgânico derivado de aminoácido *L-Furosine* não é apontado pela literatura como molécula participante na resposta imune da planta, porém esse fato não o exclui como um dos candidatos a ter tal papel nos tecidos vegetais. Os outros quatro metabólitos, *PG(20:1 (11Z) / 0:0)*, *PI(15:0 / 0:0)*, *PI(18 3 (6Z, 9Z, 12Z) 20 5 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z))*, PI(17:1 (9Z) / 22:6 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)), são exemplares de lipídeos, mais especificamente glicerofosfolipídeos. Há evidências substanciais de que esse grupo de moléculas não somente tem papel estrutural, mas também possuem função de mensageiros e participam da cascata de sinalização que levam à morte celular (REINA-PINTO; YEPHREMOV, 2009). Essas moléculas são, portanto, importantes mediadores do

processo de resistência das plantas contra organismos invasores. Em estudo envolvendo a superexpressão do gene *FATTY ACID ELONGASE1* (*FAE1*) em *A. thaliana*, responsável pela produção de diferentes classes de lipídeos, inclusive glicerofosfolipídeos, Reina-Pinto et al. (2009) constataram o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, deposição de calose e danos ao DNA nas plantas transformadas, respostas comuns nas plantas em defesa contra patógenos. Bollina et al. (2010) também encontraram 5 ácidos graxos possivelmente relacionados à resistência contra patógenos em estudo da interação entre cevada e *F. graminearum*, indicando mais uma vez a importância desse grupo de metabólitos na resposta imune.

Em 72hpi, nas plantas Resistentes, outros dois flavonóides se destacaram e foram identificados. São eles *2',6',beta-Trihydroxy-4'-methoxychalcone* e *Androechin*. Esses metabólitos foram identificados apenas três dias após a inoculação e, portanto, foram produzidos após a detecção do patógeno, fato que também os caracteriza como fitoalexinas. Apesar de uma possível relação entre a produção dessas moléculas e a proteína *Chalcone-flavanone isomerase family protein*, identificada somente nas plantas Resistentes inoculadas em 18hpi, não é possível sua comprovação por falta de dados experimentais . A produção de flavonóides por plantas durante o processo de imunidade é bastante citada pela literatura em estudo com diversas espécies vegetais, tais como uva (ALI et al., 2012), soja (ALIFERIS; FAUBERT; JABAJI, 2014) e cevada (BOLLINA et al., 2010). Reforçando as informações anteriores, suas propriedades antipatogênicas podem ser não específicas e resultar, em parte, de suas capacidades antioxidativas (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014) e também podem contribuir para o reforço da parede celular modulando a atividade de hormônios vegetais como a auxina, prevenindo a infecção por patógenos (BECKMAN, 2000). Flavonóides também podem inibir enzimas do organismo invasor, inativar proteínas de adesão e romper membranas, mudando sua fluidez e perturbando a cadeia respiratória de patógenos (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014).

Também foram identificados metabólitos nas plantas Susceptíveis inoculadas. Aqui, como as plantas são incapazes de interromper o desenvolvimento e reprodução do fungo, propõe-se que as moléculas identificadas não sejam exatamente marcadores de resistência, mas sinais de que *E. grandis* está sendo infectado por *P. psidii*. No período 24hpi foi encontrada nas plantas Susceptíveis a molécula *Histidinyl-Valine*, um ácido carboxílico. No período de 72hpi foram encontrados *Lindleyin* e *PA(18 3(9Z,12Z,15Z) 18 1(9Z))*, o primeiro sendo um ácido graxo da família dos taninos, e o segundo um glicerofosfato, assim como os encontrados nas plantas Resistentes no período de 24hpi. Os taninos são os metabólitos secundários mais produzidos pelas plantas, conferindo de 5 a 10% do peso seco das folhas e

são especialmente famosos na proteção contra o ataque de herbívoros (BARBEHENN; PETER CONSTABEL, 2011). Porém também é bem documentada sua ação na redução do crescimento de micélio em uma série de fungos filamentosos como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum graminicola*, *Gloeophyllum trabeum*, *Trichoderma viride* e *Penicillium* sp. (LATTANZIO et al., 2006). Em *P. psidii* é possível que *Lindleyin* seja produzido para tentar retardar o crescimento do fungo, mas não consiga impedir o completo desenvolvimento do patógeno, e o mesmo ocorre com *PA(18 3(9Z,12Z,15Z) 18 1(9Z)*. Como esses metabólitos são produzidos nas plantas Susceptíveis sob ataque de *P. psidii*, sugere-se que eles sejam indicadores da instalação da doença, mas que não são suficientes para evitar a colonização e multiplicação do patógeno.

6 CONCLUSÕES

As plantas Susceptíveis e Resistentes mostraram perfis proteico e metabólico bastante distintos durante a infecção por *P. psidii* (Tabela 9). As plantas Resistentes percebem a presença do patógeno logo nas primeiras horas pós-infecção (6hpi) através de elicitores do patógeno ou da própria planta, aumentando a produção de proteínas realacionadas à resposta imune. Juntamente com essas proteínas começam a ser produzidas proteínas de parede celular, que reforçam a estrutura a fim de impedir o avanço do patógeno.

No período de 12hpi essas plantas aumentam a produção de proteínas de vigilância (proteína R), continuando a produzir proteínas de parede celular e diminuindo a produção de proteínas responsáveis pela dissolução dessa estrutura. A estratégia de reforçar a parede celular é a principal empregada na luta contra a infecção do patógeno, estendendo-se até o último período estudado. As plantas Resistentes também têm o metabolismo energético modificado, canalizando energia para a resposta de defesa, consumindo carboidratos de armazenagem.

Outra característica das plantas Resistentes é a produção diferencial de proteínas relacionadas à estresse em 18hpi e a presença de proteínas destoxificadoras, controlando as ROS em 24hpi.

As plantas Susceptíveis demoram a perceber a presença do patógeno, que subverte o sistema imune da planta. As plantas Susceptíveis continuam produzindo açúcares de reserva mesmo após a penetração do fungo (de 6 a 24hpi), diminuem a produção de proteínas de reconhecimento do patógeno (6 e 12 e 18hpi) e relacionadas a estresse, aumentam a produção de proteínas que desconstroem a parede celular (6 a 24hpi) e diminuem a produção daquelas responsáveis pela construção dessa estrutura (12 e 18hpi). Essas respostas são bastante contrastantes em relação às plantas Resistentes.

Os metabólitos *Tyrosyl-Serine*, *4,6'-Dihydroxy-2',3',4'-Trimethoxychalcone* e *Allithimine* são possíveis fitoanticipinas. Os metabólitos *L-Furosine*, *PG(20:1 (11Z)/ 0:0)*, *PI(15:0 / 0:0)*, *PI(18 3 (6Z, 9Z, 12Z) 20 5 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z))*, PI(17:1 (9Z) / 22:6 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)), *2',6',beta-Trihydroxy-4'-methoxychalcone* e *Androechin*, são prováveis fitoalexinas, derivados da resposta imune da planta com o objetivo de impedir o sucesso do patógeno. Por fim, *Histidinyl-Valine*, *Lindleyin* e *PA(18 3 (9Z, 12Z, 15Z) 18 1(9Z))* são apontados como moléculas indicadoras da instalação da ferrugem em *E. grandis*. O isolamento dessas moléculas é o próximo passo para testar se elas realmente possuem propriedades contra o crescimento de microorganismos / patógenos.

Tabela 9 – Resumo das modificações na constituição de proteínas e metabólitos secundários ocorridas no tecido foliar de *E. grandis* (Resistentes e Susceptíveis) em decorrência da inoculação por *P. psidii*

Período	Resistentes		Susceptíveis	
	Proteínas	**Metabólitos**	**Proteínas**	**Metabólitos**
6hpi	↑**(imunidade/estresse)**: HSP90; ILITYHIA; HSP89-1; germin 3; UDP-Glycosyltransferase; UGT88A1; GSTL2 **(energia)**: PFK3; PKP1; PDHA1 (**parede/carboidratos**): Alpha-1,4-glucan-protein synthase; RHM1; GH38; APL1; APS1; Amidase	-	↑**(parede/carboidratos)**: APL1; GH3; XYL1	-
	↓(**parede/carboidratos)**: GH3	-	↓**(imunidade/estresse)**: LRR family protein (**parede/carboidratos)**: Pectin lyase-like; APL1	-
12hpi	↑**(imunidade/estresse)**: NB-ARC domain-containing disease resistance; HSC70-1; HSP89-1; **(energia):** PDHA1; NADH-ubiquinone oxidoreductase; **(parede/carboidratos)**: AGAL1; XTH5	-	↑**(energia)**: TPI (**parede/carboidratos)**: GH38; SUS4	-
	↓**(parede/carboidratos)**:Pectin lyase-like	-	↓**(imunidade/estresse)**: LRR protein kinase; germin 3; Stress responsive alpha-beta barrel domain protein **(parede/carboidratos)**: APL1; AGAL1	-
18hpi	↑**(imunidade/estresse)**: Chalcone-flavanone isomerase; germin 3; Stress responsive alpha-beta barrel domain protein **(parede/carboidratos)**: GME	-	↑**(imunidade/estresse)**: SOD2 **(energia)**: PDC2 **(parede/carboidratos)**: Pectin lyase-like; APL1; APS1; ARAF1	-
	↓**(parede/carboidratos)**: Pectin lyase-like	-	↓**(imunidade/estresse)**: LRR family protein **(parede/carboidratos)**: XYL4; XYL1	-
24hpi	↑**(imunidade/estresse)**: germin 3; SOD2; PRX25 **(energia)**: NAPDP-ME3; PDC1 **(parede/carboidratos)**: XTH6	↑L-Furosine; PG(20:1(11Z)/0:0); PI(15:0/0:0); PI(18 3(6Z,9Z,12Z) 20 5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)); PI(17:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	↑**(imunidade/estresse)**: PRX71 **(parede/carboidratos)**: PAE; GH3; AGAL1; APS1	↑Histidinyl-Valine
	↓**(parede/carboidratos)**: Pectin lyase-like; APL1; APS1	-	↓**(imunidade/estresse)**: germin 3; Stress responsive alpha-beta barrel domain protein;	-
72hpi	-	↑2',6',beta-Trihydroxy-4'-methoxychalcone; Androechin	-	↑Lindleyin; PA(18 3(9Z,12Z,15Z) 18 1(9Z))

REFERÊNCIAS

AFROZ, A.; ALI, G.M.; MIR, A.; KOMATSU, S. Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. **Plant Cell Reports**, New York, v. 30, n. 5, p. 745–763, May 2011.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory micology**. 4th ed. New York: John Wiley, 1996. 868 p.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, A.A. V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2009. 500 p.

ALI, K.; MALTESE, F.; FIGUEIREDO, A.; REX, M.; FORTES, A.M.; ZYPRIAN, E.; PAIS, M.S.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H. Alterations in grapevine leaf metabolism upon inoculation with *Plasmopara viticola* in different time-points. **Plant Science**, Shannon, v. 191/192, p. 100–107, Aug. 2012.

ALIFERIS, K.A.; FAUBERT, D.; JABAJI, S. A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-13, Jan. 2014.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 373–399, Jan. 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**. Brasília, 2013. 146 p.

BARBEHENN, R.V.; PETER CONSTABEL, C. Tannins in plant-herbivore interactions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 72, n. 13, p. 1551–1565, Sept. 2011.

BARUA, R.N.; SHARMA, R.P.; THYAGARAJAN, G.; HERTZ, W. Flavonoids of *Chromolaena odorata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 1807–1808, 1978.

BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 3, p. 101–110, Sept. 2000.

BELLINCAMPI, D.; CERVONE, F.; LIONETTI, V. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1–8, May 2014.

BENT, A.F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 399–436, Jan. 2007.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 379–406, Jan. 2009.

BOLLINA, V.; KUMARASWAMY, G.K.; KUSHALAPPA, A.C.; CHOO, T.M.; DION, Y.; RIOUX, S.; FAUBERT, D.; HAMZEHZARGHANI, H. Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against Fusarium head blight. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 11, n. 6, p. 769–782, Nov. 2010.

BOTËR, M.; AMIGUES, B.; PEART, J.; BREUER, C.; KADOTA, Y.; CASAIS, C.; MOORE, G.; KLEANTHOUS, C.; OCHSENBEIN, F.; SHIRASU, K.; GUEROIS, R. Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 11, p. 3791–3804, Nov. 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 72, p. 248–254, May 1976.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, n. 9, p. 1327–1333, May 2004.

CAO, J. The pectin lyases in *Arabidopsis thaliana*: evolution, selection and expression profiles. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. 1-15, Oct. 2012.

CHAVEZ MONTES, R.A.; RANOCHA, P.; MARTINEZ, Y.; MINIC, Z.; JOUANIN, L.; MARQUIS, M.; SAULNIER, L.; FULTON, L.M.; COBBETT, C.S.; BITTON, F.; RENOU, J.P.; JAUNEAU, A.; GOFFNER, D. Cell wall modifications in arabidopsis plants with altered alpha-l-arabinofuranosidase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 1, p. 63–77, May 2008.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 4, p. 803–814, Feb. 2006.

CIPRIANO, A.K.A.L.; GONDIM, D.M.F.; VASCONCELOS, I.M.; MARTINS, J.A.M.; MOURA, A.A.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MELO, J.G.M.; CARDOSO, J.E.; LUIZA, A.; PAIVA, S.; OLIVEIRA, J.T.A. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 113, p. 90–109, Jan. 2014.

CLEMENT, M.; LEONHARDT, N.; DROILLARD, M.J.; REITER, I.; MONTILLET, J.L.; GENTY, B.; LAURIERE, C.; NUSSAUME, L.; NOEL, L.D. The cytosolic/nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 156, n. 3, p. 1481–1492, July 2011.

CONSONNI, C.; HUMPHRY, M.; PANSTRUGA, R. Plant relationships. In: ESSER, K. **The mycota**. Berlin; Heidelberg: Springer, 2009. chap. 18, p. 363-385.

COOK, D.E.; MESARICH, C.H.; THOMMA, B.P.H.J. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 541-563, June 2015.

COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J.; ALFENAS, A.C.; CROUS, P.W. Eucalyptus rust: a disease with the potential for serious international implications. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 7, p. 819–825, July 1998.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: Wiley, 2000. chap. 24, p. 1250–1318.

DIXON, D.P.; EDWARDS, R. Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. **Journal of Biolological Chemistry**, Bethesda, v. 285, n. 47, p. 36322–36329, Nov. 2010.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 8, p. 539–548, Aug. 2010.

DU FALL, L.A; SOLOMON, P.S. Role of cereal secondary metabolites involved in mediating the outcome of plant-pathogen interactions. **Metabolites**, Basel, v. 1, n. 1, p. 64–78, Jan. 2011.

DUPLESSIS, S.; MAJOR, I.; MARTIN, F.; SEGUIN, A. Poplar and pathogen interactions: insights from populus genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 28, n. 5, p. 309–334, Oct. 2009.

FAO. **State of the world's forests:** enhancing the socioecomomic benefits from forests. Rome, 2014. 119 p.

FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 7, n. 2, p. 91–109, Dez. 1983.

GILBERT, L.; ALHAGDOW, M.; NUNES-NESI, A.; QUEMENER, B.; GUILLON, F.; BOUCHET, B.; FAUROBERT, M.; GOUBLE, B.; PAGE, D.; GARCIA, V.; PETIT, J.; STEVENS, R.; CAUSSE, M.; FERNIE, A.R.; LAHAYE, M.; ROTHAN, C.; BALDET, P. GDP-d-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. **The Plant Journal**, Malden, v. 60, n. 3, p. 499–508, Nov. 2009.

GLEN, M.; ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy; a review. **Australasian Plant Pathology**, Victoria, v. 36, n. 1, p. 1-16, 2007.

GOU, M.; ZHANG, Z.; ZHANG, N.; HUANG, Q.; MONAGHAN, J.; YANG, H.; SHI, Z.; ZIPFEL, C.; HUA, J. Opposing effects on two phases of defense responses from concerted actions of HSC70 and BON1 in arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 169, n. 3, p. 2304-2323, Nov. 2015.

GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTRÖM, A.; SJÖSTRÖM, M.; MORITZ, T. Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of Arabidopsis thaliana samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 331, n. 2, p. 283–295, Aug. 2004.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 575–607, June 1997.

HANTAO, L.W.; DE LIMA RIBEIRO, F.A.; PASSADOR, M.M.; FURTADO, E.L.; POPPI, R.J.; GOZZO, F.C.; AUGUSTO, F. Metabolic profiling by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry and parallel factor analysis for the determination of disease biomarkers in *Eucalyptus*. **Metabolomics**, New York, v. 10, n. 6, p. 1318–1325, Dec. 2014.

HARBORNE, J.B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 335–367, June 1999.

HELLER, J.; TUDZYNSKI, P. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, n. 1, p. 369–390, 2011.

HENRY, R.; KOLE, C. **Genetics, genomics and breeding of eucalypts**. Boca Raton: CRC Press, 2014. 206 p.

HOLLOMON, D.W. Fungicides, 2-Aminopyrimidines. In: PLIMMER, J.R. **Encyclopedia of agrochemicals**. Hoboken: John Wiley, 2003.

HOU, S.; ZHANG, C.; YANG, Y.; WU, D. Recent advances in plant immunity: recognition, signaling, response, and evolution. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 57, n. 1, p. 11–25, Mar. 2013.

HUDSON, C.J.; FREEMAN, J.S.; MYBURG, A.A.; POTTS, B.M.; VAILLANCOURT, R.E. Genomic patterns of species diversity and divergence in eucalyptus. **New Phytologist**, Hoboken, v. 206, n. 4, p. 1378-1390, June 2015.

HURKMAN, W.J.; TANAKA, C.K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, n. 3, p. 802–806, July 1986.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **IBÁ 2014**, Brasília, 2014. 97 p.

JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia**, Campinas, v. 4, n. 8, p. 475-487, ago. 1944.

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

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 184–188, abr. 2003.

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; ODA, S.; MELLO, E.J.; GRATTAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics,** New York, v. 108, n. 1, p. 175–180, Dec. 2003.

KADOTA, Y.; SHIRASU, K. The HSP90 complex of plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1823, n. 3, p. 689–697, Mar. 2012.

KWON, H.K.; YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of arabidopsis suspension-cultured cells. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 843–857, Mar. 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, n. 1, p. 251–275, June 1997.

LANGLOIS-MEURINNE, M.; GACHON, C.M.M.; SAINDRENAN, P. Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes UGT73B3 and UGT73B5 is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, n. 4, p. 1890–1901, Dec. 2005.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A.; AMENDOLA, V. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO, F. **Phytochemistry:** advances in research. Kerala: Research Signpost, 2006. chap. 2, p. 24-67.

LEITE, T.F. **Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* winter por meio da técnica de Rna-seq**. 2012. 159 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LESS, H.; ANGELOVICI, R.; TZIN, V.; GALILI, G. Coordinated gene networks regulating arabidopsis plant metabolism in response to various stresses and nutritional cues. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 4, p. 1264–1271, Apr. 2011.

LI, Y.; BALDAUF, S.; LIM, E.K.; BOWLES, D.J. Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 6, p. 4338–4343, Feb. 2001.

LIANG, H.; STATON, M.; XU, Y.; XU, T.; LEBOLDUS, J. Comparative expression analysis of resistant and susceptible *Populus* clones inoculated with *Septoria musiva.* **Plant Science**, Clare, v. 223, p. 69–78, June 2014.

MALINOVSKY, F.G.; FANGEL, J.U.; WILLATS, W.G.T. The role of the cell wall in plant immunity. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 178, p. 1–12, May 2014.

MAZID, M.; KHAN, T.A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, Los Angeles, v. 3, n. 2, p. 232–249, 2011.

MEMBRE, N.; BERNIER, F.; STAIGER, D.; BERNA, A. *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. **Planta**, New York, v. 211, n. 3, p. 345–354, Aug. 2000.

MENG, X.; ZHANG, S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 245–266, Jan. 2013.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 10, p. 16240–16265, Oct. 2014.

MONAGHAN, J.; LI, X. The HEAT repeat protein ILITYHIA is required for plant immunity. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 742–753, May 2010.

MOON, D.H.; SALVATIERRA, G.R.; CALDAS, D.G.G.; GALLO DE CARVALHO, M.C. C.; CARNEIRO, R.T.; FRANCESCHINI, L.M.; ODA, S.; LABATE, C.A. Comparison of the expression profiles of susceptible and resistant *Eucalyptus grandis* exposed to *Puccinia psidii* winter using SAGE. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 34, n. 11, p. 1010–1018, 2007.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **A cultura do eucalipto no brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 112 p.

MORIN, L.; TALBOT, M.J.; GLEN, M. Quest to elucidate the life cycle of *Puccinia psidii* sensu lato. **Fungal Biology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 253–263, Feb. 2014.

MORIN, L.; AVEYARD, R.; LIDBETTER, J.R.; WILSON, P.G. Investigating the host-range of the rust fungus *Puccinia psidii* sensu lato across tribes of the family myrtaceae present in Australia. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. 1-7, Apr. 2012.

MYBURG, A.A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G.A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R.D.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; LINDQUIST, E.; TICE, H.; BAUER, D.; GOODSTEIN, D.M.; DUBCHAK, I.; POLIAKOV, A.; MIZRACHI, E.; KULLAN, A.R.K.; HUSSEY, S.G.; PINARD, D.; VAN DER MERWE, K.; SINGH, P.; VAN JAARSVELD, I.; SILVA-JUNIOR, O.B.; TOGAWA, R.C.; PAPPAS, M.R.; FARIA, D.A.; SANSALONI, C.P.; PETROLI, C.D.; YANG, X.; RANJAN, P.; TSCHAPLINSKI, T.J.; YE, C.Y.; LI, T.; STERCK, L.; VANNESTE, K.; MURAT, F.; SOLER, M.; CLEMENTE, H.S.; SAIDI, N.; CASSAN-WANG, H.; DUNAND, C.; HEFER, C.A.; BORNBERG-BAUER, E.; KERSTING, A.R.; VINING, K.; AMARASINGHE, V.; RANIK, M.; NAITHANI, S.; ELSER, J.; BOYD, A.E.; LISTON, A.; SPATAFORA, J.W.; DHARMWARDHANA, P.; RAJA, R.; SULLIVAN, C.; ROMANEL, E.; ALVES-FERREIRA, M.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W.; CAROCHA, V.; PAIVA, J.; KUDRNA, D.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; PASQUALI, G.; BYRNE, M.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; SPOKEVICIUS, A.; JONES, R.C.; STEANE, D.A.; VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; JOUBERT, F.; BARRY, K.; PAPPAS, G.J.; STRAUSS, S.H.; JAISWAL, P.; GRIMA-PETTENATI, J.; SALSE, J.; VAN DE PEER, Y.; ROKHSAR, D.S.; SCHMUTZ, J. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, London v. 509, n. 7505, p. 356–362, Jun. 2014.

MYSORE, K.S.; RYU, C.M. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 2, p. 97–104, Feb. 2004.

NAIDOO, S.; KÜLHEIM, C.; ZWART, L.; MANGWANDA, R.; OATES, C. N.; VISSER, E.A.; WILKEN, F.E.; MAMNI, T.B.; MYBURG, A.A. Uncovering the defence responses of Eucalyptus to pests and pathogens in the genomics age. **Tree Physiology**, Oxford, v. 34, n. 9, p. 931–943, Sept. 2014.

NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 6, n. 3, p. 335–345, May 2005.

O'BRIEN, J.A.; DAUDI, A.; BUTT, V.S.; PAUL BOLWELL, G. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. **Planta**, New York, v. 236, n. 3, p. 765–779, Sept. 2012.

OOIJEN, G. van; MAYR, G.; KASIEM, M.M.A.; ALBRECHT, M.; CORNELISSEN, B.J.C.; TAKKEN, F.L.W. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 1383–1397, Apr. 2008.

PEGG, G.S.; GIBLIN, F.R.; MCTAGGART, A.R.; GUYMER, G.P.; TAYLOR, H.; IRELAND, K.B.; SHIVAS, R.G.; PERRY, S. *Puccinia psidii* in Queensland, Australia: disease symptoms, distribution and impact. **Plant Pathology**, Hoboken, v. 63, n. 5, p. 1005–1021, Oct. 2014.

PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK-REY, N.; BEDNAREK, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. **The New Phytologist**, Hoboken, v. 206, n. 3, p. 948–964, May 2015.

PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I.J.; PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 573, p. 1–23, Aug. 2015.

QUECINE, M.C.; BINI, A.P.; ROMAGNOLI, E.R.; ANDREOTE, F.D.; MOON, D.H.; LABATE, C.A. Genetic variability in *Puccinia psidii* populations as revealed by PCR-DGGE and T-RFLP markers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 1, p. 16–23, Jan. 2014.

QUECINE, M.C.; LEITE, T.F.; BINI, A.P.; REGIANI, T.; FRANCESCHINI, L.M.; BUDZINSKI, I.G.F.; MARQUES, F.G.; LABATE, M.T.V.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; MOON, D.H.; LABATE, C.A. Label-free quantitative proteomic analysis of *Puccinia psidii* uredospores reveals differences of fungal populations infecting eucalyptus and guava. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0145343, Jan. 2016.

RANI, T.S.; TAKAHASHI, D.; UEMURA, M.; PODILE, A.R. Proteins associated with oxidative burst and cell wall strengthening accumulate during citrus-xanthomonas non-host interaction. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 33, n. 5, p. 1349–1360, Oct. 2015.

REINA-PINTO, J.J.; YEPHREMOV, A. Lipid determinants of cell death. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 7, p. 625–628, July 2009.

REINA-PINTO, J.J.; VOISIN, D.; KURDYUKOV, S.; FAUST, A.; HASLAM, R.P.; MICHAELSON, L.V.; EFREMOVA, N.; FRANKE, B.; SCHREIBER, L.; NAPIER, J.A.; YEPHREMOV, A. Misexpression of FATTY ACID ELONGATION1 in the arabidopsis epidermis induces cell death and suggests a critical role for phospholipase A2 in this process. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 4, p. 1252–1272, Apr. 2009.

RIBERA, A.E.; ZUÑIGA, G. Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control : a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 12, n. 4, p. 893–911, 2012.

ROJAS, C.M.; SENTHIL-KUMAR, M.; TZIN, V.; MYSORE, K. S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 17, p. 1-12, Feb. 2014.

ROSS, J.; LI, Y.; LIM, E.; BOWLES, D.J. Higher plant glycosyltransferases. **Genome Biology**, London, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2001.

RUBINGH, C.M.; BIJLSMA, S.; DERKS, E.P.P.A.; BOBELDIJK, I.; VERHEIJ, E.R.; KOCHHAR, S.; SMILDE, A.K. Assessing the performance of statistical validation tools for megavariate metabolomics data. **Metabolomics**, New York, v. 2, n. 2, p. 53–61, June 2006.

RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; VALLE, F.X.R. Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 55–61, 1989.

SCHWESSINGER, B.; RONALD, P.C. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, n. 1, p. 451–482, Jun. 2012.

SENGUPTA, A.; GHOSH, S.; BASANT, A.; MALUSARE, S.; JOHRI, P.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; SONAWAT, H.M. Global host metabolic response to *Plasmodium vivax* infection: a H NMR based urinary metabonomic study. **Malaria Journal**, London, v. 10, n. 384, p. 1-13, Dec. 2011.

SHARMA, N.; HOTTE, N.; RAHMAN, M.H.; MOHAMMADI, M.; DEYHOLOS, M.K.; KAV, N.N.V. Towards identifying brassica proteins involved in mediating resistance to *Leptosphaeria maculans*: a proteomics-based approach. **Proteomics**, Weinhem v. 8, n. 17, p. 3516–3535, Sept. 2008.

SILVA, J.C.; GORENSTEIN, M.V; LI, G.Z.; VISSERS, J.P.C.; GEROMANOS, S.J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 5, n. 1, p. 144–156, Jan. 2006.

SILVEIRA, R.L.V.A.; HIGASHI, E.N. **Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto.** Piracicaba: IPEF, 2003. 13 p. (Circular Técnica, 200).

SOLANKEE, A.; KAPADIA, K.; SOLANKEE, P.; PRAJAPATI, Y.; PATEL, H.; SOLANKEE, S. Synthesis and studies of some novel s-triazine based aminopyrimidines , isoxazoles and and 1,5-benzothiazepines. **Indian Journal of Chemistry**, New Delhi, v. 46, n. 10, p. 1707–1712, Oct. 2007.

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

STASKAWICZ, B.J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 73–76, Jan. 2001.

TAKAHASHI, A.; CASAIS, C.; ICHIMURA, K.; SHIRASU, K. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 20, p. 11777–11782, Sept. 2003.

TAUZIN, A.S.; GIARDINA, T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 193, p. 1–8, June 2014.

TEIXEIRA, J.E.C.; GUEDES, F.T.P.; DIAS, D.C.; BONINE, C.A.V.; CAMARGO, L.E.A. Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* em progênies de híbridos interespecíficos de eucalipto avaliadas sob condições naturais de infecção. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 203–210, Aug. 2009.

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

VERCAUTEREN, I.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; DE GROODT, R.; GHEYSEN, G. An *Arabidopsis thaliana* pectin acetylesterase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 4, p. 404–407, Apr. 2002.

VOIGT, C.A. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne v. 5, n. 168, p. 1-6, Apr. 2014.

WEN, Z.; YAO, L.; WAN, R.; LI, Z.; LIU, C.; WANG, X. Ectopic expression in *Arabidopsis thaliana* of an NB-ARC encoding putative disease resistance gene from wild chinese *Vitis pseudoreticulata* enhances resistance to phytopathogenic fungi and bacteria. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 1087, p. 1–13, Dec. 2015.

WINK, M. Phytochemical diversity of secondary metabolites. In: GOODMAN, R.M. **Encyclopedia of plant and crop science.** New York: Marcel Dekker, 2004.

WOJAKOWSKA, A.; MUTH, D. Changes of phenolic secondary metabolite profiles in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupini* fungus or treatment with its toxin. **Metabolomics**, New York, v. 9, n. 3, p. 575–589, June 2013.

XAVIER, A.A.; ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, K.; HODGES, C.S. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, Victoria, v. 30, n. 3, p. 277–281, 2001.

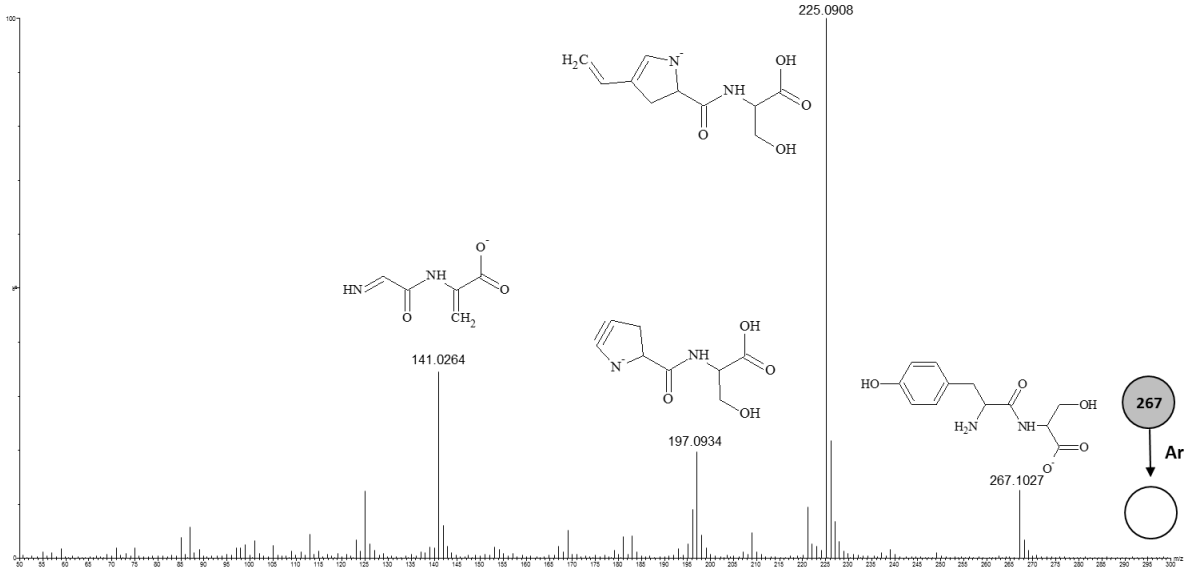
XIA, J.; SINELNIKOV, I.V.; HAN, B.; WISHART, D.S. MetaboAnalyst 3.0: making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 43, n. W1, p. W251–W257, July 2015.

ANEXOS

Anexo A

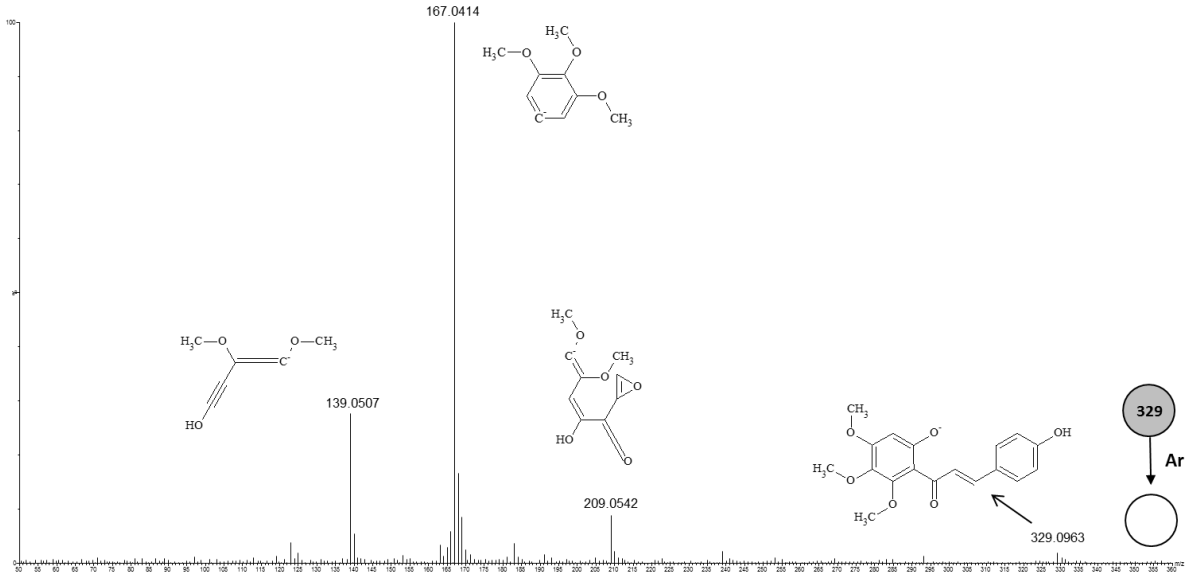
Espectros de fragmentação dos metabólitos identificados na tese

Tyrosyl-Serine (*m/z*: 267.1027)



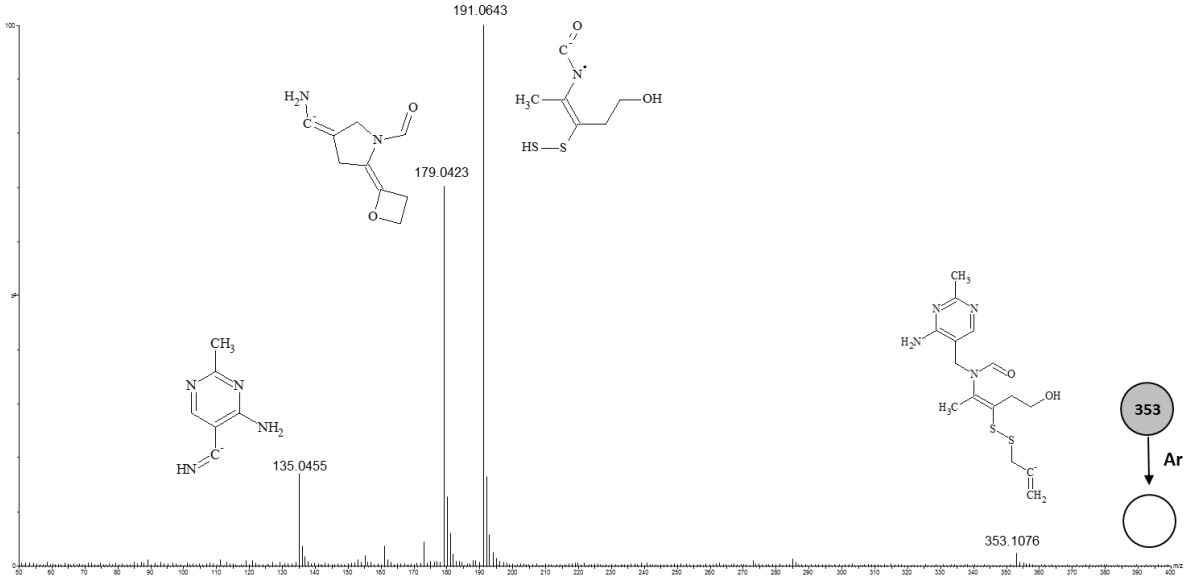
Espectro de fragmentação do metabólito Tyrosyl-Serine (*m/z*: 267.1027; erro de massa: 15 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

4,6'-Dihydroxy-2',3',4'-trimethoxychalcone (*m/z*: 329.0963)



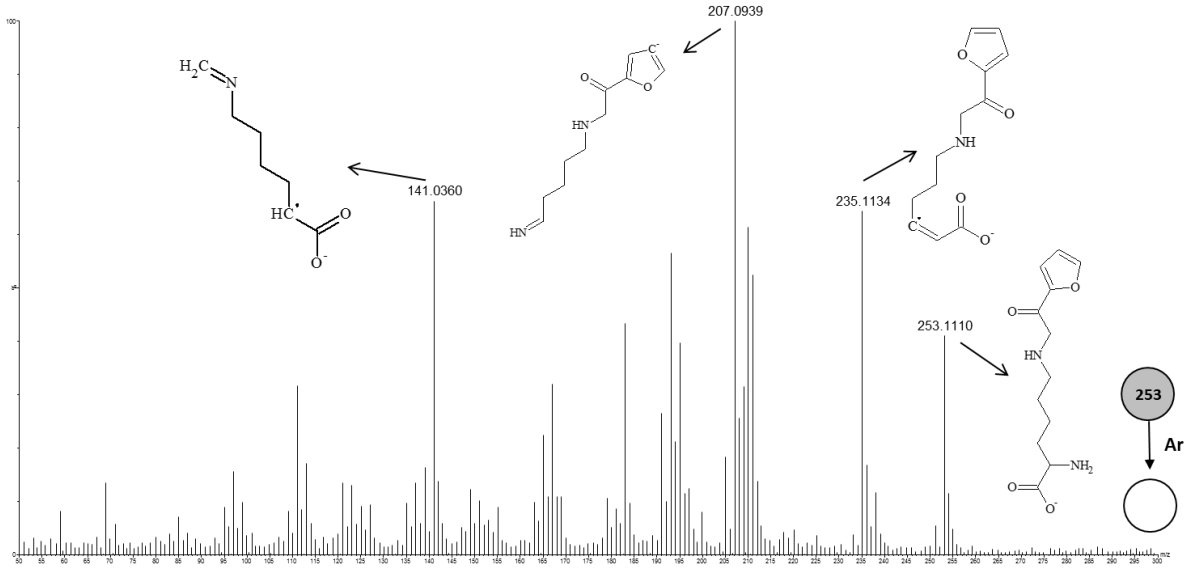
Espectro de fragmentação do metabólito 4,6'-Dihydroxy-2',3',4'-trimethoxychalcone (*m/z*: 329.0963; erro de massa: 20 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

Allithiamine (*m/z*: 353.1076)



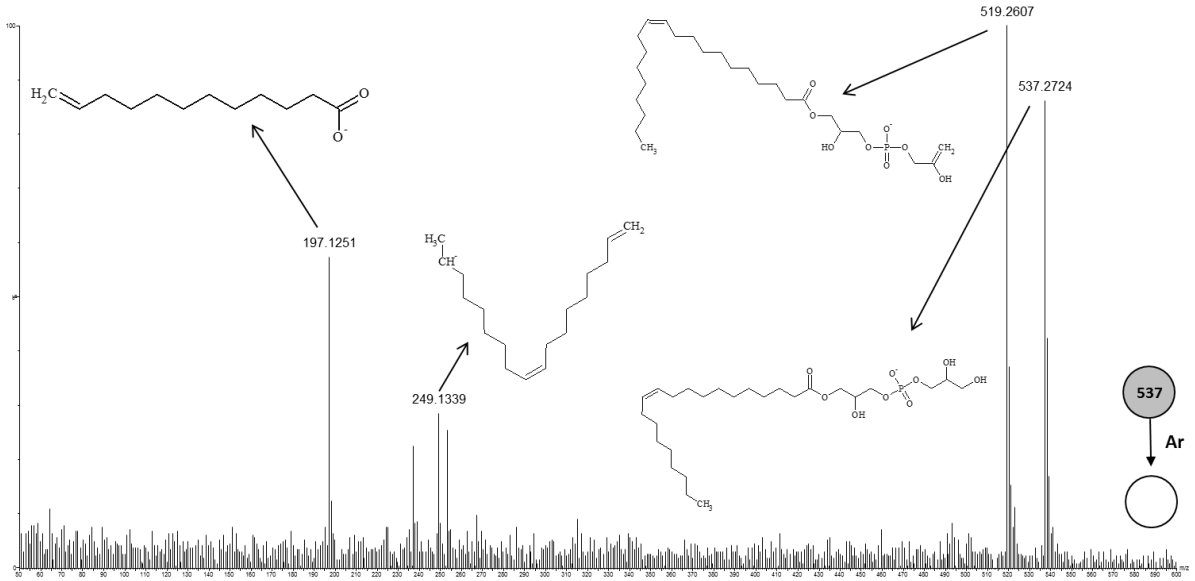
Espectro de fragmentação do metabólito Allithiamine (*m/z*: 353.1076; erro de massa: 10 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

L-Furosine (*m/z*: 253.1107)



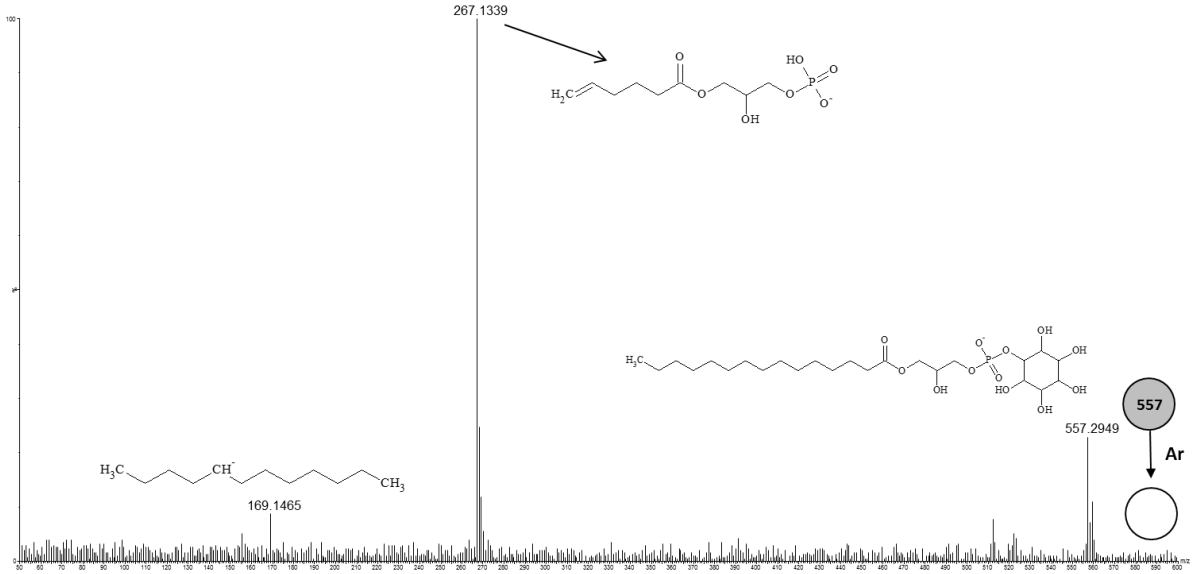
Espectro de fragmentação do metabólito L-Furosine (*m/z*: 253.1107; erro de massa: 34 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

PG(20:1(11Z)/0:0) (*m/z*: 537.2724)



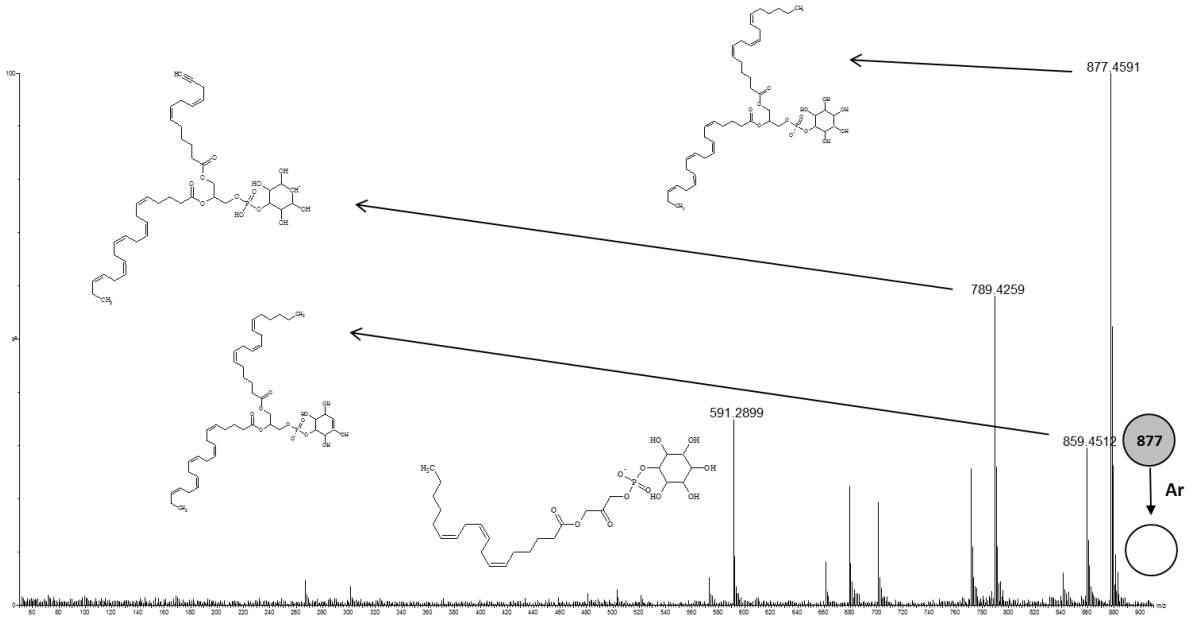
Espectro de fragmentação do metabólito PG(20:1(11Z)/0:0) (*m/z*: 537.2724; erro de massa: 88 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

PI(15:0/0:0) (*m/z*: 557.2949)



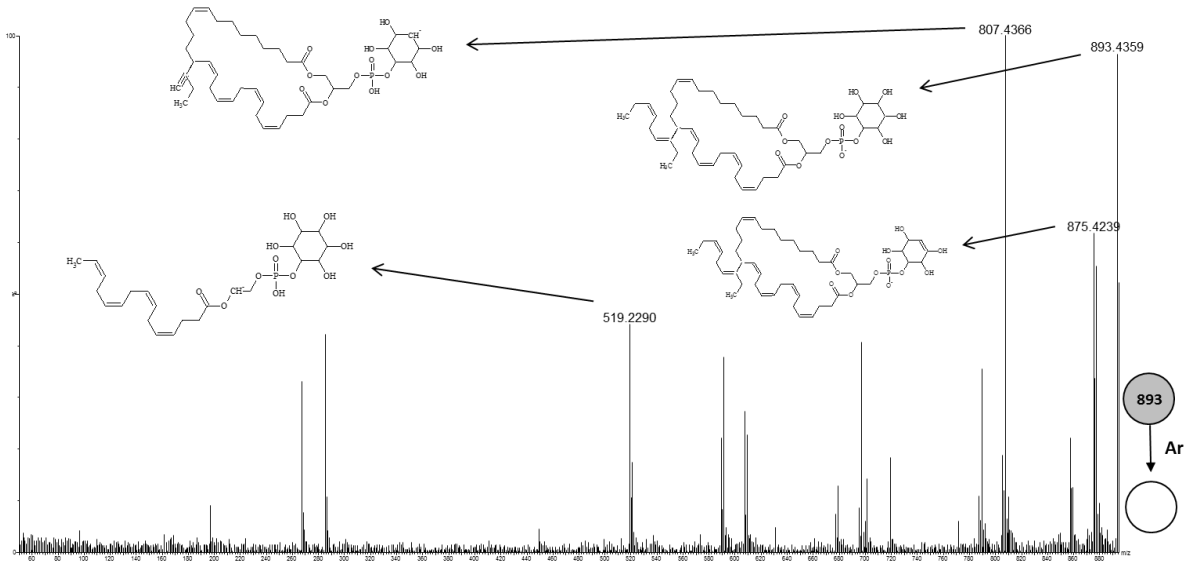
Espectro de fragmentação do metabólito PI(15:0/0:0) (*m/z*: 557.2949; erro de massa: 38 ppm). Estão representados a molécula precursora e os dois fragmentos mais intensos

PI(18 3(6Z,9Z,12Z) 20 5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)) (*m/z*: 877.4591)



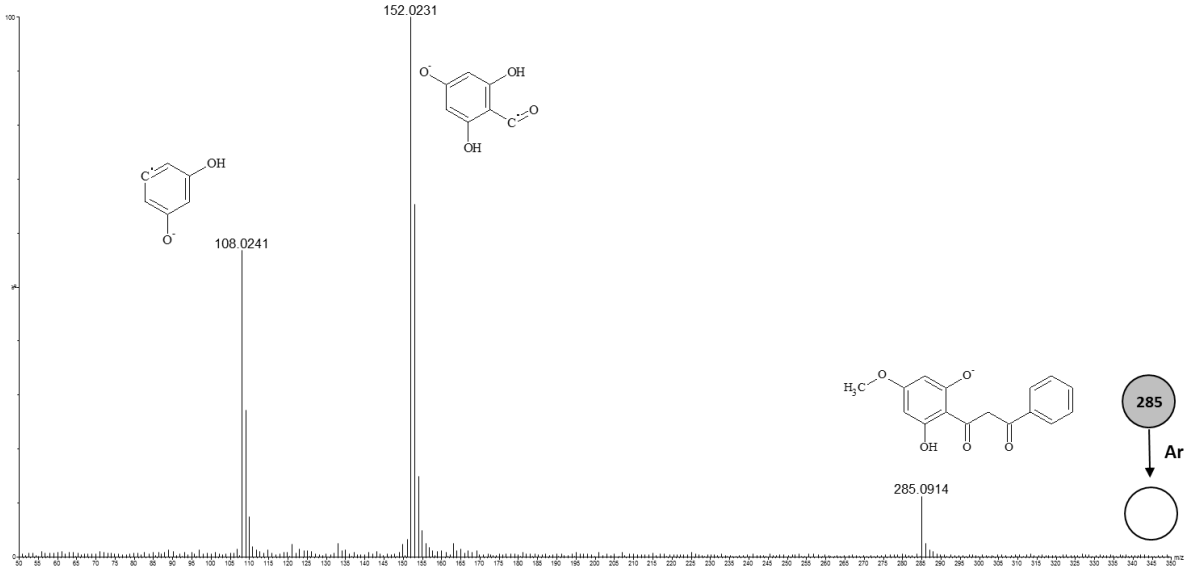
Espectro de fragmentação do metabólito PI(18 3(6Z,9Z,12Z) 20 5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)) (*m/z*: 877.4591; erro de massa: 32 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

PI(17:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) (*m/z*: 893.4359)



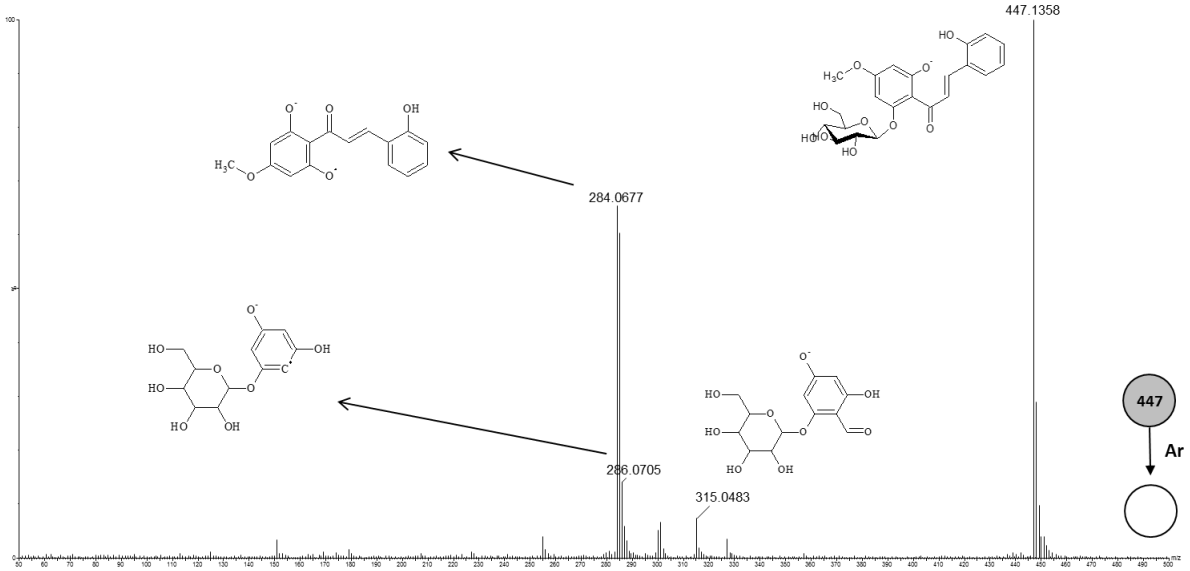
Espectro de fragmentação do metabólito PI(17:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) (*m/z*: 893.4359; erro de massa: 92 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

2',6',beta-Trihydroxy-4'-methoxychalcone (*m/z*: 285.0914)



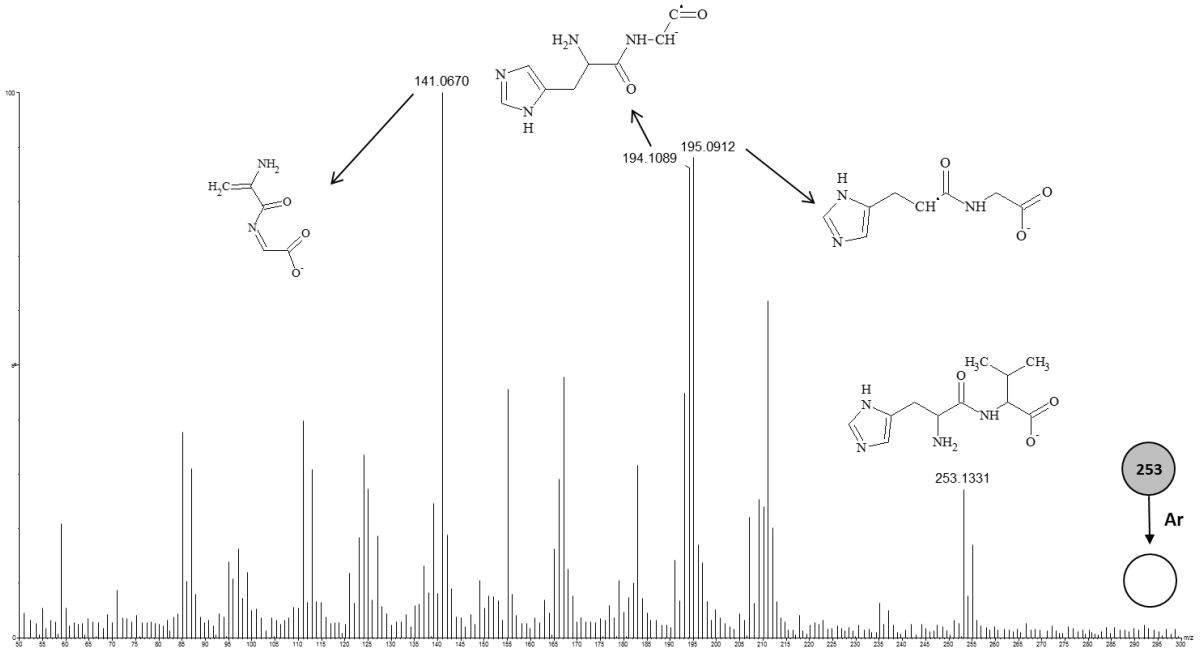
Espectro de fragmentação do metabólito 2',6',beta-Trihydroxy-4'-methoxychalcone (*m/z*: 285.0914; erro de massa: 51 ppm). Estão representados a molécula precursora e os dois fragmentos mais intensos

Androechin (*m/z*: 447.1358)



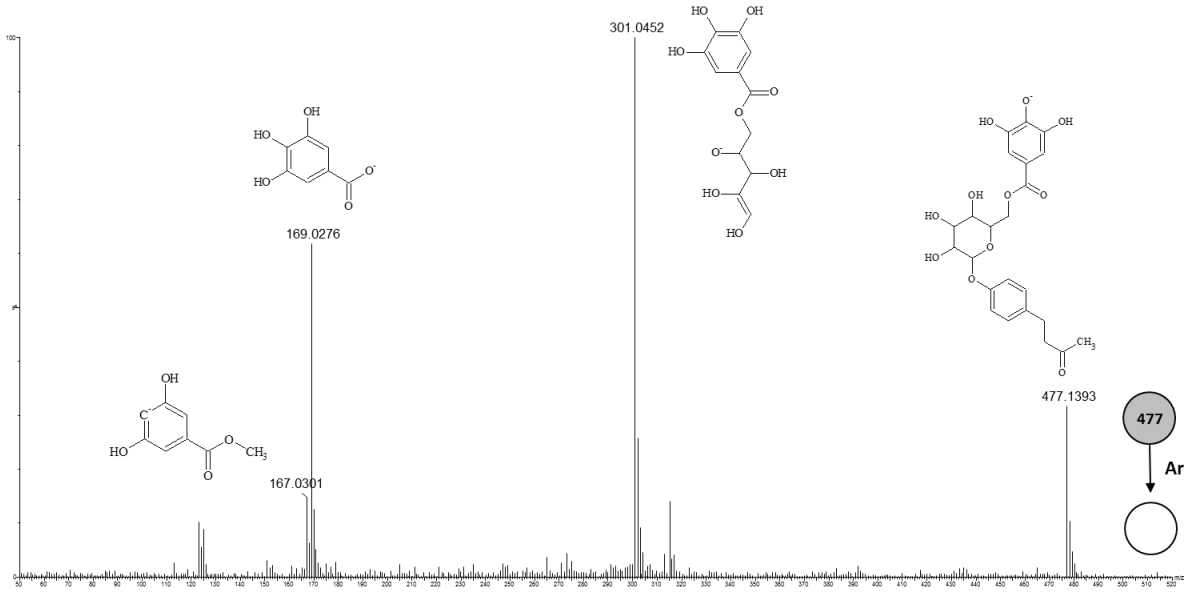
Espectro de fragmentação do metabólito Androechin (*m/z*: 447.1358; erro de massa: 13 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

Histidinyl-Valine (*m/z*: 253.1331)



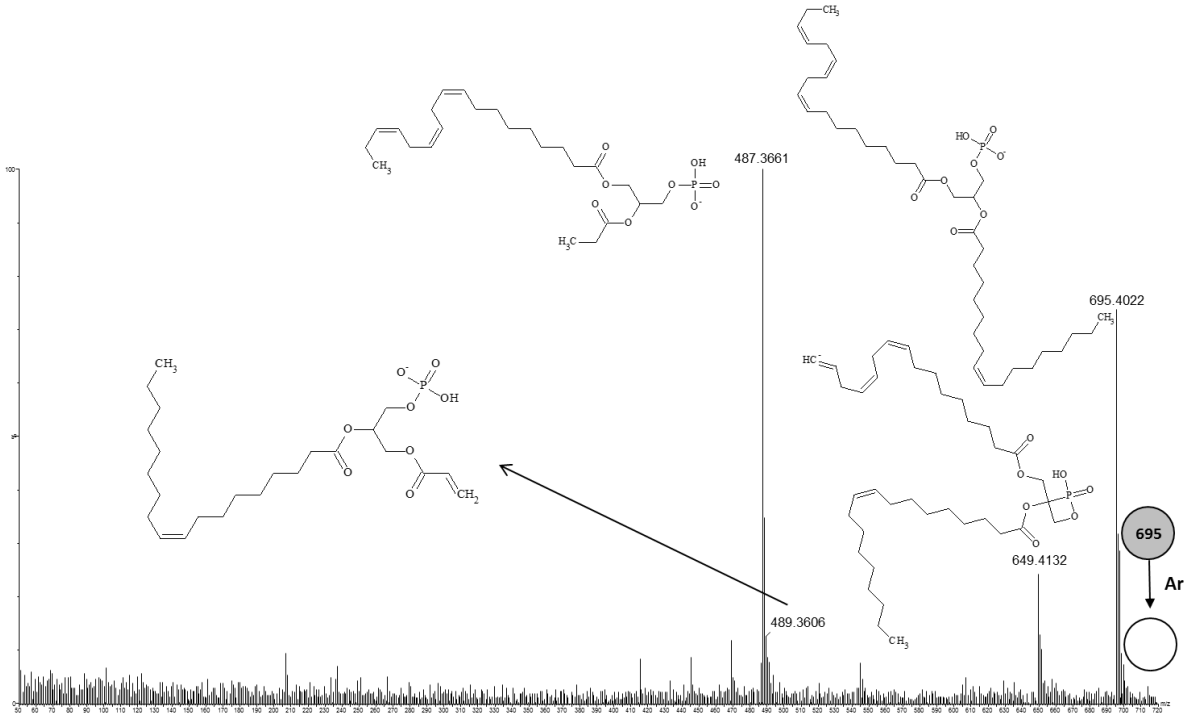
Espectro de fragmentação do metabólito Histidinyl-Valine (*m/z*: 253.1331; erro de massa: 9 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

Lindleyin (*m/z*: 477.1391)



Espectro de fragmentação do metabólito Lindleyin (*m/z*: 477.1391; erro de massa: 2 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

PA(18 3(9Z,12Z,15Z) 18 1(9Z)) (*m/z*: 695.4024)



Espectro de fragmentação do metabólito PA(18 3(9Z,12Z,15Z) 18 1(9Z)) (*m/z*: 695.4024; erro de massa: 91 ppm). Estão representados a molécula precursora e os três fragmentos mais intensos

Anexo B – Lista de proteínas relacionadas à resposta imune / estresse comuns a todas as condições

Tabela 10 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continua)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.A00159.1	MLP-like protein 423	GO:0006952,GO:0009607	-0.78	8.54	0.16	0.11	3.53	3.41	-8.25	-0.07
Eucgr.A00373.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	GO:0006950	-0.03	-8.25	9.43	-9.44	-12.49	4.08	8.23	4.59
Eucgr.A02564.1	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein	-	3.60	0.00	-3.72	0.00	0.00	0.00	7.73	0.00
Eucgr.A02691.1	ascorbate peroxidase 3	GO:0055114,GO:0020037,GO:0006979, GO:0004601	-1.44	0.00	0.00	0.00	0.00	14.14	0.00	0.00
Eucgr.B01760.1	copper/zinc superoxide dismutase 1	GO:0046872,GO:0006801,GO:0055114	-0.98	-5.24	-0.05	-0.36	-0.25	-0.20	-7.97	14.35
Eucgr.B02294.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	GO:0006950	-9.56	3.67	0.00	-8.71	-0.16	-3.62	0.37	-9.08
Eucgr.B02456.1	ascorbate peroxidase 1	GO:0004601,GO:0020037,GO:0006979, GO:0055114	-9.48	0.09	0.03	-6.02	-0.23	-5.95	0.31	5.80
Eucgr.B02456.3	ascorbate peroxidase 1	GO:0004601,GO:0020037,GO:0006979, GO:0055114	0.00	0.00	0.00	6.18	0.00	4.04	0.00	-5.73
Eucgr.B02546.1	MLP-like protein 423	GO:0006952,GO:0009607	-0.41	0.47	0.28	-0.34	0.19	0.11	0.18	-0.65
Eucgr.B02903.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	GO:0004672,GO:0005524,GO:0006468, GO:0005515	10.95	0.00	0.00	0.00	0.00	-4.61	0.00	0.00
Eucgr.B03110.1	Chaperone protein htpG family protein	GO:0005524,GO:0051082,GO:0006457, GO:0006950	0.04	-0.10	-0.36	-8.11	0.07	-9.03	-0.18	-0.09
Eucgr.B03671.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	GO:0005515	0.00	-0.22	0.00	0.00	-3.90	0.00	-2.65	0.00
Eucgr.B03930.6	copper/zinc superoxide dismutase 2	GO:0046872,GO:0006801,GO:0055114	-0.32	-0.61	15.06	-6.89	8.76	0.24	0.00	-0.29
Eucgr.C01179.1	HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	GO:0005524,GO:0051082,GO:0006457, GO:0006950	6.65	-0.91	-0.98	3.65	-7.95	7.97	7.16	0.35
Eucgr.C03354.1	germin 3	GO:0045735	6.58	0.00	-0.41	7.14	0.33	-6.10	0.39	-7.95

Tabela 10 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.C03557.1	Stress responsive alpha-beta barrel domain protein	-	-9.38	-8.03	9.04	8.05	-0.20	-0.22	8.69	-0.39
Eucgr.C03812.1	thioredoxin-dependent peroxidase 1	GO:0016209,GO:0016491,GO:0055114	-9.14	0.00	-0.10	6.60	-5.88	6.66	8.32	7.70
Eucgr.C03812.2	thioredoxin-dependent peroxidase 1	GO:0016209,GO:0016491,GO:0055114	0.00	0.20	0.00	-6.12	6.36	-6.27	0.00	0.00
Eucgr.D02024.2	stress-inducible protein, putative	GO:0005515	3.78	3.64	3.11	0.19	0.00	-3.66	3.77	0.00
Eucgr.E00105.1	Pectin lyase-like superfamily protein	GO:0004650,GO:0005975	-0.20	-2.88	-2.99	-3.20	-3.97	0.00	2.40	-3.37
Eucgr.E00279.1	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	-	8.07	0.86	8.11	-0.27	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.E00579.1	glutathione peroxidase 6	GO:0004602,GO:0006979,GO:0055114	4.32	13.25	0.00	-8.92	0.32	0.12	0.47	8.80
Eucgr.E01024.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	GO:0005524	0.33	0.80	-8.99	0.51	8.09	0.54	0.05	-0.51
Eucgr.E01170.3	Pectinacetylesterase family protein	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.14	0.00	0.00
Eucgr.E01170.6	Pectinacetylesterase family protein	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-12.13
Eucgr.E02058.1	-	GO:0006950	-0.40	0.81	0.57	-0.04	-8.02	0.76	9.47	-8.55
Eucgr.F00373.4	ascorbate peroxidase 4	GO:0004601,GO:0020037,GO:0006979, GO:0055114	12.26	0.00	0.00	3.73	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.F01378.4	Chalcone-flavanone isomerase family protein	GO:0016872,GO:0042398	1.60	1.87	-4.20	4.63	0.39	3.76	3.71	0.01
Eucgr.F01775.1	catalase 2	GO:0004096,GO:0020037,GO:0055114, GO:0006979,GO:0005506	0.00	6.20	5.18	-0.24	4.65	0.00	4.41	0.00
Eucgr.F01776.1	catalase 2	GO:0004096,GO:0020037,GO:0055114, GO:0006979,GO:0005506	-0.15	-0.09	-0.56	0.40	-0.24	-8.92	-7.80	8.76
Eucgr.F01777.1	catalase 2	GO:0004096,GO:0005506,GO:0020037, GO:0055114,GO:0006979	-0.16	-7.58	-0.49	0.09	-0.13	-0.25	-0.39	-0.22

Tabela 10 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.F03557.1	catalase 2	GO:0004096,GO:0020037,GO:0055114, GO:0006979,GO:0005506	-7.99	-0.05	-0.21	0.20	-0.20	-0.49	-8.48	7.78
Eucgr.F03673.1	HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	GO:0005524,GO:0051082,GO:0006457, GO:0006950	-0.99	0.00	-3.40	4.83	1.67	0.00	-1.14	-3.69
Eucgr.F03707.1	chloroplastic drought-induced stress protein of 32 kD	GO:0045454,GO:0015035,GO:0009055, GO:0006662	0.37	-7.73	-0.29	-7.92	-8.07	-0.45	-0.32	-0.33
Eucgr.F03816.1	Chalcone-flavanone isomerase family protein	GO:0016872,GO:0042398	-1.27	13.87	4.25	-0.35	0.53	-5.26	9.35	-9.28
Eucgr.F03862.1	phospholipase D alpha 1	GO:0005515,GO:0003824,GO:0008152	-0.06	0.07	-0.31	0.62	-0.24	7.61	-0.30	-0.20
Eucgr.F03980.1	heat shock protein 70B	GO:0005524	0.78	8.48	11.68	7.55	10.09	-16.41	0.42	-0.33
Eucgr.F04195.1	Peroxidase superfamily protein	GO:0004601,GO:0020037,GO:0006979, GO:0055114	-2.65	0.00	0.00	0.00	-0.58	0.00	0.00	0.00
Eucgr.F04219.1	-	GO:0006950	-0.21	7.57	0.39	-7.83	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.F04344.2	thylakoidal ascorbate peroxidase	GO:0004601,GO:0020037,GO:0006979, GO:0055114	8.25	0.00	-0.36	0.58	-0.05	8.74	-0.08	-0.57
Eucgr.F04417.1	germin 3	GO:0045735	0.04	-0.07	7.89	-0.10	-0.09	0.00	-0.21	-0.76
Eucgr.G00235.1	chloroplast heat shock protein 70-2	GO:0005524	10.75	-1.77	0.00	2.38	0.00	-5.53	0.00	12.85
Eucgr.G03132.1	manganese superoxide dismutase 1	GO:0004784,GO:0046872,GO:0006801, GO:0055114	-0.29	8.72	-9.08	0.10	0.00	8.50	-4.35	-0.32
Eucgr.G03138.3	Chalcone-flavanone isomerase family protein	GO:0016872,GO:0042398	-0.08	-0.23	-0.37	1.08	9.06	-0.31	-0.15	-8.74
Eucgr.H02866.1	heat shock protein 60	GO:0005524,GO:0044267	-0.28	-7.81	0.07	0.24	-0.13	-0.13	8.17	-0.36
Eucgr.H03981.1	MLP-like protein 423	GO:0006952,GO:0009607	-9.20	0.06	0.19	7.12	-7.70	8.99	0.14	-0.20
Eucgr.H03983.1	MLP-like protein 423	GO:0006952,GO:0009607	-0.29	-8.33	0.15	-0.04	0.22	0.30	0.13	-8.51
Eucgr.H04426.2	copper/zinc superoxide dismutase 1	GO:0046872,GO:0006801,GO:0055114	-10.13	-4.63	0.00	0.00	0.00	4.92	4.30	-4.51
Eucgr.I00424.1	Lipase/lipooxygenase, PLAT/LH2 family protein	GO:0005515	0.00	4.87	0.00	4.09	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.I01408.1	ascorbate peroxidase 3	GO:0004601,GO:0020037,GO:0006979, GO:0055114	-9.16	0.10	4.51	-9.17	-9.35	-4.82	0.68	-0.38

Tabela 10 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(conclusão)

N. de Acesso da Proteína	**Descrição**	***Gene Ontologies***	**Resistentes**				**Susceptíveis**			
			6hpi	**12hpi**	**18hpi**	**24hpi**	**6hpi**	**12hpi**	**18hpi**	**24hpi**
Eucgr.I02771.1	chloroplast heat shock protein 70-2	GO:0005524	-8.37	-0.31	8.47	0.12	8.20	1.07	-0.14	0.06
Eucgr.J00025.1	heat shock protein 70	GO:0005524	9.07	6.53	-0.08	0.08	-9.23	-6.21	-0.10	-8.35
Eucgr.J00025.2	heat shock protein 70	GO:0005524	0.00	-15.15	0.00	0.00	0.00	6.20	0.00	0.00
Eucgr.J00434.1	Stress responsive A/B Barrel Domain	-	0.00	0.00	11.71	0.00	0.00	-3.30	0.00	-3.63
Eucgr.J00965.1	ascorbate peroxidase 1	GO:0004601,GO:0020037,GO:0006979, GO:0055114	-0.41	8.59	-0.37	-0.34	0.27	-0.50	1.00	0.06
Eucgr.J02061.1	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	-	-0.55	0.00	0.00	0.00	5.01	0.00	0.00	0.00
Eucgr.J02987.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	GO:0005524	2.49	2.78	-2.88	8.57	-0.13	-3.12	-0.06	-0.64
Eucgr.J03127.2	heat shock protein 70B	GO:0005524	8.55	-0.89	14.89	0.42	0.08	9.20	-0.23	-0.17

Anexo C – Lista de proteínas relacionadas à energia comuns a todas as condições

Tabela 11 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continua)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.A00052.1	2-isopropylmalate synthase 1	GO:0003824,GO:0003852,GO:0009098	-0.49	7.95	-0.38	0.09	-0.04	-0.23	0.09	-0.19
Eucgr.A01129.1	aconitase 3	GO:0008152	0.61	0.20	0.79	9.61	-0.55	0.57	-1.30	6.13
Eucgr.A01135.1	isocitrate dehydrogenase V	GO:0016616,GO:0055114,GO:0051287, GO:0000287	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.82	0.00	3.72
Eucgr.A01538.1	Aldolase superfamily protein	GO:0004332,GO:0006096	6.03	8.83	-0.91	-0.08	-0.06	-5.34	8.05	0.03
Eucgr.A01538.2	Aldolase superfamily protein	GO:0004332,GO:0006096	-6.58	0.00	0.00	0.00	0.00	4.99	0.00	0.00
Eucgr.B00038.1	cytochrome C oxidase 6B	GO:0004129,GO:0005739	8.10	-8.59	-8.87	-8.23	0.50	-3.50	-0.43	-0.19
Eucgr.B00108.1	chlorsulfuron/imidazolinone resistant 1	GO:0000287,GO:0030976,GO:0003824	0.04	2.72	-11.29	-0.23	-0.33	-3.11	0.00	-3.10
Eucgr.B00144.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1	GO:0016620,GO:0055114	-0.05	2.19	-2.37	0.00	0.00	-1.97	2.64	-9.93
Eucgr.B00511.1	malate dehydrogenase	GO:0016491,GO:0055114,GO:0016616, GO:0030060,GO:0006108	0.00	0.00	0.00	0.00	2.55	2.01	-8.99	0.00
Eucgr.B00589.1	gamma subunit of Mt ATP synthase	GO:0046933,GO:0046961,GO:0015986, GO:0045261	-8.42	0.13	-0.09	9.02	-0.34	-3.81	-8.74	7.69
Eucgr.B02864.1	Aldolase superfamily protein	GO:0004332,GO:0006096	0.00	0.00	0.00	0.00	-5.35	-5.13	-0.02	-0.55
Eucgr.B02878.1	ATP synthase alpha/beta family protein	GO:0005524,GO:0016820,GO:0015991, GO:0033178,GO:0046933,GO:0046961, GO:0015992,GO:0046034,GO:0016469, GO:0016887,GO:0006200,GO:0006754, GO:0000275,GO:0045261,GO:0015986, GO:0008553	8.09	7.54	-0.28	8.58	-7.74	8.35	8.18	0.00
Eucgr.B03379.1	pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit	GO:0016624,GO:0008152	7.86	0.00	-0.36	8.70	-9.42	0.00	8.29	-7.99
Eucgr.B03528.1	glucose-6-phosphate dehydrogenase 2	GO:0004345,GO:0050661,GO:0006006, GO:0055114	0.33	0.00	0.00	-3.26	11.72	0.00	-2.87	-3.12

Tabela 11 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.B03603.1	Mitochondrial substrate carrier family protein	-	-0.30	8.40	-0.33	0.05	6.97	-0.45	-0.37	-0.08
Eucgr.C01792.1	Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14kDa subunit	GO:0008121,GO:0006122	3.46	0.00	-3.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.C02765.1	ATPase, F0 complex, subunit B/B\', bacterial/chloroplast	GO:0015078,GO:0015986,GO:0045263	-0.04	0.66	-7.87	5.72	-0.50	-9.14	7.77	-0.44
Eucgr.D01688.1	Phosphoenolpyruvate carboxylase family protein	GO:0016830,GO:0006725	0.00	0.00	0.00	0.00	3.29	0.00	0.00	-3.28
Eucgr.D02166.1	plastidial pyruvate kinase 3	GO:0000287,GO:0004743,GO:0030955, GO:0006096	-0.18	0.00	0.00	0.00	-0.42	-11.64	-0.08	-0.35
Eucgr.E00280.1	Mitochondrial substrate carrier family protein	-	-0.01	0.31	8.16	0.15	8.95	-0.79	8.42	-8.17
Eucgr.E01702.1	ATPase, F1 complex, delta/epsilon subunit	GO:0046933,GO:0046961,GO:0015986, GO:0045261	0.00	0.00	0.00	-3.53	0.00	12.51	0.00	0.00
Eucgr.E03983.1	Phosphofructokinase family protein	GO:0006096,GO:0005945,GO:0003872	-9.20	0.00	-3.11	-0.32	-0.32	8.85	3.26	-0.37
Eucgr.E04053.1	ATPase, F1 complex, gamma subunit protein	GO:0046933,GO:0046961,GO:0015986, GO:0045261	-0.06	-0.38	-0.21	-8.78	7.98	-0.17	9.10	-9.44
Eucgr.F00243.1	succinate dehydrogenase 5	-	-0.66	0.27	0.38	-0.17	8.37	0.71	-0.26	-0.33
Eucgr.F00755.1	ATPase, F1 complex, gamma subunit protein	GO:0046933,GO:0046961,GO:0015986, GO:0045261	5.35	15.05	6.33	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00
Eucgr.F01209.1	Lactate/malate dehydrogenase family protein	GO:0016491,GO:0055114,GO:0016616, GO:0030060,GO:0006108	0.23	-0.09	0.01	0.20	0.16	7.98	-0.05	0.18
Eucgr.F01476.1	Phosphoglycerate kinase family protein	GO:0004618,GO:0006096	-0.05	-8.67	-0.22	0.43	-10.01	7.22	8.15	7.98
Eucgr.F01793.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit	GO:0016620,GO:0055114	-0.17	0.04	-0.20	-0.04	7.24	-0.55	8.27	0.01
Eucgr.F01823.2	Phosphofructokinase family protein	GO:0006096,GO:0005945,GO:0003872	-8.70	3.24	0.00	-8.41	-13.36	-3.67	-0.27	8.67

Tabela 11 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.F02017.1	Aldolase superfamily protein	GO:0004332,GO:0006096	0.26	0.19	0.12	8.26	-8.12	-0.68	-0.22	8.73
Eucgr.F02133.1	phosphoglucose isomerase 1	GO:0004347,GO:0006094,GO:0006096	-9.16	-0.49	3.26	0.10	-8.78	-6.54	0.08	-8.37
Eucgr.F02551.1	Rubredoxin-like superfamily protein	GO:0004129,GO:0005740	-0.17	0.00	0.47	5.74	-5.61	0.00	0.16	-5.81
Eucgr.F02901.1	cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase	GO:0016616,GO:0055114,GO:0006102, GO:0004450	-0.68	-0.12	8.05	0.09	-4.89	-3.64	8.83	0.23
Eucgr.F03251.1	Lactate/malate dehydrogenase family protein	GO:0016491,GO:0055114,GO:0016616, GO:0030060,GO:0006108	8.13	-7.90	-10.11	-8.95	-0.36	-0.11	0.20	-8.86
Eucgr.F03933.1	isopropylmalate dehydrogenase 2	GO:0016616,GO:0055114,GO:0051287, GO:0000287,GO:0009098,GO:0005737, GO:0003862	0.29	0.05	-0.03	-0.18	-7.91	0.59	0.03	7.72
Eucgr.F04149.1	ATP synthase delta-subunit gene	GO:0046933,GO:0015986,GO:0005886, GO:0045261	0.00	7.77	0.00	7.60	0.00	9.88	-0.16	-16.53
Eucgr.F04149.2	ATP synthase delta-subunit gene	GO:0046933,GO:0015986,GO:0045261, GO:0005886	0.00	0.00	7.29	-7.58	0.24	0.00	0.00	7.57
Eucgr.F04458.3	mercaptopyruvate sulfurtransferase 1	-	0.00	-2.97	0.10	-0.33	3.66	0.00	-0.16	-9.93
Eucgr.F04463.1	phosphoglycerate kinase	GO:0004618,GO:0006096	0.39	9.26	-0.50	0.38	-0.11	8.19	8.39	-0.09
Eucgr.F04466.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 2	GO:0016620,GO:0055114	-8.45	1.08	-0.26	0.33	-9.76	-0.47	0.37	-3.72
Eucgr.G01726.1	fructose-bisphosphate aldolase 2	GO:0004332,GO:0006096	0.16	-7.99	-0.09	8.54	-0.28	-8.84	7.78	8.41
Eucgr.G02804.1	ATP synthase D chain, mitochondrial	GO:0015986,GO:0015078,GO:0000276	-8.85	-8.34	0.63	-0.43	8.12	8.33	-0.14	8.30
Eucgr.G03387.1	ADP/ATP carrier 2	-	-4.05	-8.49	0.00	0.21	3.77	-12.35	-0.08	-10.54
Eucgr.G03388.1	ADP/ATP carrier 2	-	0.00	0.00	-12.00	-0.16	-4.81	-13.04	-3.86	0.11
Eucgr.G03412.1	Citrate synthase family protein	GO:0046912,GO:0044262	-3.80	8.87	0.00	4.06	4.43	0.00	0.00	-3.42

Tabela 11 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.H02358.1	peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 1	GO:0016491,GO:0055114,GO:0016616, GO:0030060,GO:0006108	15.70	7.15	0.00	-7.19	-1.03	0.00	15.69	0.00
Eucgr.H02358.5	peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 1	GO:0016491,GO:0055114,GO:0016616, GO:0030060,GO:0006108	-6.80	-6.87	-0.26	7.36	0.00	-0.07	-6.83	-0.17
Eucgr.H02913.3	isopropyl malate isomerase large subunit 1	GO:0008152	-0.59	0.00	-15.29	-12.74	4.22	-11.67	2.43	-12.34
Eucgr.H02991.1	ATPase, F0 complex, subunit B/B\', bacterial/chloroplast	GO:0015078,GO:0015986,GO:0045263	-8.72	-7.56	-0.51	8.47	-0.04	7.72	-0.05	-8.88
Eucgr.H03047.1	Lactate/malate dehydrogenase family protein	GO:0016491,GO:0055114,GO:0016616, GO:0016615,GO:0006108	8.40	0.20	8.29	-0.19	1.33	6.78	0.05	-0.16
Eucgr.H03642.1	pyruvate orthophosphate dikinase	GO:0016772,GO:0016310,GO:0005524, GO:0016301	2.65	0.00	0.00	3.34	0.00	-11.52	0.00	0.00
Eucgr.H04045.1	ATP citrate lyase subunit B 2	GO:0003824,GO:0008152,GO:0046912, GO:0044262	-0.28	-0.17	8.29	-7.95	8.78	-9.21	-7.45	8.07
Eucgr.H04086.1	mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1	GO:0016491,GO:0050660,GO:0055114, GO:0045454,GO:0005737,GO:0004148	0.21	-0.30	-0.19	0.11	-0.42	-0.40	-0.29	0.15
Eucgr.H04673.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	GO:0016620,GO:0055114	-0.22	0.58	-0.44	0.58	0.06	-9.62	0.03	-7.74
Eucgr.I00055.1	ATP-citrate lyase B-1	GO:0003824,GO:0008152,GO:0046912, GO:0044262	0.71	-0.24	-3.09	4.04	-0.12	-3.64	0.00	3.52
Eucgr.I01326.1	fructose-bisphosphate aldolase 2	GO:0004332,GO:0006096	-0.28	0.72	-8.86	9.46	-8.86	0.05	0.11	-0.26
Eucgr.I01326.2	fructose-bisphosphate aldolase 1	GO:0004332,GO:0006096	-17.32	8.56	-0.04	-16.77	0.00	0.00	-8.10	8.58
Eucgr.I01374.1	triosephosphate isomerase	GO:0004807,GO:0008152	0.00	0.00	0.00	0.00	8.05	0.12	-0.03	-0.03
Eucgr.I01423.2	hydroxypyruvate reductase	GO:0016616,GO:0051287,GO:0008152, GO:0055114,GO:0048037	0.00	9.61	-0.37	0.27	-9.02	0.46	-8.49	-0.19
Eucgr.I01510.2	isocitrate dehydrogenase 1	GO:0016616,GO:0055114,GO:0051287, GO:0000287	8.31	-3.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabela 11 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(conclusão)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.I01987.1	delta subunit of Mt ATP synthase	GO:0046933,GO:0045261,GO:0015986, GO:0005886	-9.36	3.92	3.63	-8.42	0.00	-11.79	-3.63	4.30
Eucgr.I02307.2	aconitase 1	GO:0008152	-0.39	-7.81	7.47	0.34	-1.05	-0.30	0.02	0.14
Eucgr.I02452.1	succinate dehydrogenase 1-1	GO:0009055,GO:0016491,GO:0055114	-0.45	-0.41	-12.15	-0.21	-0.38	-3.28	-6.94	-2.59
Eucgr.I02583.1	mitochondrial HSO70 2	GO:0005524	3.62	-2.54	11.61	8.43	-10.08	-3.41	8.14	8.09
Eucgr.J00008.1	triosephosphate isomerase	GO:0004807,GO:0008152	0.03	0.20	-0.31	-0.06	6.97	-6.74	-0.38	-0.13
Eucgr.J00347.1	succinate dehydrogenase 2-2	-	2.86	2.76	-11.34	3.48	0.00	-3.07	2.44	0.00
Eucgr.J01037.1	lactate/malate dehydrogenase family protein	GO:0016491,GO:0055114,GO:0016616, GO:0016615,GO:0006108	13.73	5.46	0.00	0.00	0.00	-0.40	0.00	0.00
Eucgr.J01037.4	lactate/malate dehydrogenase family protein	GO:0016491,GO:0055114,GO:0016616, GO:0016615,GO:0006108	-5.28	-4.57	4.79	0.20	-8.56	0.00	7.82	7.68
Eucgr.J01621.1	NADH-ubiquinone dehydrogenase, mitochondrial, putative	GO:0016491,GO:0016651,GO:0051536, GO:0055114,GO:0009055	8.72	8.44	-2.77	3.68	-0.26	-0.12	9.04	-0.18
Eucgr.J02049.2	triosephosphate isomerase	GO:0004807,GO:0008152	3.29	2.86	2.85	-1.05	-3.21	0.00	-0.07	-0.29
Eucgr.J02731.1	ATP synthase epsilon chain	GO:0046961,GO:0046933,GO:0045261, GO:0015986	6.06	0.00	0.00	0.00	-0.48	-6.04	0.00	6.47
Eucgr.K00618.2	glucose-6-phosphate dehydrogenase 1	GO:0004345,GO:0050661,GO:0006006, GO:0055114	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.79	0.00	0.00
Eucgr.K01637.1	Pyruvate kinase family protein	GO:0000287,GO:0004743,GO:0030955, GO:0006096	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.42	-3.31	0.00	0.00
Eucgr.K02073.1	Aldolase superfamily protein	GO:0004332,GO:0006096	-9.56	4.57	4.83	-0.49	-0.63	-4.75	-8.05	-8.81
Eucgr.K02073.2	Aldolase superfamily protein	GO:0004332,GO:0006096	0.00	-4.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.K02074.2	Pyruvate kinase family protein	GO:0000287,GO:0004743,GO:0030955, GO:0006096	-3.81	0.00	0.00	0.00	-7.30	-5.76	-0.90	2.97

Anexo D – Lista de proteínas relacionadas à parede celular / produção de carboidratos comuns a todas as condições

Tabela 12 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continua)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.A00264.1	photosystem II reaction center protein B	GO:0019684,GO:0016168,GO:0016020, GO:0009767,GO:0009521	-15.98	0.00	-9.48	0.78	-1.49	0.00	-0.20	6.43
Eucgr.A01047.1	photosystem II light harvesting complex gene 2.2	GO:0016020,GO:0009765	-0.82	-8.72	-0.45	-8.47	-0.30	-0.84	0.07	0.33
Eucgr.A01769.1	photosynthetic electron transfer C	GO:0016491,GO:0051537,GO:0055114, GO:0009496,GO:0042651,GO:0016679	0.12	-8.35	0.24	-0.16	8.97	8.76	-0.21	8.64
Eucgr.A01774.2	photosystem II reaction center PSB29 protein	GO:0010027,GO:0015979,GO:0009523	0.21	-3.87	-9.76	4.66	-4.63	4.10	-8.63	-0.42
Eucgr.A02039.1	photosystem II subunit P-1	GO:0005509,GO:0015979,GO:0009523, GO:0009654,GO:0019898	-0.18	0.22	-0.27	8.47	8.72	-9.20	0.12	0.09
Eucgr.B00523.1	light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4	GO:0016020,GO:0009765	0.00	0.00	-4.35	4.90	0.00	-4.46	-6.89	-1.14
Eucgr.B00532.4	D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	GO:0004750,GO:0005975	0.00	0.00	-0.87	-6.80	5.48	0.00	-0.15	0.24
Eucgr.B00532.5	D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	GO:0004750,GO:0005975	-5.67	-4.78	0.00	14.79	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.B01088.1	photosystem I subunit D-2	GO:0015979,GO:0009522,GO:0009538	-8.23	0.20	0.13	0.70	-9.26	0.38	7.99	0.92
Eucgr.B01108.2	ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	GO:0016779,GO:0009058	4.78	-0.38	-0.38	-8.86	-5.01	-12.93	7.95	0.38
Eucgr.B02162.1	photosystem I subunit E-2	GO:0015979,GO:0009522,GO:0009538	-7.89	0.55	-0.15	7.80	-0.26	-0.14	9.17	-8.04
Eucgr.B02180.3	non-photochemical quenching 1	GO:0046422,GO:0055114,GO:0009507	0.00	0.00	0.00	-11.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.B02278.1	alpha-glucan phosphorylase 2	GO:0004645,GO:0005975	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.94	-3.60	0.00	-0.04
Eucgr.B02310.1	rubisco activase	GO:0005524	-0.41	-8.50	0.18	-0.35	-0.18	-1.26	-0.19	-8.50
Eucgr.B02755.1	high cyclic electron flow 1	GO:0042578,GO:0005975	-0.19	-8.80	-8.58	-0.56	-0.14	-6.35	0.65	1.23

Tabela 12 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.B02942.2	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	GO:0016868,GO:0005975	0.35	0.19	-0.86	0.23	0.04	-8.82	-0.38	0.16
Eucgr.B03013.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	GO:0016984,GO:0015977	0.26	0.26	8.82	-0.17	0.20	-1.54	8.20	-0.30
Eucgr.B03494.1	photosystem I light harvesting complex gene 2	GO:0016020,GO:0009765	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-6.18
Eucgr.C03199.1	sucrose synthase 4	GO:0009058,GO:0005985	-0.15	-0.08	-0.61	0.57	-0.61	-9.33	-7.69	-0.19
Eucgr.C03525.1	ribulose-bisphosphate carboxylases	GO:0000287,GO:0016984,GO:0015977	-7.31	0.25	0.60	0.19	0.34	-0.83	-0.49	8.09
Eucgr.D00319.1	chlorophyll A/B binding protein 1	GO:0016020,GO:0009765	-0.04	-8.59	8.19	-0.49	0.95	-0.53	-0.37	-7.63
Eucgr.D00321.1	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	GO:0016020,GO:0009765	6.88	-6.15	0.00	0.00	0.00	-15.60	0.00	0.00
Eucgr.D00322.1	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	GO:0016020,GO:0009765	-8.38	0.00	-9.43	-8.39	0.33	0.00	-8.52	0.34
Eucgr.D00551.1	magnesium chelatase i2	GO:0016851,GO:0015995,GO:0015979	-0.24	-0.28	0.12	-8.35	-0.11	-0.02	-8.54	-0.16
Eucgr.D00854.1	photosystem II subunit Q-2	GO:0005509,GO:0015979,GO:0009523, GO:0009654,GO:0019898	-0.03	0.23	0.27	-0.05	8.36	-0.15	-0.12	0.03
Eucgr.D02030.1	Aldolase superfamily protein	GO:0005975	-0.25	-8.49	-8.82	-0.17	0.29	-12.15	-0.03	7.60
Eucgr.D02221.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	GO:0005198,GO:0009507	3.52	0.89	8.21	7.91	-9.34	-3.54	-0.13	8.35
Eucgr.D02466.1	Transketolase	GO:0003824,GO:0008152	0.20	-0.08	-0.51	-9.95	-6.07	5.60	-0.27	7.73
Eucgr.D02467.1	Transketolase	GO:0003824,GO:0008152	0.15	0.17	8.08	8.68	-9.13	-0.57	8.41	-0.09
Eucgr.E00015.1	photosystem I P subunit	-	0.19	0.86	0.24	7.51	-1.16	-8.49	-0.56	0.14
Eucgr.E00105.1	Pectin lyase-like superfamily protein	GO:0004650,GO:0005975	-0.20	-2.88	-2.99	-3.20	-3.97	0.00	2.40	-3.37
Eucgr.E01113.1	photosynthetic electron transfer A	GO:0005506,GO:0009055,GO:0020037, GO:0015979,GO:0031361	-0.58	-0.08	-0.08	-0.01	6.74	-0.53	-0.22	-0.13

Tabela 12 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.E01909.2	Transketolase family protein	GO:0003824,GO:0008152	0.00	0.00	-3.74	8.52	0.00	0.00	0.00	0.00
Eucgr.E02381.1	light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	GO:0016020,GO:0009765	0.00	-6.89	-8.09	-7.74	0.00	-7.96	8.09	0.00
Eucgr.E02606.1	photosynthetic electron transfer A	GO:0005506,GO:0009055,GO:0020037, GO:0015979,GO:0031361	0.35	0.00	-1.33	0.26	-0.46	-5.54	-0.37	0.12
Eucgr.E03981.1	fibrillin	GO:0005198,GO:0009507	0.06	0.11	0.07	-0.05	3.36	9.23	8.63	8.20
Eucgr.F01067.3	photosynthetic electron transfer C	GO:0009496,GO:0051537,GO:0055114, GO:0042651,GO:0016491,GO:0016679	0.34	0.18	-9.90	-0.13	-0.21	7.25	-0.23	-0.08
Eucgr.F01077.1	light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	GO:0016020,GO:0009765	-9.01	0.00	-0.04	0.28	-5.07	0.00	0.02	-8.31
Eucgr.F01822.2	Photosystem II reaction center PsbP family protein	-	-4.22	0.05	0.20	-8.63	9.47	3.63	-0.11	-0.11
Eucgr.F02133.1	phosphoglucose isomerase 1	GO:0004347,GO:0006094,GO:0006096	-9.16	-0.49	3.26	0.10	-8.78	-6.54	0.08	-8.37
Eucgr.F02479.1	allene oxide cyclase 4	GO:0016853,GO:0009507	-0.03	0.00	-0.08	-9.46	0.65	-8.48	0.01	0.16
Eucgr.F02481.1	acclimation of photosynthesis to environment	-	12.65	0.19	3.52	0.00	0.00	-4.27	-0.17	14.28
Eucgr.F02506.1	Transketolase family protein	GO:0003824,GO:0008152	0.08	-8.03	-1.19	-0.46	0.48	-4.57	-0.22	-8.52
Eucgr.F02711.1	Inositol monophosphatase family protein	GO:0042578,GO:0005975	-0.01	8.69	4.57	5.17	4.63	-4.82	8.36	-0.11
Eucgr.F02711.2	Inositol monophosphatase family protein	GO:0042578,GO:0005975	0.00	0.00	0.00	-5.20	0.00	12.13	0.00	0.00
Eucgr.F02746.1	Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	GO:0019898,GO:0015979,GO:0009654, GO:0009523,GO:0005509	0.00	0.00	12.54	-0.35	0.00	0.00	-2.68	0.00
Eucgr.F03139.1	glyoxylate reductase 2	GO:0004616,GO:0006098,GO:0055114, GO:0016491	-0.16	12.95	-0.58	0.06	0.14	-8.57	-7.82	9.26
Eucgr.F03186.8	photosystem II subunit R	GO:0015979,GO:0009523,GO:0009654, GO:0042651	-7.01	-0.57	-0.01	7.66	-6.72	9.12	-0.14	-0.23

Tabela 12 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.F03646.1	photosystem I subunit G	GO:0015979,GO:0009522,GO:0016020	0.00	6.30	5.72	-8.61	0.00	5.95	5.17	-6.43
Eucgr.F04099.1	light harvesting complex of photosystem II 5	GO:0016020,GO:0009765	-0.01	0.34	-0.11	0.77	-7.60	7.47	-8.52	-0.26
Eucgr.G00649.1	beta-D-xylosidase 4	GO:0004553,GO:0005975	-0.60	-0.30	-1.10	0.31	-0.26	-0.66	-8.20	-0.39
Eucgr.G00777.1	light harvesting complex photosystem II subunit 6	GO:0016020,GO:0009765	0.00	0.00	0.10	14.13	-0.47	-3.59	-9.04	-9.13
Eucgr.G01978.1	Aldolase-type TIM barrel family protein	GO:0005975	0.06	8.48	-0.85	0.33	-0.22	-0.58	-0.20	-8.61
Eucgr.G02043.1	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase	GO:0046406,GO:0015979,GO:0015995, GO:0008168,GO:0008152,GO:0008276, GO:0006479,GO:0005737	-0.10	-8.57	-0.13	-0.19	0.19	-0.57	-0.14	-0.02
Eucgr.G02327.1	alpha-xylosidase 1	GO:0004553,GO:0005975	-0.69	-0.30	-1.29	0.52	8.26	-0.64	-8.68	-0.34
Eucgr.G02488.1	PsbQ-like 2	GO:0005509,GO:0015979,GO:0009523, GO:0009654,GO:0019898	3.44	-0.06	3.32	8.20	3.47	-3.49	-0.62	8.43
Eucgr.G02904.1	PsbP-like protein 1	GO:0005509,GO:0015979,GO:0009523, GO:0009654,GO:0019898	0.62	0.39	0.14	-0.35	0.39	-0.38	-0.45	8.33
Eucgr.G03060.1	light harvesting complex photosystem II	GO:0016020,GO:0009765	7.32	7.88	-15.18	6.72	-7.14	-0.50	-0.52	-8.06
Eucgr.G03060.2	light harvesting complex photosystem II	GO:0016020,GO:0009765	0.00	0.00	5.83	-15.96	14.21	0.00	0.00	0.00
Eucgr.G03390.1	Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	GO:0019898,GO:0015979,GO:0009654, GO:0009523,GO:0005509	0.00	2.86	-8.85	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00
Eucgr.H00144.2	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	GO:0005198,GO:0009507	12.22	-8.32	12.50	-0.54	-3.75	-13.68	7.91	-0.19
Eucgr.H00828.1	photosystem I subunit E-2	GO:0015979,GO:0009522,GO:0009538	-0.64	-9.48	8.62	-0.34	4.37	-0.64	-4.58	8.07
Eucgr.H01287.4	Photosystem II reaction center PsbP family protein	GO:0005509,GO:0015979,GO:0009523, GO:0009654,GO:0019898	-9.14	0.77	-8.98	-8.36	0.17	-4.82	8.21	0.00
Eucgr.H01947.1	photosystem II reaction center protein D	GO:0045156,GO:0009772,GO:0019684, GO:0030077	0.00	0.00	-0.23	8.12	-6.54	0.00	0.20	6.09

Tabela 12 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(continuação)

N. de Acesso da Proteína	Descrição	*Gene Ontologies*	Resistentes				Susceptíveis			
			6hpi	12hpi	18hpi	24hpi	6hpi	12hpi	18hpi	24hpi
Eucgr.I00200.2	photosystem I reaction center subunit PSI-N, chloroplast, putative / PSI-N, putative (PSAN)	GO:0005516,GO:0015979,GO:0009522, GO:0042651	-0.11	0.37	0.20	7.98	8.66	0.02	-0.21	-8.42
Eucgr.I01025.1	photosystem II subunit O-2	GO:0005509,GO:0015979,GO:0042549, GO:0009523,GO:0009654,GO:0019898	8.38	0.12	0.43	0.06	0.12	0.31	-0.40	0.02
Eucgr.I01600.1	Glycosyl hydrolase family 38 protein	GO:0004559,GO:0005975,GO:0015923, GO:0006013,GO:0004553,GO:0008270	7.72	-0.15	-0.30	0.07	-0.02	8.72	-0.09	-0.06
Eucgr.I01666.1	Rubisco methyltransferase family protein	-	-9.08	0.00	-2.98	3.53	-0.58	0.00	-8.37	-0.30
Eucgr.I02092.2	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	GO:0004616,GO:0050661,GO:0006098, GO:0055114	-0.28	-0.30	0.00	0.15	-0.30	0.03	-2.21	-3.68
Eucgr.I02677.1	light harvesting complex photosystem II subunit 6	GO:0016020,GO:0009765	0.00	0.00	7.92	0.69	-0.21	-14.12	-7.97	-0.07
Eucgr.I02716.2	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	GO:0005198,GO:0009507	0.00	0.00	0.00	-12.70	0.00	0.00	3.23	7.68
Eucgr.J00242.1	sedoheptulose-bisphosphatase	GO:0042578,GO:0005975	-0.04	0.16	-0.18	9.12	-9.78	-10.10	-7.74	-0.16
Eucgr.J00326.1	alpha-galactosidase 1	GO:0005975,GO:0004553	-0.29	8.38	-0.24	-0.16	0.02	-8.74	-0.34	8.27
Eucgr.J00605.1	Glycosyl hydrolase family protein	GO:0004553,GO:0005975	-2.72	0.00	0.00	0.00	2.87	0.00	0.00	3.00
Eucgr.J00865.1	photosystem II stability/assembly factor, chloroplast (HCF136)	-	2.56	-4.87	-0.66	-0.70	0.59	-0.28	9.60	9.28
Eucgr.J01096.2	photosystem I light harvesting complex gene 1	GO:0016020,GO:0009765	0.00	0.73	-8.02	13.79	6.74	4.98	0.03	-9.37
Eucgr.J01234.1	rubisco activase	GO:0005524	0.25	9.48	8.09	-8.30	-0.42	-0.57	-0.03	-0.24
Eucgr.J01502.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	GO:0016984,GO:0015977	7.84	3.42	0.21	0.04	8.54	4.08	-0.04	-8.41

Tabela 12 – Número de acesso no Phytozome (*E. grandis*), descrição da proteína, termos de *Gene Ontology* (GO) e dados de *fold change* relativos ao cálculo da razão entre plantas inoculadas e plantas controle (log2(inoculado/controle))

(conclusão)

N. de Acesso da Proteína	**Descrição**	***Gene Ontologies***	**Resistentes**				**Susceptíveis**			
			6hpi	**12hpi**	**18hpi**	**24hpi**	**6hpi**	**12hpi**	**18hpi**	**24hpi**
Eucgr.J01502.2	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	GO:0016984,GO:0015977	0.71	0.11	0.19	0.17	-0.81	-0.15	1.08	7.13
Eucgr.J02030.1	rubisco activase	GO:0005524	0.09	8.42	0.03	-8.08	-0.23	-0.09	-0.13	8.28
Eucgr.K00185.2	phosphoglucomutase	GO:0016868,GO:0005975	-7.23	-9.17	-0.40	0.11	0.65	-0.42	-0.14	-0.19
Eucgr.K00389.1	photosystem I subunit F	GO:0015979,GO:0009522,GO:0009538	-0.16	-0.22	-0.27	-8.73	0.83	-8.05	-0.28	0.38
Eucgr.K00947.1	photosystem II family protein	-	-0.21	0.07	0.13	-0.51	-1.03	8.63	9.31	-0.10
Eucgr.K01362.1	photosystem I light harvesting complex gene 3	GO:0016020,GO:0009765	0.11	0.14	-0.01	0.55	-0.16	-0.54	0.04	-0.03
Eucgr.K01372.1	ADP glucose pyrophosphorylase 1	GO:0016779,GO:0009058	8.86	-0.85	-0.21	-8.32	-0.36	-0.28	8.38	8.30
Eucgr.K02223.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	GO:0016984,GO:0015977	8.81	-0.32	-1.10	0.12	-0.05	-11.47	-0.05	-0.53
Eucgr.K02346.1	glyoxylate reductase 1	GO:0004616,GO:0006098,GO:0055114, GO:0016491	-0.17	8.65	-0.49	0.11	-0.33	-12.40	8.12	-0.06
Eucgr.K02983.1	light harvesting complex photosystem II	GO:0016020,GO:0009765	-0.32	0.00	-9.64	9.22	-0.70	-1.31	0.33	7.27