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

**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*.**

Thiago Falda Leite

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

**Piracicaba
2012**

Thiago Falda Leite
Biólogo

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*.

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
2012

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

Leite, Thiago Falda

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*. / Thiago Falda Leite.- - Piracicaba, 2012.
160 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. *Eucalyptus grandis* 2. *Puccinia psidii* 3. Interação planta-patógeno 4. Histologia
5. Mecanismo de resistência genética 6. Transcriptômica 7. RNAseq. I. Título

CDD 634.9734
L533e

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

À minha amada família

*A meu pai **Luis** pelo exemplo de honestidade, garra, luta e de sempre procurar fazer o melhor.*

*À minha mãe **Cleusa** pela docura e amor com que me educou e pelo imenso valor e apoio que sempre deu a meus estudos.*

*A meus irmãos **Luiz Fernando, Felipe e Luiz Paulo** pelo amor, carinho, amizade e por sempre confiarem em meu potencial.*

*À minha Tia **Célia** (In memorian), por todo o amor e carinho.*

DEDICO

*A minha amada esposa **Jésica**, pelo amor, força, apoio incondicional e por abraçar esse sonho como se fosse seu.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela confiança em meu trabalho e por toda a orientação;

À CAPES e ao CNPq pelas concessões das bolsas;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ pelos ensinamentos transmitidos;

Ao amigo Dr. David Moon pelo companheirismo, confiança, parceria e inúmeras discussões ao longo do trabalho;

Ao amigo Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka, por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização de grande parte desse trabalho, pela orientação nas análises de microscopia, pela confiança e amizade construída ao longo desses anos;

À Dra. Mônica T.V. Labate pela amizade conselhos e agradável convivência;

À Livia Franceschini pelo companheirismo e apoio nas análises de Bioinformática;

Ao Prof. Dr. Roland Venkovsky pelo auxílio no planejamento do experimento;

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Franco Garcia pela disponibilidade e auxílio durante a análise dos dados;

Ao Prof. Dr. Gerhard Bandel pela disponibilização do micrótomo;

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

Ao amigo Rodrigo Stuart pelas discussões, idéias e sugestões no trabalho;

Ao amigo Luiz Felipe Boaretto, "Felipão", pela amizade, conversas, momentos de descontração e por me auxiliar nos primeiros passos desse trabalho;

À amiga Ilara Budzinski, "BUD", pela amizade companheirismo e discussões profissionais que permanecem desde os bons tempos da graduação;

Ao Dr. Esteban Gonzáles pelas sugestões e discussões acerca do trabalho;

À amiga e aluna de iniciação científica Ana Carolina Murad Lima por me acompanhar durante a maior parte do trabalho, pela agradável convivência e pela enorme responsabilidade e competência que demonstrou durante o tempo que trabalhamos juntos;

Aos amigos Leonardo Ferreira, Fernanda Salvato, Felipe Garbeline Marx e Juliana Calderan pela amizade e companheirismo;

Ao Amigo Dr. Pedro Barreto, pela agradável convivência e pelo exemplo de que conhecimento e humildade podem caminhar juntos;

Aos amigos do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, com quem tive a oportunidade de conviver ao longo desses anos: Dani Izilda, Janaina Borges, Julia Morozini, Larissa Prado, Hana Silva, Gabriela, Ana Paula Silveira, Sonia Andrade, Simone Guidetti, Ivan Mozol, Maria Carolina Quecine, Andressa Bini, Camila Ribeiro, Matheus Bonatto, Juliano Bragatto, Eduardo Camargo, Gunta Gutmanis, Gabriela Conti, Lilia Barbosa, Gisele Lacerda, Dani Gregório, Dani Nascimento, Rafael Carneiro e Alexander de Andrade;

Aos amigos Inocência Junior de Oliveira, Paula Martins Fabiane e Gabriel Margarido, por compartilhar das atividades que envolveram a representação discente e organização de eventos;

Ao Francisco Cláudio da Conceição Lopes, o grande amigo Claudião, pela amizade companheirismo e pela imprescindível ajuda com o programa R;

Aos grandes amigos Celso Fiori (PTI) e Ednilson Rabelo (Edi) pela amizade e companheirismo;

Aos amigos da Pós Graduação Diego Faleiro, Matheus Figueiredo, Ricardo Rodrigues, Hellen Penha, Andressa Morales e Lidinalva Gomes;

Ao meu Tio Wagner Falda pelo carinho com que me recebeu em Piracicaba e por toda amizade que se fortaleceu durante esses 5 anos;

Aos grandes amigos de Avaré Fernando de Oliveira Campos, Márcio Yoshizaky, Rafael Salgado e Silvano Porto Filho pela amizade construída desde a infância e por sempre estarem presentes em todos os momentos de minha vida.

*"Muitos fracassos na vida são de
pessoas que não perceberam o quanto
estavam perto do sucesso e desistiram"*

Thomas Edison

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Revisão Bibliográfica.....	18
1.1.1 O setor florestal no cenário mundial.....	18
1.1.2 O Setor florestal no Brasil.....	19
1.1.3 O gênero <i>Eucalyptus</i>	19
1.1.4 <i>Puccinia psidii</i> Winter.....	21
1.1.4.1 Sintomatologia.....	24
1.1.4.2 Ciclo de vida e tipos de esporos.....	25
1.1.4.3 Processo de infecção.....	26
1.1.4.4 Variabilidade fisiológica e genética entre populações de <i>Puccinia psidii</i>	27
1.1.5 Interação molecular planta-patógeno.....	27
1.1.5.1 Reconhecimento da presença do patógeno.....	28
1.1.5.2 Fatores de transcrição WRKY.....	29
1.1.5.3.Efetores.....	31
1.1.5.4 Proteínas R.....	32
1.1.5.5 O modelo Zig-Zag.....	33
Referências.....	34
2 ESTABELECIMENTO DE UM PATOSSISTEMA MODELO PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO <i>Eucalyptus grandis</i> - <i>Puccinia psidii</i>	43
Resumo.....	43
Abstract.....	43
2.1 Introdução.....	43
2.2 Material e Métodos.....	46
2.2.1 Origem e obtenção do isolado monopustular de <i>Puccinia psidii</i>	46
2.2.2 Seleção de genótipos de <i>Eucalyptus grandis</i> resistentes e susceptíveis à <i>P.psidi</i>	47
2.2.3 Clonagem e multiplicação do material vegetal selecionado.....	48
2.2.4 Preparo do material vegetal para validação.....	50
2.2.5 Validação do material selecionado.....	50
2.2.6 Seleção dos genótipos modelo.....	50
2.3 Resultados.....	50

2.3.1 Obtenção da linhagem monopustular de <i>P.psidi</i> <i>P.psidi</i>	50
2.3.2 Seleção de plantas resistentes e susceptíveis.....	51
2.3.3 Clonagem das Plantas selecionadas.....	51
2.3.4 Validação do material selecionado.....	51
2.3.5 Seleção dos genótipos modelo.....	52
2.4 Discussão.....	53
2.5 Conclusão.....	56
Referências.....	57
3 ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL DE <i>Eucalyptus grandis</i> À FERRUGEM (<i>Puccinia psidii</i> Winter) AO MICROSCÓPIO DE LUZ.....	59
Resumo.....	59
Abstract.....	59
3.1 Introdução.....	60
3.2 Material e métodos.....	61
3.2.1 Instalação do experimento e coleta do material vegetal.....	61
3.2.2 Microscopia de luz.....	61
3.3 Resultados.....	62
3.3.1 Avaliação dos sintomas.....	62
3.3.2 Avaliação dos cortes histológicos.....	63
3.4 Discussão.....	65
3.5 Conclusão.....	68
Referências.....	69
4 ESTABELECIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO ENTRE <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Puccinia psidii</i> POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA.....	71
Resumo.....	71
Abstract.....	71
4.1 Introdução.....	71
4.2 Material e métodos.....	73
4.2.1 Instalação dos experimentos e coleta do material vegetal.....	73
4.2.2 Desenvolvimento do método de fixação e processamento da amostra.....	73
4.2.3 Avaliação e validação do método desenvolvido.....	75
4.2.3.1 Microscopia confocal.....	75

4.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	75
4.2.4 Obtenção das imagens.....	76
4.3 Resultados.....	76
4.3.1 Desenvolvimento do método de fixação e preparo do material vegetal para microscopia de epifluorescência.....	76
4.3.2 Observação das estruturas do patógeno ao microscópio de epifluorescência.....	77
4.3.3 Microscopia confocal.....	79
4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	81
4.4 Discussão.....	82
4.5 Conclusão.....	85
Referências.....	85
5 APLICAÇÃO DE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA PATÓGENO NO PATOSSISTEMA MODELO <i>Eucalyptus grandis</i> - <i>Puccinia psidii</i>	89
Resumo.....	89
Abstract.....	89
5.1 Introdução.....	89
5.2 Material e métodos.....	90
5.2.1 Instalação dos experimentos e coleta do material vegetal.....	90
5.2.2 Fixação e preparo das amostras.....	90
5.2.3 Coloração do material biológico com azul de anilina.....	91
5.2.4 Obtenção das imagens.....	91
5.3 Resultados.....	91
5.3.1 Observação da dinâmica de desenvolvimento do patógeno em folhas dos genótipos Resistente 03 e Susceptível 04.....	91
5.4 Discussão.....	95
5.5 Conclusão.....	97
Referências.....	98
6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>Eucalyptus grandis</i> RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À <i>Puccinia psidii</i> PELA TÉCNICA DE RNA-SEQ.....	101
Resumo.....	101
Abstract.....	101
6.1 Introdução.....	102

6.2 Material e Métodos.....	103
6.2.1 Instalação do experimento e coleta do material vegetal.....	103
6.2.2 Organização do material vegetal para a análise do transcrito.....	104
6.2.3 Extração do RNA Total.....	106
6.2.4 Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído.....	106
6.2.5 Sequenciamento do mRNA (<i>RNA-Seq</i>).....	106
6.2.6 Construção das Bibliotecas de cDNA.....	107
6.2.7 Amplificação e sequenciamento.....	107
6.2.8 Análise de <i>RNA-Seq</i>	107
6.2.8.1 Construção da Referência.....	107
6.2.8.2 Anotação funcional das sequências que compõem a Referência.....	110
6.2.8.3 Identificação dos genes diferencialmente expressos.....	110
6.2.8.4 Seleção dos genes candidatos.....	110
6.2.8.5 Avaliação da distribuição das categorias funcionais.....	111
6.2.9 Validação dos resultados por <i>qPCR</i>	111
6.2.9.1 Desenho dos primers.....	111
6.3.9.2 Seleção dos genes de referência.....	111
6.3.9.3 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA.	111
6.3.9.4 PCR quantitativo em Tempo Real (<i>qPCR</i>).....	111
6.3. Resultados.....	115
6.3.1 Avaliação dos sintomas.....	115
6.3.2 Sequenciamento do mRNA (<i>RNA-Seq</i>).....	115
6.3.3 Construção da referência.....	119
6.3.4 Identificação dos genes diferencialmente expressos e seleção dos genes candidatos...120	
6.3.5 Avaliação da distribuição dos <i>GO-terms</i>	125
6.3.6 Validação das análises de <i>RNA-Seq</i> por <i>qPCR</i>	130
6.3.7 Análise da expressão gênica.....	130
6.4 Discussão.....	134
6.4.1 Apresentação do modelo de resistência de <i>Eucalyptus grandis</i> a <i>Puccinia psidii</i>	145
6.5 Conclusão.....	149
Referências.....	149
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	159

RESUMO

Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter

Mais de 20 milhões de hectares em todo o mundo são atualmente destinados a plantações de *Eucalyptus*, sendo que o Brasil possui a segunda maior área. No ano de 2007 a rede internacional EUCAGEN, liderada pelo Brasil, África do Sul e Estados Unidos, surgiu com o objetivo de colaboração para a pesquisa genômica do eucalipto. A árvore escolhida para o sequenciamento (Brasuz) foi fornecida pelo Brasil e em 2011 as primeiras sequências foram disponibilizadas. Em todas as fases de seu desenvolvimento, o eucalipto está sob o constante ataque de patógenos, destacando-se a ferrugem, causada pelo Basideomiceto *Puccinia psidii* Winter como a mais importante doença em regiões tropicais. A doença vem se espalhando rapidamente pelo mundo e recentemente foi relatada na Austrália, centro de origem do eucalipto. Com o objetivo de estudar o mecanismo molecular da interação planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii*, estabeleceu-se um patossistema modelo composto por um isolado monopustular do fungo e plantas resistente e susceptível provenientes de uma progênie de meios irmãos da planta Brasuz. O desenvolvimento do patógeno nos genótipos selecionados foi analisado por meio de microscopia de luz e de epifluorescência, e permitiu o monitoramento da dinâmica do desenvolvimento do fungo nos dois genótipos, com a identificação de todas as etapas de desenvolvimento do patógeno no genótipo susceptível bem como o estágio em que o genótipo resistente bloqueia o seu desenvolvimento. Com base nesses resultados determinou-se seis intervalos de interesse para a realização da análise da expressão gênica por meio da técnica de *RNA-Seq*. As análises revelaram grandes diferenças no perfil transcricional dos dois genótipos em resposta à presença do patógeno, permitindo a identificação de genes conhecidamente envolvidos em mecanismos de defesa de plantas como *Receptores LRR-Quinase*, fatores de transcrição *WRKY*, *MYBS* e *GRAS*, *Proteínas R TIR-NBS-LRR* *Proteína Induzida por Injúria* e proteínas envolvidas em processos de degradação proteica como *F-Box*. A comparação dos resultados provenientes das análises histológicas e moleculares permitiram a elaboração de um modelo para explicar os principais processos envolvidos no mecanismo de resistência de *Eucalyptus grandis* à *Puccinia psidii*.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; *Puccinia psidii*; Interação planta-patógeno; Histologia; Mecanismo de resistência; Transcritômica; *RNA-Seq*; PCR em Tempo Real

ABSTRACT

Establishment of a model pathosystem and analysis of the molecular plant-pathogen interaction between *Eucalyptus grandis* and *Puccinia psidii* Winter

More than 20 million hectares are destined to *Eucalyptus* plantations worldwide and Brazil has the second largest planted area. The International Eucalyptus Genome Network, EUCAGEN, was created in 2007 in order to perform genomic research on Eucalyptus. Brazil provided the biological material from the model tree (Brasuz) to have the complete genome sequenced and the first sequences were released to the scientific community in 2011. During *Eucalyptus* development, it is constantly exposed to pathogen attack with one of the most threatening diseases being eucalyptus rust caused by the neotropical rust fungus *Puccinia psidii* Winter which is rapidly spreading around the world and was recently described in Australia. In order to try and understand the molecular plant-microbe interaction between *E. grandis* and *P. psidii* we have to create a model system by isolating the pathogen from a single pustule and select resistant and susceptible plants from half-sib population generated using Brasuz as the pollen receptor. We performed light and epifluorescence microscopy analyses, identified all of the stages of the fungal development and recognized the moment which the resistant genotype blocks pathogen development. Based on these results we selected six time points to carry out transcriptomic analysis. Using *RNA-Seq* analysis we were able to verify large differences in transcriptional profile between resistant and susceptible plants and identify genes known involved in plant defense response such as LRR receptor Kinase, transcription factors (WRKY, MYBS and GRAS), TIR-NBS-LRR Proteins, Wound-induced protein and proteins involved in protein degradation (F-Box). Comparing microscopy and transcriptomic results allowed us to propose a model to explain the molecular mechanism of resistance of *Eucalyptus grandis* to *Puccinia psidii*.

Keywords: *Eucalyptus grandis*; *Puccinia psidii*; Plant-pathogen interaction; Histology; Resistance mechanism; Transcriptomics; *RNA-Seq*; Real Time PCR

1 INTRODUÇÃO

Mais da metade de toda área florestal do mundo concentra-se em apenas 5 países (Rússia, Brasil, Canadá, Estados Unidos e China) e estima-se que 7% dessa área corresponde à florestas plantadas, sendo os gêneros predominantes *Pinus* e *Eucalyptus*. No Brasil o setor florestal é responsável pela geração de milhões de empregos, e quase 70% da área total de florestas plantadas é destinada à cultura do eucalipto. Em todas as fases do desenvolvimento da planta, o eucalipto está sujeito ao ataque de diversos patógenos, dos quais se destaca a ferrugem, causada pelo fungo basideomiceto *Puccinia psidii* Winter. O patógeno é originário da América do Sul e vem se espalhando rapidamente pelo mundo e, com exceção da Europa, já foi relatado em todos os continentes. Os ataques do patógeno restringem-se à órgãos tenros de plantas com até dois anos de idade e embora raramente mate o hospedeiro, as plantas atacadas podem apresentar considerável redução no seu desenvolvimento. Apesar da primeira descrição do fungo afetando o gênero ter sido realizada na primeira metade do século XX e da importância do patógeno para a cultura, o conhecimento sobre sua interação molecular com *Eucalyptus spp* e sobre o mecanismo de resistência é escasso quando comparado à algumas doenças em outras culturas de importância econômica. Dessa forma, os objetivos do presente trabalho foram: I) O estabelecimento de um patossistema modelo para o estudo da interação *Eucalyptus grandis*-*Puccinia psidii*; II) Estudar a dinâmica do desenvolvimento do patógeno nos genótipos selecionados; III) Estudar a interação molecular planta-patógeno entre *E. grandis* e *P. psidii* ao nível transcricional, e identificar genes de resistência.

O sucesso das etapas iniciais do trabalho, que envolveram a seleção do material biológico e a identificação dos estágios de desenvolvimento do patógeno, proporcionou uma base sólida, que permitiu não somente definir as estratégias para a realização dos estudos de expressão gênica nas etapas subsequentes e ter sucesso na identificação de componentes envolvidos no processo de resistência, mas também servirá de base para futuros estudos para a obtenção de maiores detalhes dos mecanismos moleculares de resistência.

Devido à diversidade de assuntos abordados no presente trabalho, optou-se por apresentá-lo na forma de capítulos, nos quais são descritos não somente os métodos de estudo e resultados, mas também os problemas encontrados e estratégias utilizadas para resolvê-los. O conjunto geral dessa tese mostra passo a passo a construção do conhecimento que levou ao estabelecimento de um modelo de estudos genéticos em eucalipto e à proposição de um modelo para explicar o mecanismo molecular de resistência de *E. grandis* à *P. psidii*. Para a contextualização dos assuntos abordados, nesse capítulo introdutório é apresentada uma

revisão de literatura sobre temas relacionados ao setor florestal e sua importância econômica, o gênero *Eucalyptus* e sua importância para o Brasil, *P. psidii* e suas consequências para a cultura do eucalipto e os mecanismos gerais da interação molecular planta-patógeno.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 O setor florestal no cenário mundial

A área total de florestas no mundo é estimada em mais de 4 bilhões de hectares, sendo que apenas 5 países (Rússia, Brasil, Canadá, Estados Unidos e China) possuem mais da metade dessa área. Esse número representa 31% da área terrestre do planeta e é responsável por estocar mais de 650 bilhões de toneladas de carbono. A Europa, incluindo a Rússia, apresenta a maior área florestal do mundo (25%), seguido da América do Sul (21%), e América Central e do Norte (17%) (FAO, 2010a). Em se tratando de florestas plantadas, a área mundial é estimada em 264 milhões de hectares (7% da área florestal mundial) dos quais três quartos são cultivados para produção de madeira, fibra, combustível e produtos não madeireiros (FAO, 2010b).

A área ocupada por florestas plantadas encontra-se em contínuo crescimento, tendo aumentado em quase 5 milhões de hectares entre 2005 e 2010 (FAO, 2010b). A maior parte dessas florestas encontra-se no continente asiático, seguido da Europa, América Central e do Norte, África, América do Sul e Oceania (Tabela 1.1) (FAO, 2010a). Embora exista uma variação entre as espécies plantadas em cada região, os gêneros predominantes são *Pinus* e *Eucalyptus*, que representam respectivamente 20 e 10% das florestas plantadas no mundo (CARLE; VUORINEN; DEL LUNGO, 2002). O setor florestal é responsável por 0,4% do PIB mundial, gerando 13,7 milhões de empregos, o que representa 1% dos empregos mundiais (ILO, 2011).

Tabela 1.1- Distribuição de florestas plantadas no mundo

Continentes	Dados (FAO) Número de Países	Área de Floresta Plantada	
		x1000 ha	% de Floresta Plantada
África	55	15.409	2,3
Ásia	45	122.775	20,8
Europa	43	69.318	6,9
América do Norte e Central	28	38.661	5,5
Oceania	18	4.101	2,1
América do Sul	13	13.821	1,7
Mundo	203	264.084	6,6

Fonte: FAO 2010a

1.1.2 O setor florestal no Brasil

No ano de 2010, o setor florestal no Brasil foi responsável por cerca de 4,7 milhões de empregos diretos, indiretos e resultantes do efeito renda e por uma contribuição tributária de R\$ 7,4 bilhões, o que equivale a 0,57% do total de tributos arrecadados no país. O valor bruto da produção florestal, resultado da multiplicação do preço dos produtos florestais pela respectiva quantidade produzida, foi de R\$ 51,8 bilhões em 2010. Este valor representa um aumento de 20,7% em relação ao ano de 2009, o que mostra a evolução do desempenho econômico do setor no país (ABRAF, 2011).

A área atual ocupada por florestas plantadas é de aproximadamente 7 milhões de hectares, dos quais 68,2% são ocupados por eucalipto, 25,2% por pinus e 6,6% por outras espécies (ABRAF, 2011).

1.1.3 O gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* e é composto por mais de 700 espécies (ABRIL et al., 2011) divididas em 7 subgêneros politípicos e seis subgêneros monotípicos (BROOKER, 2000). As espécies são monóicas, preferencialmente alógamas (apresentando 30% de autogamia), polinizadas por insetos (PRYOR, 1976) e geralmente possuem um número cromossômico $2n = 22$ (BACHIR; ABDELLAH, 2006).

O eucalipto cresce como espécie exótica em diversas regiões tropicais e subtropicais da África, América do Sul e Ásia, e em regiões temperadas da Europa América do Sul e Austrália, onde o clima permite o desenvolvimento da planta (MYBURG et al., 2006).

Atualmente são plantados quase 20 milhões de hectares em todo o mundo, sendo que o Brasil possui a segunda maior área (20%), atrás somente da Índia (22%) (IGLESIAS-TRABADO; WILSTERMANN, 2008). As plantações de eucalipto estão em contínua expansão na maioria dos estados brasileiros, com crescimento médio de 7,1% ao ano entre 2004 e 2009 (ABRAF, 2010). As maiores áreas encontram-se nas Regiões Sudeste (56%) e Nordeste (17%) (Figura 1.1), com destaque para os estados de Minas Gerais (29,4%), São Paulo (22,0%) e Bahia (13,3%) (ABRAF, 2011).

Figura 1.1- Distribuição das plantações de eucalipto por regiões no Brasil
Fonte: ABRAF (2011)

As primeiras mudas de eucalipto foram plantadas no Brasil em 1868, mas somente entre os anos de 1904 e 1909 é que trabalhos experimentais desenvolvidos por Navarro de Andrade demonstraram as vantagens do plantio do gênero em relação às espécies nativas. A partir de então, iniciou-se o plantio do eucalipto em escala comercial, sendo a madeira utilizada para múltiplos fins como produção de lenhas para as locomotivas, mourões de cercas e postes e madeiramento para construções civis (MORA; GARCIA, 2000).

Na década de 1940 as primeiras pesquisas para a produção de celulose a partir de eucalipto foram promissoras e, em 1957 foi possível a produção industrial de papel com 100% de celulose de eucalipto. Em 1966 as plantações já atingiam 470 mil hectares em todo o Brasil e em meados da década de 1970 e início da década de 1980 houve um grande avanço no melhoramento genético da planta e na utilização de plantios clonais. Nos anos de 1990 algumas empresas direcionaram investimentos para dominar as técnicas de processamento do eucalipto em serraria, levando a uma valorização do produto (MORA; GARCIA, 2000).

No início do ano de 2007 uma rede internacional chamada EUCAGEN, liderada pelo Brasil, África do Sul e Estados Unidos, surgiu com o objetivo de colaboração para a pesquisa genômica do eucalipto. A rede conta com 82 instituições públicas e privadas de pesquisa de 18 países, reunindo mais de 140 pesquisadores. O sequenciamento do genoma foi realizado pelo *Joint Genome Institute* (JGI) (<http://www.jgi.doe.gov/>), do Departamento de Energia dos

Estados Unidos (DOE) sendo a árvore selecionada para o sequenciamento pertencente à espécie *Eucalyptus grandis*. A planta foi desenvolvida pelo programa de melhoramento genético da CIA Suzano de Papel e Celulose e foi batizada como Brasuz_1 (EMBRAPA, 2007).

Desde a fase de viveiro até os plantios adultos, o eucalipto está sujeito ao ataque de diversos patógenos em plantações nos mais variados locais, espécies e épocas do ano (SANTOS et al., 2001). Dentre as enfermidades que afetam a cultura, destaca-se a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter, como a mais devastadora, com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais.

1.1.4 *Puccinia psidii* Winter

Puccinia psidii Winter é um basideomiceto pertencente à ordem Pucciniales (Uredinales) (Tabela 1.2) e foi descrito pela primeira vez em 1884 em *Psidium guajava* L. no Brasil por Winter em 1884 (MOON et al., 2012). No gênero *Eucalyptus* a primeira descrição ocorreu em 1944 (JOFFILY, 1944).

Tabela 1.2- Filogenia de *Puccinia psidii*. Classificação baseada em Index Fungorum (2012)

Classificação	Taxon	Referência
Reino	Fungi	Bartling 1830
Filo	Basidiomycota	Moore, 1980
Subfilo	Pucciniomycotina	Bauer, 2006
Classe	Pucciniomycetes	Bauer, 2006
Ordem	Pucciniales	Clem e Shear, 1931
Família	Pucciniaceae	Chevall, 1826
Gênero	<i>Puccinia</i>	Chevall, 1826
Espécie	<i>Puccinia psidii</i>	Winter, 1884

Fonte: Moon et al. (2012)

Juntamente com *Uredo psidii*, uma forma uredinial anamórfica do patógeno, a ferrugem já foi relatada em 20 gêneros e 71 espécies das duas subfamílias de *Myrtaceae* (SIMPSON; THOMAS; GRGURINOVIC, 2006). O fungo apresenta um grande número de sinônimos (*Puccinia jambosae*, *Puccinia cambucae*, *Puccinia brittoi*, *Puccinia*

barbacensis, *Puccinia eugeniae*, *Puccinia grumixamae*, *Puccinia jambolana*, *Puccinia camargoi*, *Puccinia actinostemonis*, *Uredo eugeniarum*, *Uredo neurophila*, *Puccinia neurophila*, *Uredo flavidula*, *Uredo myrtacearum*, *Uredo eugeniarum*, *Aecidium glaziovii*, *Uredo pitanga*, *Uredo puttemansii*, *Uredo goeldiana*, *Uredo rochaei*, *Uredo myrciae*) (revisado por SIMPSON; THOMAS; GRGURINOVIC, 2006), e representa uma ferrugem bastante incomum, dado o grande número de hospedeiros.

A primeira constatação de danos econômicos significativos na cultura do eucalipto em função da ferrugem foi em 1973, em viveiros e plantações com idade inferior a 18 meses no estado do Espírito Santo (FERREIRA, 1983). Desde então, *P.psidi* vem sendo relatado em diversos países das Américas do Sul, Central e do Norte, Ilhas do Caribe e do Pacífico e Ásia. O patógeno foi também relatado na África do Sul e Taiwan, entretanto em ambos os casos o patógeno não foi efetivamente identificado e novas infestações não foram registradas (GLEN, et al., 2007).

No ano de 2010, um taxon morfologicamente distinto, mas molecularmente indistinguível de *P.psidi*, *Uredo rangelli*, foi identificado na Austrália (CARNEGIE et al., 2010). Apesar de ter sido descrito como uma nova espécie, diversas evidências apontam *U.rangelli* como sendo efetivamente *P.psidi*. A descrição da espécie baseou-se no tonsura dos urediniósporos, característica conhecidamente variável em *P.psidi* (SIMPSON; THOMAS; GRGURINOVIC, 2010). Além disso, análises moleculares baseadas em sequenciamento de DNA (rDNA ITS, fatores de elongação ITS 1- α e β -tubulina) e *nested* PCR (desenvolvido especificamente para detecção de *P.psidi*) (LANGRELL; GLEN; ALFENAS, 2008) mostraram-se incapazes de diferenciar os dois táxons (SIMPSON; THOMAS; GRGURINOVIC, 2010). Segundo Carnegie et al. (2010), *U. rangelli* pode ser considerado um membro do complexo *P.psidi* lato sensu (em sentido amplo), enquanto o patógeno descrito por Winter seria *P.psidi* stricto sensu (em sentido restrito).

Dessa forma, considerando a possível ocorrência da doença na África do Sul e *U.rangelli* como um membro de *P.psidi* em sentido amplo, o patógeno já foi registrado em quatro dos cinco continentes (Figura 1.2). A Tabela 1.3 sumariza todos os países onde o patógeno foi oficialmente descrito.

Figura 1.2- Países em que *Puccinia psidii* já foi formalmente descrito. Figura retirada de MOON et al. (2012)

Tabela 1.3- Continentes e países onde *Puccinia psidii* já foi formalmente descrito

Continente	País	Referência
África	África do Sul	Knipscheer and Crous, 1990
Ásia	Japão Taiwan	Kawanishi, 2009 Wang, 1992
América Central e Ilhas do caribe	Cuba Costa Rica Dominica República Dominicana El Salvador Guatemala Jamaica Porto Rico Trinidad and Tobago	Seaver and Chardón, 1926 Di Stéfano et al., 1998 Baker and Dale, 1948 Kern et al., 1933 CMI, 1987 Schieber and Sánchez, 1968 MacLachlan, 1936 MacLachlan, 1938 Baker and Dale, 1951
América do Norte e Ilhas do Pacífico	México Estados Unidos Havaí	León-gallegos and Cummins, 1981 Marlatt and Kimbrough 1979; Rayachhetry et al., 2001 Uchida et al., 2006
Oceania	Austrália	Carnegie et al., 2010
América do Sul	Argentina Brasil Colombia Equador Paraguai Uruguai Venezuela	Di Fonzo, 1946; Acuña and Garran, 2004 Winter, 1884; Joffly, 1944 Mayor, 1913; Chardón and Toro, 1930 Stevenson, 1926 Spegazzini ¹ , 1884; Spegazzini, 1922 Spegazzini, 1889; Koch de Brotos and Boasso, 1955; Telechea et al., 2003 Chardón and Toro, 1934; Menon, 1950

Fonte: MOON et al. (2012).

1.1.4.1 Sintomatologia

Os ataques do patógeno restringem-se aos órgãos tenros como primórdios foliares e pecíolos, terminais de galhos e haste principal de plantas com até dois anos de idade. Os primeiros indícios da infecção em eucalipto são minúsculas pontuações, levemente salientes, de coloração verde clara ou verde amarelada (FERREIRA, 1983). Após três a cinco dias ocorre o aparecimento das primeiras pústulas, as quais possuem típica coloração amarelo gema de ovo (FERREIRA, 1983) (Figura 1.3 A e B). Diversos trabalhos têm descrito o início

do processo de esporulação ocorrendo em diferentes tempos após a contaminação com o patógeno, podendo variar entre quatro e quinze dias (CASTRO et al., 1983; CASTRO; BERGAMIM; KRUGNER, 1984; COUTINHO; FIGUEIREDO, 1984; RUIZ et al., 1989; XAVIER, 2001). Poucos dias após o início da esporulação, infecções secundárias podem ser observadas, onde outros tecidos como pecíolos e ramos são atacados (Figura 1.3 C). Ao contrário do que ocorre em folhas jovens, as mais velhas apresentam esporulação progressivamente menos intensa, desenvolvendo apenas pequenas pústulas (FERREIRA, 1983).

Figura 1.3- A e B - Infecção primária de folhas susceptíveis de *E. grandis*. C- Infecção secundária. Brotações e pecíolos são atacados pelo patógeno. D - Imagem aumentada de uma folha durante a infecção primária. Figura retirada de MOON et al. (2012)

1.1.4.2 Ciclo de vida e tipos de esporos

Puccinia psidi é considerada uma espécie autoécia, isto é, capaz de completar seu ciclo de vida em um único hospedeiro. Seu ciclo de vida é incompleto e com exceção da forma espermogonial, todos os estágios (aécio - estágio I, uredínio- estágio II, telio- estágio III e basídio - estágio IV) já foram encontrados (Figura 1.4). Aécios e uredínios, assim como aeciósporos e urediniósporos são morfologicamente idênticos (FIGUEIREDO, 2001; GLEN, et al., 2007). Segundo Coutinho et al. (1998), devido ao fato da ocorrência de aécios, a forma

espermagonial deve existir e assim *P.psidi* deve ter um ciclo de vida macrocíclico. Simpson, Thomas e Grgurinovic (2006) sugerem que *P.psidi* seja uma ferrugem heteroécia e macrocíclica, com um hospedeiro aecial indeterminado.

Em condições naturais, *P.psidi* produz grande quantidade de urediniósporos. A presença de basidiósporos e teliósporos é menos comum, sendo os últimos mais frequentemente encontrados em folhas de *Syzygium jambos* e *Eugenia jaboticaba* (GLEN et al., 2007). Os aeciósporos nunca foram relatados na natureza, uma vez que são morfologicamente muito semelhantes aos urediniósporos (FIGUEIREDO, 2001).

Figura 1.4- Esquema do ciclo de vida de *Puccinia psidii*. Com exceção da forma espermagonial, todos os outros estágios de desenvolvimento já foram descritos. Figura retirada de Glen et al. (2007)

1.1.4.3 Processo de infecção

A germinação dos urediniósporos e o processo de infecção são altamente influenciados pelas condições ambientais. Temperaturas entre 15 e 25°C, alta umidade, molhamento foliar e períodos de escuro (pelo menos 6 horas) são condições necessárias para o início do desenvolvimento do patógeno representado pela germinação dos urediniósporos (FERREIRA, 1981; RUIZ et al., 1989; RUIZ; ALFENAS; FERREIRA, 1989; RUIZ; ALFENAS; DO VALE, 1987; PIZZA; RIBEIRO, 1988; COUTINHO; FIGUEIREDO, 1984). Apesar da exposição à luz inibir o processo de germinação dos urediniósporos, Ruiz, Alfenas e Ferreira (1989) observaram que, em plantas inoculadas, após o período inicial de desenvolvimento do

patógeno no escuro, que a produção de soros aumentou de maneira linear com aumentos da intensidade luminosa, as quais variaram de 1092 à 3540 lux.

1.1.4.4 Variabilidade fisiológica e genética entre populações de *Puccinia psidii*

A existência de variabilidade fisiológica entre populações de *P. psidii* foi relatada pela primeira vez por Maclachlan (1938) que observou duas linhagens distintas do patógeno. Desde então, diversos estudos envolvendo inoculações cruzadas entre vários isolados e hospedeiros demonstraram a existência de diversas raças com diferentes níveis de patogenicidade a vários gêneros de *Myrtaceae*. (MARLATT; KIMBROUGH, 1980; FERREIRA, 1983; CASTRO et al., 1983; CASTRO; BERGAMIM; KRUGNER, 1984; COELHO; ALFENAS; FERREIRA, 2001; APARECIDO; FIGUEIREDO; FURTADO, 2003.).

Estudo da biodiversidade molecular (marcadores SRR) entre isolados monopustulares de *P. psidii* demonstrou a existência de pelo menos onze diferentes genótipos no Brasil e três na Flórida (ZHONG; YANG; PURI, 2011). O mesmo estudo revelou ainda a ausência de variabilidade genética nos isolados provenientes do Havaí, os quais apresentavam alta similaridade com um dos genótipos provenientes da Flórida, indicando a possível origem do patógeno nessa região.

1.1.5 Interação molecular planta-patógeno

Diversas estratégias são utilizadas por plantas e patógenos para sobreviver. Por um lado os fitopatógenos tentam colonizar os tecidos vegetais. Por outro as plantas tentam combater esses organismos invasores. A grande diversidade de ambientes encontrados nas plantas (filosfera, rizosfera e endosfera), fazem desses organismos excelentes ecossistemas para o desenvolvimento de microorganismos (MONTESINOS et al., 2002; MONTESINOS, 2003). Dessa forma, 120 gêneros de fungos, 30 tipos de vírus e 8 gêneros de bactérias são responsáveis por causar cerca de 11 mil doenças já descritas em plantas (MONTESINOS et al., 2002).

Entretanto, nenhum patógeno é capaz de infectar todas as plantas, e uma única planta não é susceptível a todos os patógenos. Assim, para a ocorrência de determinada doença em uma planta saudável, três fatores devem ocorrer simultaneamente: 1) o hospedeiro deve ser susceptível; 2) o patógeno deve ser virulento; 3) o ambiente deve ser favorável ao desenvolvimento do microorganismo. Consequentemente, um número muito reduzido de

patógenos é capaz de infectar efetivamente uma planta, sendo o desenvolvimento de doenças uma exceção e não uma regra (FERREIRA et al., 2006).

Diferentemente dos animais, as plantas não possuem células móveis, ou um sistema imune adaptativo. Alternativamente, esses organismos contam com uma imunidade inata de cada célula e um sistema de sinalização que surge do ponto da infecção (DANGL; JONES, 2001; AUSUBEL, 2005; CHISHOLM, et al., 2006). Assim, o desencadeamento da resposta de defesa envolve uma rede de sinais reiterativa com a amplificação desse sinal e "*cross-talk*" (SUZUKI, et al., 2004).

Nos anos de 1940, H.H. Flor introduziu o conceito de interação gene-a-gene, que de uma forma simplificada, postula que as plantas possuem um único gene dominante de resistência (gene R), responsável pelo reconhecimento de patógenos que contêm genes de avirulência complementares (genes *avr*) (LOEGERING; ELLINGBOE, 1987). Staskawicz (2001) define genes *avr* como aqueles presentes em patógenos e que são responsáveis por codificar proteínas que direta ou indiretamente são reconhecidas somente por plantas que contenham o gene R complementar. Dessa forma, nessas plantas os genes *avr* causam avirulência na presença do gene R, e na ausência desse gene, os genes *avr* frequentemente desempenham um papel significativo na virulência do patógeno, ainda que não sejam essenciais para sua sobrevivência (BENT; MACKEY, 2007).

1.1.5.1 Reconhecimento da presença do patógeno

De maneira geral, o processo de defesa das plantas tem início com o reconhecimento de sinais genéricos, que indicam a presença do patógeno, conhecidos como elicitores. Esses sinais podem ser estruturas ou moléculas provenientes dos próprios microorganismos, e nesse caso são conhecidos como **PAMP** (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) ou compostos derivados das próprias plantas, oriundos de herbivoria ou injúria, os quais, nesse caso, são conhecidos como **MIMPS** (*Microbe-Induced Molecular Patterns*) (BENT; MACKEY, 2007) ou **DAMPS** (*Damage-Associated Molecular Patterns*) (DE LORENZO et al., 2011).

Essas moléculas são reconhecidas por receptores PPR (*Pattern Recognition Receptors*), os quais são compostos por proteínas transmembranas com um domínio extracelular LRR (*Leucine-Rich Repeat*) e um domínio serina/treonina quinase intracelular. Cada unidade do domínio LRR é composta por cerca de 21 a 25 aminoácidos com uma sequência típica ¹**XXLXLXXN**xLt/sGxIPxxLxxLxxL²⁴, onde os resíduos "x" são mais variados e expostos na superfície da proteína, sendo os resíduos "**X**" em azul possivelmente relacionados à especificidade (BENT; MACKEY, 2007).

Os dois receptores PPR melhor caracterizados são os receptores FLS2 (*Flagellin-Sensitive 2*), responsável pelo reconhecimento de flagelinas 22, principais componentes dos flagelos bacterianos (GOMEZ-GOMEZ; BOLLER, 2000), e o receptor EFR (*Elongation Factor Tu receptor*), responsável por reconhecer fatores de elongação EF-Tu, a mais abundante e conservada proteína presente em bactérias (ZIPFEL et al., 2006). Chinchilla et al. (2007) demonstraram que o receptor LRR-Quinase BAK1 (*BRI1-Associated receptor Kinase 1*), envolvido na regulação do receptor de brassinosteróide BRI, também possui um importante papel no processo de regulação de FLS2 por meio da formação de um complexo após o reconhecimento da presença do patógeno. Assim, a presença de flagelina 22 induz uma mudança conformacional na estrutura de FLS2, permitindo uma interação proteína-proteína entre os domínios extracelulares FLS2 e BAK1, levando à aproximação dos domínios quinase dos dois receptores, dando início ao processo de sinalização (BOLLER; FELIX, 2009). Dessa forma, apesar de BAK1 não estar diretamente envolvido no reconhecimento da presença do patógeno, ele desempenha um importante papel no processo de regulação do receptor FLS2 e de outros receptores envolvidos no reconhecimento de PAMPs (DODDS; RATHJEN, 2010) (Figura 1.5).

Figura 1.5 - Modelo de ativação do receptor FLS2 pelo receptor BAK1. **A**-Na ausência da proteína flagelina 22 os receptores FLS2 e BAK1 não interagem. **B**- Ligação da proteína flagelina 22 ao receptor FLS2. **C**- A ligação da proteína flagelina 22 induz uma mudança de conformação no receptor FLS2. **D**- Essa mudança de conformação permite a interação proteína-proteína entre o domínio extracelular de FLS2 e BAK1, fazendo com que os domínios quinase dos dois receptores se aproximem iniciando o processo de sinalização. Figura retirada de Boller e Felix (2009)

A ativação dos receptores inicia então uma cascata de MAP (*Mitogen-Activated Protein*) quinase. De maneira geral, uma MAPK quinase quinase (MAPKKK) fosforila uma MAPK quinase (MAPKK) que por sua vez fosforila uma MAPK. Essa via de sinalização regula a atividade de vários substratos, incluindo fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão de genes relacionados à defesa da planta (SONG et al., 1995); (DODDS; RATHJEN, 2010) (Figura 1.6 A). Diversas famílias de fatores de transcrição podem estar envolvidas na ativação do processo de defesa entre eles os MYBs (DUBOS et al., 2010), GRAS (FODE et al., 2008) e WRKY, sendo o envolvimento dessa última família nesse processo muito estudado (BENT; MACKEY, 2007).

1.1.5.2 Fatores de transcrição WRKY

Os fatores de transcrição WRKY compreendem uma superfamília de proteínas que possuem alta afinidade a sequências de DNA conhecidas como "*W Box*" ((C/TTGAC(T/C)) (MAEO et al., 2001). Essas proteínas possuem uma região de aproximadamente 60 aminoácidos caracterizada pela sequência conservada WRKYGQK na extremidade N terminal, que, juntamente com um motivo dedo de zinco, compreende o domínio WRKY (EULGEM et al., 2000). Além da presença da sequência invariável WRKYGQK a presença de resíduos de cisteína e histidina no domínio é essencial para ligação da proteína à molécula de DNA (MAEO et al., 2001).

Com base no número de domínios WRKY e no tipo do motivo dedo de zinco, essas proteínas podem ser divididas em três grupos. De maneira geral os grupos I e II apresentam o mesmo tipo de motivo dedo de zinco, sendo o grupo I formado por proteínas com dois domínios WRKY, enquanto as proteínas do grupo II apresentam apenas um. Ao grupo III pertence a menor parte (20% em plantas superiores) de proteínas WRKY, as quais possuem um motivo dedo de zinco distinto dos demais (RUSHTON et al., 1995; EULGEM et al., 1999).

Mais de 70 proteínas WRKY já foram descritas em *Arabidopsis* (EULGEM; SOMSSICH, 2007) e mais de 102 em arroz (ROSS; LIU; SHEN, 2007), sendo que quase todas as proteínas WRKY pertencentes ao grupo III em *Arabidopsis* estão envolvidas em respostas a estresses bióticos (KALDE et al., 2003).

Diversos estudos têm relatado um aumento tanto na quantidade de mRNA que codificam proteínas WRKY, quanto nas atividades de ligação DNA-proteína estimulado pela presença de vírus (WANG et al., 1998), bactérias ou oomicetos (EULGEM et al., 2000) assim como elicitores provenientes de fungos (RUSHTON et al., 1996); (FUKUDA, 1997) e

substâncias sinalizadoras como o ácido salicílico (YANG et al., 1999). De acordo com Dong, Chen e Chen (2003), 49 de 72 genes WRKY testados, em *Arabidopsis* são responsivos a infecções bacterianas ou a tratamento com ácido salicílico.

Figura 1.6- Modelo geral da interação molecular planta patógeno. **A** Após o reconhecimento e ativação dos receptores **PPR**, inicia-se uma cascata de quinases que resulta na ativação de fatores de transcrição que por sua vez regulam a expressão de genes envolvidos na resposta de defesa levando à **PTI**. **B**- Os patógenos liberam efetores que são capazes de suprimir a resposta de defesa. **C**- Proteínas R reconhecem a ação dos efetores e impedem sua ação, restaurando a resistência da planta. **D**- Os patógenos modificam os efetores evitando assim a ação da resposta de defesa, levando a um novo estado de susceptibilidade. Figura adaptada de Bent e Mackey (2007)

1.1.5.3 Efetores

Efetores são importantes moléculas relacionadas à virulência do patógeno, responsáveis por promover sua penetração e permanência no interior do tecido do hospedeiro, supressão da resposta imune, acesso a nutrientes, proliferação e crescimento (GOHRE; ROBATZEK, 2008). Essas moléculas podem ser divididas em duas classes, dependendo do local onde são liberadas: **1)** efetores apoplásticos, liberados no espaço extracelular onde interagem com alvos extracelulares e receptores; **2)** efetores citoplasmáticos, liberados no interior da célula do hospedeiro por estruturas de infecção como vesículas ou haustórios (KAMOUN, 2006).

A inibição da resposta de defesa iniciada após o reconhecimento dos PAMPs é crucial para a virulência do patógeno. Dessa forma, os efetores podem atuar em diversas etapas,

inibindo a ativação da cascata de quinase (HE et al., 2006) (Figura 1.6 B), impedindo o processo de morte celular do hospedeiro (ABRAMOVITCH et al., 2003; DE TORRES et al., 2006) ou mesmo degradando proteínas envolvidas na resposta de defesa (GOHRE; ROBATZEK, 2008). Alguns patógenos são ainda capazes de produzir efetores que mimetizam hormônios vegetais como jasmonato, suprimindo assim a via de defesa mediada por ácido salicílico contra patógenos biotróficos (ZHAO et al., 2003; BROOKS; BENDER; KUNKEL, 2005). Outros podem induzir a abertura de estômatos (MELOTTO et al., 2006), retardar o processo de senescência de folhas infectadas (JONES; DANGL, 2006), ou mesmo inibir respostas de defesa que envolvam modificações na parede celular como a inibição da deposição de calose (NOMURA et al., 2006).

1.1.5.4 Proteínas R

As proteínas R são produtos dos genes R, e estão envolvidas no reconhecimento de efetores ou suas ações. A maioria dessas proteínas possui um domínio NBS-LRR, que além do domínio LRR (previamente descrito), apresenta um sítio de ligação de nucleotídeo NBS (*Nucleotide Binding Site*) (BENT; MACKEY, 2007), onde uma molécula de ADP ou ATP é ligada (RIEDL et al., 2005; YAN et al., 2005).

As proteínas R podem se ligar diretamente aos efetores por meio de interações físicas (DESLANDES et al., 2003; DODDS et al., 2004; JIA et al., 2000), onde a especificidade é mediada pelo domínio LRR (detecção direta) (BENT; MACKEY, 2007), ou monitorar a integridade de proteínas do hospedeiro, tendo uma ação em resposta a alterações nessas proteínas (detecção indireta) (GRANT et al., 1995; INNES et al., 1993; BENT et al., 1994).

O domínio amino terminal de uma proteína R interage com os domínios NBS e LRR da mesma proteína, formando assim um complexo fortemente dobrado, o qual pode ainda conter uma proteína alvo do patógeno (no caso da detecção indireta). A presença de uma proteína efetora leva à mudança conformacional desse complexo, induzindo a troca de ADP por ATP, o que consequentemente induz a transdução do sinal para ativação da resposta de defesa (Figura 1.7) (DEYOUNG; INNES, 2006), frequentemente culminado na resposta hipersensível.

Em geral, nas proteínas R envolvidas na detecção direta, os resíduos expostos do domínio LRR apresentam diversidade muito maior do que o estimado. Tal fato possivelmente se deve à pressão de seleção para adaptação dessa parte da proteína a novas funções, permitindo assim a detecção de diferentes proteínas AVR (BENT; MACKEY, 2007). Da mesma forma, algumas proteínas AVR mostram-se bastante diversificadas (DODDS et al.,

2004). Consequentemente, enquanto os alelos *avr* evoluem para driblar a detecção do hospedeiro, proteínas R com diferentes especificidades surgem para detecção dessas novas proteínas AVR, resultando assim em um conflito coevolucionário onde plantas e patógenos mais adaptados são simultaneamente selecionados (DODDS et al., 2006).

Por outro lado, as proteínas R que monitoram a integridade de proteínas do hospedeiro, apresentam uma estrutura bastante conservada. Nesse caso, a pressão de seleção atua no sentido de conservar a estrutura dessas proteínas (BENT; MACKEY, 2007).

Figura 1.7 -Monitoramento da presença de patógenos pelas proteínas R. O domínio amino terminal da proteína R por meio da interação com os domínios NBS e LRR da mesma proteína, forma um forte complexo. No caso da detecção direta, a presença de um efector induz uma mudança conformacional no complexo, levando à troca de ADP por ATP. No caso da detecção indireta, uma proteína do hospedeiro que é alvo do patógeno, encontra-se ligada ao complexo formado pela proteína R. Assim, da mesma forma, a interação entre o efector e a proteína alvo induz uma mudança conformacional, seguida da troca de ADP por ATP. Nos dois casos essa troca de ADP por ATP leva à ativação da resposta de defesa. Figura retirada de Deyoung e Innes (2006)

1.1.5.5 O modelo Zig-Zag

Jones e Dangl (2006) introduziram o modelo que explica a ação e reação de plantas e patógenos no processo de interação. Esse modelo é dividido em cinco fases. Na primeira fase, os PAMPs são reconhecidos pelos receptores e como resultado tem-se uma resposta chamada PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), que pode impedir o progresso do patógeno. Patógenos mais adaptados liberam efetores que interferem na resposta PTI, caracterizando a segunda fase do modelo, chamada ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*). Os efetores podem direta ou indiretamente ser reconhecidos por proteínas NBS-LRR resultando assim na terceira fase, chamada ETI (*Effector-Triggered Immunity*), uma forma amplificada de PTI, que frequentemente pode ultrapassar o limiar para ativação da resposta hipersensível (HR). A

pressão de seleção direciona então os patógenos a evitar a resposta ETI, resultando na quarta fase do modelo, uma nova fase ETS. A ação dos patógenos nessa fase pode ser tanto pela diversificação de efetores, que não serão mais reconhecidos pelas proteínas R ou mesmo pelo desenvolvimento de efetores capazes de suprimir ETI. Finalmente, por ação da seleção natural, novas proteínas R podem surgir, levando a uma nova **ETI**, a qual representa a quinta e última fase (Figuras 1.6 e 1.8).

Figura 1.8 - Modelo Zig-Zag proposto por Jones e Dangl (2006). O modelo é dividido em 5 fases. Na fase 1 as plantas detectam PAMPs por meio dos receptores PPR e disparam uma resposta de defesa conhecida como *PAMP-Triggered Immunity* (PTI). Patógenos adaptados liberam efetores que interferem na resposta PTI, resultando na supressão da defesa da planta, caracterizando a segunda fase, conhecida como *Effector-Triggered Immunity* (ETS). Na fase 3, um efector (representado em vermelho) é reconhecido pela planta, ativando uma nova resposta chamada *Effector-Triggered Immunity* (ETI), que frequentemente já pode induzir a resposta hipersensível (HR). Patógenos melhor adaptados, os quais perderam os efetores (representados em vermelho), são selecionados por possuírem novos efetores (representados agora em azul) que são capazes de suprimir ETI, levando à fase 4, uma nova fase ETS. Pela seleção natural, são favorecidas plantas com novas proteínas NBS-LRR, capazes de reconhecer os novos efetores. Essas plantas são capazes de impedir a ação do patógeno, levando à 5ª e última fase, uma nova fase ETI. Figura retirada de Jones e Dangl (2006)

Referências

ABRIL, N.; GION, J.M.; KERNER, R.; MÜLLER-STARCK, G.; CERRILLO, R.M.; PLOMION, C.; RENAUT, J.; VALLEDOR, L.; JORRIN-NOVO, JV. Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. **Phytochemistry**, New York, v. 72, n. 10, p. 1219-1242, 2011.

APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B.; FURTADO E.L. Grupos de variabilidade fisiológica em populações de *Puccinia psidii*. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 234-238, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**, Brasília, 2010. 136 p.

_____. **Anuário estatístico**, Brasília, 2011. 130 p.

AUSUBEL, F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature Immunology**, New York, v. 6, n. 10, p. 973-979, 2005.

BACHIR, O.; ABDELLAH, B. Chromosome numbers of the 59 species of *Eucalyptus* L'Herit. (Myrtaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 59, n. 3, p. 207-212, 2006.

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, 2007.

BENT, A.F.; KUNKEL, B.N.; DAHLBECK, D.; BROWN, K.L.; SCHMIDT, R.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J.; STASKAWICZ, B.J. RPS2 of *Arabidopsis-thaliana* - a leucine-rich repeat class of plant-disease resistance genes. **Science**, Washington, v. 265, n. 5180, p. 1856-1860, 1994.

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, 2009.

BROOKER, M.I.H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v. 13, n. 1, p. 79-148, Feb 2000.

BROOKS, D.M.; BENDER, C.L.; KUNKEL, B.N. The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 629-639, 2005.

CARLE, J.; VUORINEN, P.; DEL LUNGO, A. Status and trends in global forest plantation development. **Forest Products Journal**, Roma, v. 52, n. 7-8, p. 12-23, 2002.

CARNEGIE, A.J.; LIDBETTER, J.R.; WALKER, J.; HORWOOD, M.A.; TESORIERO, L.; GLEN, M.; PRIEST, M.J. *Uredo rangellii*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on Myrtaceae in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 39, n. 5, p. 463-466, 2010.

CASTRO, H.A.; BERGAMIM, F.A.; KRUGNER, T.L. Padrão de produção de uredosporos em mudas de *Eucalyptus spp* inoculadas artificialmente com *Puccinia psidii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 10, n. 1/2, p. 155-170, 1984.

CASTRO, H.A.; KRUGNER, T.L.; IDERIHA, C.H.F.; CAPPELLO, M.S.C.; MARCHI, A.B. Inoculação cruzada de *Eucalyptus*, goiaba (*Psidium Guajava*) e jameiro (*Sisymbrium Jambos*) com *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 491-497, 1983.

CHINCHILLA, D.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; KEMMERLING, B.; NÜRNBERGE, T.; JONES, J.D.G.; FELIX, G.; BOLLER, T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. **Nature**, London v. 448, n. 7152, p. 497-502, 2007.

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, 2006.

COELHO, L. ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* - Ferrugem do eucalipto. **Summa phytopathologica**. v.27, p.295-300, 2001.

COUTINHO, L.N.; FIGUEIREDO, M.B. Efeito da temperatura na produção de uredosporos e teliosporos de *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 9(2):326, 1984.

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

DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v. 411, n. 6839, p. 826-833, 2001.

DE LORENZO, G.; BRUTUS, A.; SAVATIN, D.V.; SICILIA, F.; CERVONE, F. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). **Febs Letters**, Cambridge, v. 585, p. 1521-1528, 2011

DE TORRES M.; MANSFIELD, J.W.; GRABOV, N.; BROWN, I.R.; AMMOUNEH, H.; TSIAMIS, G.; FORSYTH, A.; ROBATZEK, S.; GRANT, M.; BOCH, J. Pseudomonas syringae effector AvrPtoB suppresses basal defence in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 368-382, 2006.

DESLANDES, L.; OLIVIER, J.; PEETERS, N.; FENG, D.X.; KHOUNLOTHAM, M.; BOUCHER, C.; SOMSSICH, I.; GENIN, S.; MARCO, Y. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 13, p. 8024-8029, 2003.

DEYOUNG, B. J.; INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, New York v. 7, n. 12, p. 1243-1249, 2006.

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, 2010.

DODDS, P.N.; LAWRENCE, G.J.; CATANZARITI, A.M.; AYLIFFE, M.A.; ELLIS, J.G. The Melampsora lini AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, n. 3, p. 755-768, 2004.

DODDS, P.N.; LAWRENCE, G.J.; CATANZARITI, A.M.; WANG, C.I.; AYLIFFE, M.A.; KOBE, B. ELLIS, J.G. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 23, p. 8888-8893, 2006.

DONG, J. X.; CHEN, C. H.; CHEN, Z. X. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 51, n. 1, p. 21-37, 2003.

DUBOS, C.; STRACKE, R.; GROTEWOLD, E.; WEISSHAAR, B.; MARTIN, C.; LEPINIEC, L. MYB transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 15, n. 10, p. 573-581, 2010.

EMBRAPA. **Eucagen, o Brasil e a Embrapa na liderança da rede internacional de sequenciamento do genoma do eucalipto**. Brasília, 2007. 2 p.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science, Kidlington**, v. 5, n. 5, p. 199-206, 2000.

EULGEM, T.; , RUSHTON, P.J.; SCHMELZER E, HAHLBROCK K, SOMSSICH, I.E. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **Embo Journal**, Oxford, v. 18, n. 17, p. 4689-4699, 1999.

EULGEM, T.; SOMSSICH, I. E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, n. 4, p. 366-371, 2007.

FAO. **Global forest resources assessment: main report**. Rome, 2010a. 340 p. (FAO Forestry Paper, 163).

_____. **Global forest in sustainable forest management: a statement of principles**. Rome, 2010b. 16 p.

FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto-ocorrência, temperatura para germinação de uredosporos, produção de teliosporos, hospedeiros alternativos e resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n.6, p. 603-604, 1981.

_____. Ferrugem do eucalipto. **Revista árvore**, Viçosa, v.7, n.2, p. 91-109, 1983.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.M. Fungal pathogens: The battle for plant infection. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 25, n. 6, p. 505-524, 2006.

FIGUEIREDO, M.B. Clico vital e ecologia de *Puccinia psidii*. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 69-71, 2001.

FODE, B. SIEMSEN, T.; THUROW, C.; WEIGEL, R.; GATZ, C. The Arabidopsis GRAS Protein SCL14 Interacts with Class II TGA Transcription Factors and Is Essential for the Activation of Stress-Inducible Promoters. **Plant Cell**, Baltimore, v. 20, n. 11, p. 3122-3135, 2008.

FUKUDA, Y. Interaction of tobacco nuclear protein with an elicitor-responsive element in the promoter of a basic class I chitinase gene. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 34, n. 1, p. 81-87, 1997.

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

GOHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 189-215, 2008.

GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. **Molecular Cell**, Cambridge v. 5, n. 6, p. 1003-1011, 2000.

GRANT, M.R.; GODIARD, L.; STRAUBE, E.; ASHFIELD, T.; LEWALD, J., SATTTLER, A.; INNES, R.W.; DANGL, J.L. Structure of the arabidopsis rpm1 gene enabling dual-specificity disease resistance. **Science**, Washington, v. 269, n. 5225, p. 843-846, 1995.

HE, P., SHAN, L., LIN, N.C.; MARTIN, G.B.; KEMMERLING, B., NÜRNBERGER T., SHEEN, J. Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. **Cell**, Cambridge, v. 125, n. 3, p. 563-575, 2006.

IGLESIAS-TRABADO G.; WILSTERMANN, D. Eucalyptus universalis. Global cultivated eucalypt forests map 2008. In: GIT Forestry Consulting's Eucalyptologies: Information resources on Eucalyptus cultivation worldwide. Disponível em: <<http://www.git-forestry.com>>. Acesso em 02 Jan. 2012.

INNES, R.W.; BENT, A.F.; KUNKEL, B.N.; BISGROVE, S.R.; STASKAWICZ, B.J. molecular analysis of avirulence gene avrrpt2 and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas-syringae* avirulence genes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 175, n. 15, p. 4859-4869, 1993.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>>. Acesso em: 08 Jan. 2012.

INTERNATIONAL LABOUR ORGANIATION. INTERNATIONAL year of forests 2011: What about the labour aspects os forestry? Genova, 2011. 11p.

JIA, Y.; MCADAMS, S.A.; BRYAN, G.T.; HERSHEY, H.P.; VALENT, B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **Embo Journal**, Oxford, v. 19, n. 15, p. 4004-4014, 2000.

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

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

KALDE, M.; BARTH, M.; SOMSSICH, I.E.; LIPPOK, B. Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 16, n. 4, p. 295-305, 2003.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 41-60, 2006.

LANGRELL, S. R. H.; GLEN, M.; ALFENAS, A. C. Molecular diagnosis of *Puccinia psidii* (guava rust) - a quarantine threat to Australian eucalypt and Myrtaceae biodiversity. **Plant Pathology**, London, v. 57, n. 4, p. 687-701, 2008.

LOEGERING, W. Q.; ELLINGBOE, A. H. FLOR, H.H. Pioneer in phytopathology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 59-66, 1987.

MARLATT R.B.; KIMBROUGH J.W. Rust (*Puccinia psidii*) of allspice (*Pimenta dioica*) appears in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v. 93, p.111, 1980.

MACLACHLAN, J. D. A rust of the pimento tree in Jamaica, BWI. **Phytopathology**, Lancaster, v. 28, n. 3, p. 157-170, 1938.

MAEO, K.; HAYASHI, S.; KOJIMA-SUZUKI, H., MORIKAMI, A., NAKAMURA, K. Role of conserved residues of the **WRKY** domain in the DNA-binding of tobacco **WRKY** family proteins. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 11, p. 2428-2436, 2001.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S.Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, Oxford, v. 126, n. 5, p. 969-980, 2006.

MONTESINOS, E. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. **International Microbiology**, Barcelona v. 6, n. 4, p. 221-223, 2003.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; BADOSA, E.; FRANCÉS J.; ALEMANY, J. LLORENTE, I.; MORAGREGA, C. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, n. 4, p. 169-175, 2002.

MOON, D.H.; LEITE, T.F., BRAGATTO, J.; BOARETTO, L.F.; LABATE, C.A.. Eucalyptus Rust(*Puccinia psidii*): Strictly a Brazilian Problem? **The america's j Plant. Science biotech**, Isleworth , 2012, In Press.

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

MYBURG,Z.; GRATTAPAGLIA, D.; POTTS, B.; LABATE, C.; BOSSINGER,G;
BYRNE,M.;VAILLANCOURT,R.; SEDEROFF,R.; SOUTHERTON, S. Sequencing of the
eucalyptus genome: a proposal to doe-jgi, 2006. 8 p.

NOMURA, K.; DEBROY, S.; LEE, Y.H.; PUMPLIN, N.; JONES, J.; HE, S.Y. A bacterial
virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. **Science**,
Washington, v. 313, n. 5784, p. 220-223, 2006.

PIZA, S.M.T.; RIBEIRO, I.J.A. Influência da luz e da temperatura na germinação de
uredosporos de *Puccinia psidii*. **Bragantia**, Campinas, v. 47, n. 1, p.75-78 1988.

PRYOR, L. D. The Biology of *Eucalyptus*, London: Edward Arnold, 1976. 82 p.

RIEDL, S.J.; LI, W.; CHAO, Y., SCHWARZENBACHER, R., SHI, Y. Structure of the
apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. **Nature**, London, v. 434, n. 7035, p.
926-933, 2005.

ROBERT, B. ABRAMOVITCH, R.B.; KIM, Y.J.; CHEN, S., MARTIN B. DICKMAN,
M.B.; MARTIN, G.B. Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease
susceptibility by inhibition of host programmed cell death. **Embo Journal**, Oxford, v. 22, n.
1, p. 60-69, 2003.

ROSS, C. A.; LIU, Y.; SHEN, Q. J. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*). **Journal
of Integrative Plant Biology**, Carlton, v. 49, n. 6, p. 827-842, 2007.

RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C. DO VALE, F.X.R. Influência da luz e do binômio
temperatura-tempo de água líquida para infecção de *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis*.
Fitopatologia Brasileira, Brasília, n.12, v. 2 p. 137, 1987.

RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A. Influência de temperatura, luz e origem
do inóculo sobre a produção de urediniósporos e teliosporos de *Puccinia psidii*. **Fitopatologia
Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 70-73, 1989.

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, n. 14, p. 55-61,
1989.

RUSHTON, P.J.; MACDONALD, H.; HUTTLY, A.K.; LAZARUS, C.M.; HOOLEY R.
Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the
promoters of alpha-Amy2 genes. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 29, n. 4, p. 691-
702, 1995.

RUSHTON, P.J.; TORRES, J.T.; PARNISKE, M.; WERNERT, P.; HAHLBROCK
K, SOMSSICH I.E. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor
response elements in the promoters of parsley PR1 genes. **Embo Journal**, Oxford, v. 15, n.
20, p. 5690-5700, 1996.

SANTOS, A.F.; AUER, C.G.;GRIGOLETTI JR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil:**
identificação e controle. Brasília, 2001. (EMBRAPA - Circular Técnica).

SIMPSON, J. A.; THOMAS, K.; GRGURINOVIC, C. A. Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 35, n. 5, p. 549-562, 2006.

SONG, W.Y.; WANG, G.L.; CHEN, L.L.; KIM, H.S.; PI, L.Y.; HOLSTEN, T., GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W.X.; ZHU, L.H.; FAUQUET, C.; RONALD, P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, XA21. **Science**, Washington, v. 270, n. 5243, p. 1804-1806, 1995.

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

SUZUKI, H.; XIA, Y.; CAMERON, R.; SHADLE, G.; BLOUNT, J.; LAMB, C., DIXON, R.A. Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 395, p. 169-179, 2004.

WANG, Z.; YANG, P.; FAN, B.; CHEN, Z. An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with the plant defence response. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 515-522, 1998.

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**, Calyton, v. 30, n. 3, p. 277-281, 2001.

YAN, N. CHAI, J. LEE, E.S.; GU, L.; LIU, Q., HE, J., WU, J.W.; KOKEL, D.; LI, H.; HAO, Q., XUE, D. SHI, Y. Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, London, v. 437, n. 7060, p. 831-837, 2005.

YANG, P.; CHEN, C.; WANG, Z.; FAN, B. CHEN. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 141-149, 1999.

ZHAO, Y., THILMONY, R., BENDER, C.L.; SCHALLER, A.; HE, S.Y. HOWE, G.A. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 485-499, 2003.

ZHONG, S.B.; YANG, B.J.; PURI, K.D. Characterization of *Puccinia psidii* isolates in Hawaii using microsatellite DNA markers. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 77, n. 3, p. 178-181, 2011.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J.D.; BOLLER, T.; FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**, Cambridge, v. 125, n. 4, p. 749-760, 2006.

2 ESTABELECIMENTO DE UM PATOSSISTEMA MODELO PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO *Eucalyptus grandis* - *Puccinia psidii*

Resumo

A ferrugem causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter é considerada uma grande ameaça à cultura do eucalipto. Apesar de raramente matar o hospedeiro, as plantas atacadas possuem grande redução no desenvolvimento, o que leva a enormes prejuízos econômicos. A resistência natural de *Eucalyptus spp* ao patógeno, assim como a existência de diversas raças do fungo, que apresentam diferentes níveis de patogenicidade, é amplamente conhecida. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um patossistema modelo, composto por um isolado do patógeno e por genótipos de plantas geneticamente próximas para servir de base para o estudo da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii*. A primeira etapa do trabalho envolveu o isolamento de uma linhagem monopustular do patógeno (Isolado **MF1**) a partir de uma população de campo. Posteriormente, 180 plantas com idade aproximada de 120 dias, provenientes de uma progênie de meios irmãos foram inoculadas com o isolado **MF1** e após avaliação diária do desenvolvimento dos sintomas, cinco plantas com alto nível de resistência (S0 com resposta hipersensível) e cinco plantas com alto nível de susceptibilidade (S3) foram selecionadas e clonadas. Com base no nível de resistência ou susceptibilidade, e no desenvolvimento individual de cada planta, um genótipo resistente, **Resistente 03**, e um genótipo susceptível, **Susceptível 04**, foram selecionados como plantas modelo. Os experimentos de validação mostraram que com exceção do genótipo **Susceptível 05**, todos os demais apresentaram os níveis de resistência ou susceptibilidade esperados.

Palavras-chave: *Eucalyptus*; *Puccinia psidii*; Seleção de plantas; Clonagem; Patossistema modelo

Abstract

The greatest single threat to eucalyptus culture is the rust caused by *Puccinia psidii*. Although it rarely lead to plant death, the diseased plants show considerable developmental reduction leading to large economical losses. Natural resistance in eucalyptus and a number of races with several different degrees of pathogenicity have long been reported. Thus the objective of this work was to perform the isolation of a monopustular *Puccinia psidii* (Isolate **MF1**) and to select a resistant and susceptible plant model in order to establish a model pathosystem to perform the molecular analysis. The pathogen was isolated from a single pustule from a field population and named **MF1**. Hundred and eighty plants from a half-sib progeny of Brasuz, were inoculated with **MF1** and five resistant and five susceptible plants were selected and multiplied by cloning. Based on the occurrence of symptoms and the development of each individual plant, a resistant (**Resistant 03**) and a susceptible (**Susceptible 04**) genotype were selected as plant models. With the exception of the **Susceptible 05** genotype, the validation experiments revealed that all of the selected plants showed the expected symptoms.

Keywords: *Eucalyptus*; *Puccinia psidii*; Plant selection; Cloning; Model patossistem

2.1 Introdução

A ferrugem é considerada uma grande ameaça à cultura do eucalipto (ALFENAS et al., 2004). Apesar de raramente matar o hospedeiro, os ataques em mudas e plantas jovens são

desastrosos, sendo que o desenvolvimento de algumas espécies pode ser reduzido em até 60% (DIANESE; MORAES et al., 1984). Dentre as espécies mais susceptíveis encontram-se: *Eucalyptus cloeziana*, *E. phaeotricha*, *E. globulus*, *E. nitens* e *E. grandis* (ALFENAS et al., 2004), sendo a última a mais amplamente cultivada no território nacional (SOUZA et al., 2004).

O combate à doença pode ser feito por meio de fungicidas, entretanto a existência de grande variabilidade genética inter e intra específica para resistência permite o controle por meio da utilização de plantas resistentes (ALFENAS et al., 2004), sendo essa medida a mais indicada por sua viabilidade econômica e ambiental (ALFENAS; DEMUNER; BARBOSA, 1989).

No início do ano de 2011, os primeiros dados provenientes do sequenciamento do genoma de *Eucalyptus grandis* foram liberados para a comunidade científica (<http://web.up.ac.za/eucagen/>), sendo a planta sequenciada batizada com o nome de Brasuz (detalhes no capítulo 1). O sequenciamento completo do genoma do eucalipto abriu novas perspectivas para o entendimento das bases moleculares do mecanismo de resistência à ferrugem, auxiliando nos processos de seleção e desenvolvimento de genótipos resistentes.

Infecções naturais em áreas de incidência da ferrugem e inoculações artificiais têm sido utilizadas para identificação de genótipos resistentes (CARVALHO et al., 1998). O "índice de ferrugem" onde a porcentagem média de plantas e o número médio de pústulas em 100 folhas de cada árvore são considerados (DIANESE, MORAES; SILVA, 1984) ou o percentual de folhas e ramos com ferrugem (RUIZ et al., 1989a), são métodos descritos para avaliação de resistência sob condições naturais. Entretanto, tais métodos consideram a variável incidência e não severidade (JUNGHANS, ALFENAS; MAFFIA, 2003). Além disso, variações do patógeno e ambiente podem influenciar na avaliação dos resultados (DIANESE, MORAES; SILVA, 1984; DIANESE; HARIDASAN; MORAES, 1986).

Em condições controladas de inoculação foram descritos métodos que consideram o número de soros totais em 2,4cm² de área foliar (RUIZ et al., 1989b); componentes de resistência (período latente médio, frequência e intensidade de infecção, produção de uredinósporos, período infeccioso e período latente) (CASTRO, 1983; COELHO, 1988) e a distribuição e tamanho das pústulas no limbo foliar (FERREIRA; SILVA, 1982). Entretanto, a contagem do número de soros e a análise dos componentes de resistência são inviáveis quando o número de amostras a serem avaliados é alto e devido à necessidade de equipamentos de microscopia. Por outro lado, apesar da avaliação da distribuição e tamanho

das pústulas ser um método facilmente executável, não existe relação entre distribuição e tamanho das pústulas (JUNGHANS, ALFENAS; MAFFIA, 2003).

Junghans, Alfenas e Maffia (2003) desenvolveram uma escala simples e precisa para avaliação da severidade da doença em plantas inoculadas em condições controladas. Nessa escala, a classe de severidade é considerada de acordo com o tamanho da pústula. Com base no diâmetro de cada pústula, os autores definiram a seguinte escala de notas (Figura 2.1): S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade (HR), com necrose ou “fleck”; S1 = pústulas puntiformes, < 0,8 mm de diâmetro; S2 = pústulas medianas, de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e S3 = pústulas grandes, > 1,6 mm de diâmetro, podendo ocorrer uredínias em pecíolos e hastes jovens.

Figura 2.1- Escala de notas para avaliação da resistência à ferrugem do eucalipto. A escala é composta por 4 classes de severidade: **S0** = imunidade ou reação de hipersensibilidade (HR), com necrose ou “fleck”; **S1** = pústulas puntiformes, < 0,8 mm de diâmetro; **S2** = pústulas medianas, de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e **S3** = pústulas grandes, > 1,6 mm de diâmetro. Figura retirada de Junghans et al. (2003)

A possibilidade de utilização de diferentes isolados, controle do estágio de desenvolvimento do hospedeiro, concentração e origem do inóculo assim como possibilidade de avaliação em qualquer época do ano, independentemente de períodos favoráveis à doença traz grandes vantagens a esse método de seleção quando comparado às avaliações feitas em condições naturais (JUNGHANS, ALFENAS; MAFFIA, 2003).

Diante das vantagens da seleção de plantas em condições controladas e a facilidade e precisão nas avaliações apresentadas na escala de notas desenvolvida por Junghans, Alfenas e Maffia (2003), adotou-se nesse estudo esse método para a seleção de genótipos resistentes e suscetíveis à *P. psidii*.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer um patossistema modelo para o estudo da interação molecular planta-patógeno entre *P. psidii* e *E. grandis*.

Para tanto, os objetivos específicos foram: 1) Obtenção de um isolado monopustular de *P.psidi*; 2) Seleção de plantas resistentes e susceptíveis a partir de uma população segregante de meios irmãos provenientes da planta Brasuz; 3) Estabelecimento de duas plantas modelo fenotipicamente contrastantes com relação às características resistência e susceptibilidade.

2.2 Material e Métodos

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

Mudas de *E. grandis* altamente susceptíveis à ferrugem (material M09D1) com idade aproximada de 100 dias foram fornecidas pela Cia Suzano de Papel e Celulose. As plantas foram aclimatadas por 10 dias em câmara de crescimento (CONVIRON E15) sob condições controladas de temperatura (20°C) com regime de fotoperíodo de 12 horas luz ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e 12 horas de escuro.

Cerca de 50 folhas de *E. grandis* com alto índice de contaminação com *P. psidii*, provenientes do município de Itapetininga-SP, foram fornecidas pela Cia Suzano de Papel e Celulose. As folhas foram mergulhadas em 200 mL água Milli-Q acrescida de 0,2% (v/v) de tween 20 e mantidas em *shaker* sob constante agitação (130 RPM) à 20°C por 30 minutos. A concentração dos esporos foi estimada por contagem em Câmara de Neubauer e ajustada para 10^5 esporos/mL. A solução foi então transferida para pulverizador manual, aspergida sobre as mudas até que as folhas ficassem totalmente saturadas (Figura 2.2 A e B). Para manutenção da umidade no ponto de saturação, as plantas foram cobertas com saco plástico transparente (Figura 2.2 C). 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 Kristalon Branco (1g/L), Tenso (0,04g/L) e Nitrato de cálcio (1g/L) duas vezes por semana.

Figura 2.2 - Sistema de inoculação de urediniósporos de *P.psidii* em plantas de eucalipto. **A**- Aspersão dos urediniósporos esporos sobre as plantas. **B** – Folhas saturadas com solução de urediniósporos. **C** - As plantas são cobertas com saco plástico para manutenção de alta umidade

Após a esporulação, uma única pústula (Isolado Max Feffer 1 - MF1) foi coletada com auxílio de algodão o qual foi cuidadosamente raspado em uma única folha de uma muda susceptível (M09D1) previamente aclimatada sob as condições descritas, em outra câmara de crescimento. A muda foi então submetida as mesmas condições previamente descritas até o momento da esporulação, quando os esporos foram coletados e aspergidos novamente em material suscetível. Esse procedimento foi realizado periodicamente para a obtenção de esporos frescos até a conclusão dos experimentos.

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

Cento e oitenta mudas provenientes de uma população segregante de meios irmãos com cerca de 100 dias foram fornecidas pela Cia Suzano de Papel e Celulose. As mudas foram produzidas a partir de sementes coletadas da planta Brasuz, genótipo que teve o seu genoma sequenciado pelo Joint Genome Institute (JGI) (<http://web.up.ac.za/eucagen/>). O material vegetal foi aclimatado e submetido à inoculação com o isolado **MF1** (10^5 esporos/mL) conforme previamente descrito, sendo as plantas avaliadas diariamente com relação à ocorrência de sintomas, segundo escala estabelecida por Junghans et al. (2003). Dentre as plantas que se apresentaram susceptíveis ao patógeno, 5 plantas com alto nível de susceptibilidade (classe S3) foram selecionadas, e nomeadas como **Susceptível 01**, **Susceptível 02**, **Susceptível 03**, **Susceptível 04** e **Susceptível 05**.

Após 30 dias, as plantas inicialmente resistentes foram novamente inoculadas, dessa vez com uma solução 10 vezes mais concentrada (10^6 esporos/mL). Cinco plantas com alto nível de resistência (classe S0 com reação de hipersensibilidade do tipo "fleck") foram selecionadas e nomeadas como **Resistente 01**, **Resistente 02**, **Resistente 03**, **Resistente 04** e **Resistente 05**.

As plantas selecionadas foram tratadas com fungicida Bayfidan (2mL/L) e transferidas para vasos plásticos de 5L preenchidos 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 (26°C) e posteriormente submetido à clonagem.

2.2.3 Clonagem e multiplicação do material vegetal selecionado

Cerca de 4 meses após a transferência para os vasos (Figura 2.3 A), as plantas foram podadas a 30 cm da base para emissão de novos ramos, fisiologicamente aptos ao enraizamento (Figura 2.3 B) e mantidas em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura (26°C) (Figura 2.3 C) até os ramos atingirem o desenvolvimento ideal para o preparo das estacas (Figura 2.3 D).

Figura 2.3- Preparo das plantas selecionadas para o processo de clonagem. **A**– As plantas foram utilizadas após cerca de 4 meses da transferência para os vasos. **B**- As plantas foram podadas a 30 cm da base para emissão de ramos fisiologicamente aptos ao enraizamento. **C**- Após a poda as plantas foram mantidas em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura. **D**- Após cerca de 50 a 60 dias os brotos estavam prontos para serem utilizados. Esse mesmo sistema foi utilizado para obtenção de ramos jovens e utilização das plantas em experimentos que envolveram inoculação com *P.psidi*

Após o período de 50 a 60 dias, as plantas tiveram as 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 cm (Figura 2.4 A) 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., 2004). Após o preparo, as estacas foram tratadas com ácido indolbutírico (AIB) a 1000 partes por milhão (ppm), veiculado em talco comercial (Figura 2.4 B), transferidas para tubetes preenchidos com substrato (Plantmax) e vermiculita superfina na proporção 3:1, previamente umedecidos (Figura 2.4 C) e mantidas em casa de enraizamento dotada de sistema de irrigação por nebulização por 30 dias (Figura 2.4 D) e temperatura entre 30 e 35°C. Decorrido esse período, as mudas foram transferidas para área de aclimação dotada de sombrite 50% (Figura 2.4 E) e após 7 dias para canteiro a céu aberto para rustificação e crescimento (Figura 2.5 F). Tanto no período de enraizamento, como no de aclimação não foram realizadas fertilizações, as quais se iniciaram a partir da fase de rustificação. Decorridos cerca de 50 dias, 20 mudas de cada genótipo foram finalmente transferidas para vasos plásticos de 5L montados conforme previamente descrito.

Figura 2.4-Processo de clonagem das plantas selecionadas. **A-** Estacas com cerca de 10 cm de comprimento e as folhas cortadas transversalmente (barra = 3 cm). **B-** Estacas tratadas com AIB (1000 ppm). **C-** Transferência das estacas tratadas com AIB para tubetes. **D-** Transferência dos tubetes para casa de enraizamento. **E-** Transferência dos tubetes para área de aclimação dotada de sombrite 50%. **F-** Canteiro a céu aberto para rustificação antes das mudas serem transferidas para os vasos. Barra branca em **A** representa 2,5 cm

2.2.4 Preparo do material vegetal para validação

Assim como no processo de clonagem, após cerca de quatro meses os indivíduos **Resistente 03, Resistente 04, Resistente 05, Susceptível 01, Susceptível 03, Susceptível 04** e **Susceptível 05** foram podados a 30 cm da base para emissão de novos ramos (Figura 2.3 A, B, C e D), uma vez que folhas fisiologicamente jovens são atacadas pelo patógeno. Após a emissão dos ramos, as plantas foram podadas sempre que necessário para manutenção do tecido vegetal juvenil. O mesmo procedimento foi realizado com clones da planta Brasuz fornecidos pela Cia Suzano de Papel e Celulose.

2.2.5 Validação do material selecionado

Para a validação do material selecionado, um indivíduo de cada genótipo foi aclimatado e submetido à inoculação com o isolado **MF1** (10^5 esporos/mL) conforme procedimento previamente descrito, sendo os sintomas avaliados diariamente. Clones da planta progenitora Brasuz e plantas susceptíveis (material M09D1) foram utilizados como tratamentos testemunhas. Esse procedimento foi realizado três vezes com diferentes plantas do mesmo genótipo, totalizando assim três repetições biológicas, uma vez que não há espaço suficiente na câmara de crescimento para acomodar todas as repetições em um único experimento. Duas plantas de cada genótipo foram plantadas na estação experimental da CIA Suzano no município de Itapetininga - SP em uma área de alta infestação da ferrugem para avaliação do comportamento das plantas em condições de campo.

2.2.6 Seleção dos genótipos modelo

Com base no desenvolvimento dos sintomas e no desenvolvimento individual de cada genótipo, dois indivíduos fenotipicamente contrastantes para as características resistência e susceptibilidade foram selecionados, para juntamente com o isolado **MF1**, serem utilizados como modelos biológicos no patossistema *P.psidi* - *E.grandis*.

2.3 Resultados

2.3.1 Obtenção da linhagem monopustular de *P.psidi*

A esporulação nas folhas do material M09D1 iniciou-se aos 9 dias após a inoculação (d.a.i.), sendo que aos 12 d.a.i., quando as pústulas estavam bastante evidentes uma única pústula foi coletada e inoculada em uma única folha de uma planta susceptível. O processo de esporulação nessa planta iniciou-se também aos 9 d.a.i., sendo a quantidade de esporos produzida suficiente para aspersão em novas plantas e multiplicação.

2.3.2 Seleção de plantas resistentes e susceptíveis

Após a primeira inoculação e avaliação dos sintomas na progênie proveniente da planta Brasuz, cinco plantas com alto índice de susceptibilidade (classe S3) foram selecionadas. As plantas que não apresentaram esporulação após a primeira inoculação inicialmente não foram incluídas em nenhuma classe, sendo apenas separadas das plantas susceptíveis. Com o aumento da concentração dos esporos na segunda inoculação, muitas dessas plantas apresentaram esporulações puntiformes ($<0,8$ mm), típicas da classe S1. Todas as plantas que não apresentaram sinais de esporulação foram classificadas como S0 HR (reação de hipersensibilidade do tipo "fleck" ou necrótico). Dentre as plantas que mesmo após a segunda inoculação mostraram-se resistentes, as cinco que apresentavam sintomas mais brandos foram selecionadas e juntamente com as cinco plantas susceptíveis previamente selecionadas foram submetidas ao processo de clonagem.

2.3.3 Clonagem das Plantas selecionadas

Após a poda para a emissão de novos ramos, os indivíduos **Resistente 01**, **Resistente 02** e **Susceptível 03** morreram, não sendo possível realizar a clonagem desse material. Todos os genótipos remanescentes apresentaram índice satisfatório de enraizamento. Entretanto, o número reduzido de clones produzidos impediu a realização de uma análise estatística confiável que permitisse avaliar a taxa de enraizamento de cada genótipo.

2.3.4 Validação do material selecionado

Com exceção do genótipo **Susceptível 05**, todos os demais apresentaram o fenótipo esperado (resistentes classe **S0** com resposta hipersensível do tipo "fleck" ou susceptíveis classe **S3**) (Figura 2.5 C, D, E, G, H, I). Os clones desse genótipo, inicialmente classificado como **S3** apresentaram-se como uma planta pertencente à classe **S2** (Figura 2.5 J) em todas as repetições biológicas. Todos os genótipos resistentes (**Resistente 03**, **04** e **05**), tiveram a classificação inicial confirmada (**S0** com resposta hipersensível do tipo "fleck"), sendo que o genótipo **Resistente 05** apresentou um número maior de manchas cloróticas em relação aos demais (Figura 2.5 E). Já os indivíduos **Resistente 03** e **Resistente 04** comportaram-se de forma muito semelhante com relação ao aparecimento dessas manchas, com o indivíduo **Resistente 03** apresentando sintomas ligeiramente mais atenuados (Figura 2.5 C). Dentre as demais plantas susceptíveis (**Susceptíveis 01**, **03** e **04**), todas confirmaram a classificação inicial (classe S3), entretanto, o genótipo **Susceptível 01** apresentou um nível de esporulação ligeiramente superior (Figura 2.5 G). Apesar dos genótipos **Susceptível 03** e **04**,

comportarem-se de maneira muito semelhante com relação à taxa de esporulação, o genótipo **Susceptível 04** apresentou taxa ligeiramente maior. A planta progenitora Brasuz, utilizada como tratamento testemunha para a característica resistência, mostrou sintomas muito semelhantes às plantas **Resistentes 03 e 04**, sendo classificada, portanto, como **S0** com resposta hipersensível do tipo "fleck". A avaliação das plantas em condições de campo confirmam as características selecionadas.

2.3.5 Seleção dos genótipos modelo

O fato do genótipo **Susceptível 05**, nos experimentos de validação das características selecionadas, comportar-se como uma planta pertencente à classe **S2** (Figura 2.5 J) excluiu a possibilidade de sua utilização como modelo de susceptibilidade. Apesar do genótipo **Susceptível 01** apresentar taxa de esporulação levemente superior àquelas apresentadas pelos demais genótipos susceptíveis (Figura 2.5 G), a taxa de crescimento desse genótipo foi também superior àquela apresentada pelos demais, sendo, portanto, também descartada a possibilidade de utilização desse genótipo como modelo de susceptibilidade. Os genótipos **Susceptível 03 e 04** apresentaram taxas de desenvolvimento muito semelhantes, com o genótipo **Susceptível 04** apresentando a taxa de esporulação levemente superior (Figura 2.5 I). Dessa forma esse genótipo foi escolhido como modelo de estudo para susceptibilidade.

Dentre as plantas resistentes, o genótipo **Resistente 05** apresentou um número de manchas cloróticas superior aos demais (Figura 2.5 E), sendo descartada a possibilidade de sua utilização como modelo para resistência. Os genótipos **Resistente 03 e 04** apresentaram uma taxa de desenvolvimento muito semelhante à do genótipo **Susceptível 04**. Entretanto, o genótipo **Resistente 03** (Figura 2.5 C) apresentou os sintomas ligeiramente atenuados em relação ao **Resistente 04** (Figura 2.5 D), sendo, portanto, selecionado como modelo de estudo para resistência. Dessa forma, os genótipos **Resistente 03, Susceptível 04** e o isolado **MF1** compõem o patossistema modelo *E. grandis*-*P. psidii*, utilizado nas demais etapas desse trabalho.

Os genótipos **Resistente 04 e 05** e **Susceptível 01, 03 e 05**, estão sendo mantidos em casa de vegetação para futuros estudos.

Figura 2.5 - Validação dos genótipos selecionados com relação aos fenótipos resistência e susceptibilidade e seleção dos genótipos modelo. **A e B**- Clone da planta progenitora Brasuz utilizado como tratamento testemunha para a característica resistência. **C**- Genótipo Resistente 03, selecionado como modelo de estudo para resistência. **D**- Genótipo Resistente 04 apresentou os sintomas ligeiramente mais fortes que o genótipo Resistente 03. **E**- Genótipo Resistente 05, apresentou elevado número de manchas cloróticas. **F**- Material M09D1 como tratamento testemunha para a característica susceptibilidade. **G**- Genótipo Susceptível 01. Apesar de ter apresentado maior nível de susceptibilidade, a taxa de desenvolvimento desse genótipo mostrou-se superior à dos demais. **H**- Genótipo Susceptível 03, apresentou taxa de esporulação levemente inferior ao genótipo Susceptível 04. **I**- Genótipo Susceptível 04, selecionado como modelo de estudo para susceptibilidade. **J**- Genótipo Susceptível 05, apresentou mudança de classe na escala de severidade da ferrugem de S3 para S2

2.4 Discussão

Tendo em vista que diferentes genótipos de *Puccinia psidii* apresentam diferentes níveis de virulência (MACLACHLAN, 1938), o isolamento de uma única pústula é importante para garantir que os esporos utilizados nos experimentos subsequentes constituam-se de um mesmo genótipo, possuindo assim o mesmo nível de patogenicidade e desenvolvimento no interior do tecido do hospedeiro.

A seleção de plantas para o estudo da interação-planta patógeno entre *E. grandis* e *P. psidii* teve como intuito a utilização de genótipos que fossem geneticamente próximos entre si com características contrastantes para resistência e susceptibilidade e que ao mesmo tempo fossem geneticamente próximas à planta Brasuz.

As cinco plantas susceptíveis selecionadas foram todas incluídas na classe S3 de severidade da doença. Segundo Junghans, Alfenas e Maffia (2003), a classe S3 representa o maior nível de susceptibilidade à *P. psidii*, e as plantas incluídas nessa classe apresentam pústulas grandes (>1,6 mm) e esporulação intensa em ambas as faces das folhas, podendo ocorrer em pecíolos e hastes jovens. Os genótipos susceptíveis selecionados apresentavam claramente todos esses sintomas, sendo, na maioria das folhas, impossível distinguir pústulas individuais, uma vez que as folhas estavam completamente cobertas de uredinósporos.

O aumento da concentração de esporos na segunda inoculação do material inicialmente classificado como resistente induziu a formação de pústulas puntiformes (<0,8 mm), típicas da classe S1. Esse resultado revela que o nível de resistência da planta está diretamente relacionado à concentração do inóculo. Resultados semelhantes foram descritos em outros patossistemas (DORWORTH, 1979; DOLAR, 1997; ANGELOTTI et al., 2008)

A primeira etapa para o sucesso do patógeno no processo de colonização do tecido do hospedeiro é o rompimento de barreiras físicas como a cutícula e a parede celular, que constituem a imunidade pré-invasiva (GOHRE; ROBATZEK, 2008). O aparecimento de resposta hipersensível nas plantas resistentes indica que nenhuma barreira física impediu o reconhecimento do patógeno pela planta e a indução das respostas de defesa do hospedeiro.

Após a seleção do material vegetal, este foi submetido à clonagem por estaquia. Essa técnica destaca-se por promover a multiplicação de plantas-matrizes, mantendo suas características desejáveis (MELETTI, 2000), além de ser a técnica de maior viabilidade econômica em plantios clonais de eucalipto, permitindo a multiplicação dos genótipos de maneira rápida e a um baixo custo (PAIVA; GOMES, 1995). O processo de poda das plantas induziu a emissão de brotações com características fisiológicas e morfológicas juvenis, essenciais para a recuperação da competência de enraizamento (ALFENAS et al. 2004). Essas características também permitiram a utilização do mesmo sistema para a realização das inoculações, já que folhas com características morfológicas juvenis também são necessárias para o desenvolvimento de *P. psidii*. (MOON et al., 2012, GLEN et al., 2007, COUTINHO; WINGFIELD, 1998).

Após a produção dos clones, os genótipos foram submetidos à validação para confirmação das características selecionadas e estabelecimento de dois genótipos modelos contrastantes para os fenótipos resistência e susceptibilidade.

Durante o processo de validação, curiosamente os clones do genótipo **Susceptível 05**, inicialmente classificado como **S3**, apresentaram-se como uma planta pertencente à classe **S2**. Essa classe caracteriza-se por apresentar pústulas com tamanho entre 0,8 e 1,6 mm, e apesar de serem consideradas susceptíveis, a severidade com que a doença ataca as plantas pertencentes à classe **S3** é maior. Junghans, Alfenas e Maffia (2003) observaram mudanças entre classes de severidade em uma mesma planta em avaliações realizadas em diferentes períodos após a inoculação, sem alterações significativas entre plantas resistentes e susceptíveis. Da mesma forma, o genótipo **Susceptível 05**, apesar de ser avaliado como pertencente a uma classe diferente da classe em que foi previamente incluído continuou apresentando-se como um genótipo severamente atacado pela ferrugem.

Após a seleção, clonagem e validação das características presentes nas plantas selecionadas, objetivou-se escolher duas plantas modelo, fenotipicamente contrastantes para resistência e susceptibilidade para, juntamente com o isolado MF1, comporem o patossistema modelo de estudo da interação *E.grandis* - *P.psidi*. Para tanto, as plantas selecionadas deveriam apresentar os extremos de cada característica de interesse, ou seja, alto nível de resistência no caso do modelo resistente e alto nível de susceptibilidade no caso do modelo susceptível, além de taxa de crescimento semelhante, garantindo assim o mesmo estágio de desenvolvimento do material vegetal em ambos os genótipos no momento da realização dos experimentos. No caso do modelo resistente, além do alto nível de resistência, a planta deveria apresentar também sintomas que indicassem a presença do patógeno, garantindo dessa forma que nenhuma barreira física como cutícula e parede celular impedisse o reconhecimento do patógeno pela planta e consequente ativação do sistema de defesa. Dessa forma, todas as plantas resistentes selecionadas, além do alto nível de resistência, apresentaram manchas cloróticas típicas da presença do patógeno, sendo classificadas como **S0** com resposta hipersensível do tipo "fleck".

O fato do genótipo **Susceptível 05** comportar-se como uma planta pertencente à classe **S2** nos experimentos de validação das características selecionadas, excluiu a possibilidade de sua utilização como modelo de susceptibilidade, uma vez que plantas pertencentes à classe **S2** não são tão severamente atacadas quanto às plantas incluídas na escala **S3** (JUNGHANS; ALFENAS; MAFFIA, 2003).

Apesar do genótipo **Susceptível 01** apresentar uma taxa de esporulação ligeiramente maior em relação aos demais genótipos susceptíveis, a taxa de desenvolvimento desse genótipo mostrou-se superior aos demais, sendo, portanto, também descartada a possibilidade de utilização desse genótipo como modelo de susceptibilidade.

Os genótipos **Susceptível 03** e **04**, além de apresentarem taxas de esporulação semelhantes, apresentaram também taxas de crescimento muito parecidas. Dessa forma, como o genótipo **Susceptível 04** apresentou um nível de esporulação levemente superior em comparação ao genótipo **Susceptível 03**, ele foi escolhido como genótipo modelo de estudo para susceptibilidade.

Os genótipos resistentes apresentaram os primeiros sinais da presença do patógeno, caracterizados por manchas cloróticas, cerca de um dia antes dos genótipos susceptíveis e de forma consideravelmente mais acentuada. Curiosamente, as folhas que apresentaram tais sintomas nesses genótipos mostraram uma recuperação relativamente rápida. Assim, cerca de 15 d.a.i, as folhas apresentavam apenas leves sinais de que foram atacadas pelo patógeno.

Tais resultados sugerem que os genótipos resistentes previamente selecionados detectam a presença do patógeno mais rapidamente que os genótipos susceptíveis, sendo capazes de impedir o seu desenvolvimento. Além disso, aparentemente o patógeno não deve causar danos consideráveis aos tecidos infectados, dado o fato da rápida recuperação após a contenção do desenvolvimento da doença. No processo de validação dos genótipos selecionados, o genótipo **Resistente 05** apresentou um número de manchas cloróticas muito superior aos demais genótipos resistentes, sendo também excluída a possibilidade de sua utilização como genótipo modelo de resistência.

Os genótipos **Resistente 03 e 04**, além de possuírem padrão bastante semelhante com relação ao aparecimento de manchas cloróticas, apresentaram também taxa de crescimento muito semelhante à do genótipo **Susceptível 04**, selecionado como modelo de susceptibilidade. Entretanto, o genótipo **Resistente 03** demonstrou sintomas ligeiramente atenuados, sendo, portanto, selecionado como modelo de resistência.

A escala proposta por Junghans, Alfenas e Maffia (2003), mostrou-se muito eficiente e prática no desenvolvimento desse trabalho. Entretanto, nas etapas finais de seleção, quando plantas com características muito semelhantes tiveram que ser diferenciadas, foram encontradas dificuldades para a classificação dos genótipos. Dessa forma, genótipos pertencentes à mesma classe ainda apresentavam diferenças, mesmo que pequenas, no nível de esporulação (genótipos **Susceptível 01, 03 e 04**) ou manchas cloróticas (genótipos **Resistente 03 e 04**). Assim, faz-se necessário, o estabelecimento de classes intermediárias, que permitam a classificação precisa entre genótipos próximos. Entretanto, esse não foi o objetivo desse estudo.

As análises com marcadores SSR mostraram que a distância genética entre os genótipos selecionados para compor o modelo (**Resistente 03 e Susceptível 04**) é de 0,56. Quando essas plantas são comparadas com a planta progenitora Brasuz, ambas apresentam uma distância genética de 0,53.

2.5 Conclusão

A seleção criteriosa do material biológico para compor o patossistema modelo foi a primeira etapa para os estudos da interação entre *P. psidii* e *E. grandis*, apresentados nos capítulos seguintes. A seleção de genótipos contrastantes, que apresentam taxas de desenvolvimento similares e que sejam geneticamente próximos, bem como a utilização de um único genótipo do patógeno (isolado **MF1**), é fundamental para reduzir as variáveis que possam dificultar as análises histológicas e moleculares. Além disso, a utilização de genótipos

próximos à planta Brasuz permitiu grande precisão nas análises do transcrito, conforme descrito no capítulo 6.

O processo de estabelecimento do patossistema modelo permitiu a observação de algumas características descritas pela primeira como a influência da concentração do inóculo na quebra da resistência do eucalipto pela ferrugem e a recuperação de plantas resistentes após os sintomas iniciais. Esse trabalho conclui-se com o estabelecimento de um modelo genético para o estudo da interação planta patógeno entre *E. grandis* e *P. psidii*, o qual poderá ser utilizado em inúmeros outros trabalhos.

Referências

ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L.; BARBOSA, M.M. A ferrugem e as opções de controle. **Correio Agrícola**, São Paulo, n. 1, p. 18-20, 1989.

ALFENAS A.C.; ZAUZA E.A.V.; MAFIA R.G.; ASSIS T.F. Clonagem e doença do eucalipto. Viçosa: Editora UFV, 2004, 442p.

ANGELOTTI, F. SCAPIN, C.R., TESSMANN, D.J., VIDA, J.B; VIEIRA, R.A.; SOUTO, E.R. Resistência de genótipos de videira à ferrugem **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.9, p.1129-1134, 2008.

CASTRO, H.A. Padronização de metodologia de inoculação e avaliação da resistência de *Eucalyptus spp.* a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter, 116p. Tese(Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1983.

COELHO, L. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* Winter – Ferrugem do eucalipto.Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

DIANESE, J.C.; HARIDASAN, N.; MORAES, T.S.A. Screening *Eucalyptus* for rust resistance in Bahia. **Tropical Pest Management**, London, v. 32, p. 292-295, 1986.

DIANESE, J.C.; MORAES, T.S.D.; SILVA, A. R. Response of eucalyptus species to field infection by *Puccinia psidii*. **Plant Disease**, Saint Paul v. 68, n. 4, p. 314-316, 1984.

DOLAR, F. S. Effects of Leaf Age and Inoculum Concentration on Resistance of Detached Chickpea Leaflets to Two Different Races of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. **Tarım Bilimleri Dergisi**, Ankara, v.3, n. 1, p. 19-23, 1997.

DORWORTH, C.E. Influence of inoculum concentration on infection of red pine seedlings by *Gremmeniella-Abietina*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 69, n. 3, p. 298-300, 1979.

FERREIRA, F.A.; SILVA, A.R.C. Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *E. saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7. p. 23-27, 1982.

GOHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 189-215, 2008

GONTIJO, T.C.A.. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de aceroleira utilizando ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p.290-292, 2003.

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

MACLACHLAN, J.D. A rust of the pimento tree in Jamaica, BWI. **Phytopathology**, Lancaster, v. 28, n. 3, p. 157-170, 1938.

MAYER, N. A. Propagação assexuada do porta-enxerto umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) por estacas herbáceas. 109p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2001.

MELETTI, L.M.M. **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 239 p.

PAIVA, H.N.; GOMES, J. M. Propagação vegetativa de espécies florestais. Viçosa, Editora: UFV, 1995. 46p.

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, 1989a.

RUIZ R.A.R., ALFENAS A.C, MAFFIA L.A, BARBOSA M.N. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 6, p. 69-77, 1989b.

SOUZA, C.R. Comportamento da Acacia Mangium e de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em plantios experimentais na Amazônia Central. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p.95 - 101, 2004.

XAVIER, A.A.; SANFUENTES, E.V.; JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C. Resistência de espécies, progênies e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 139-147, 1998.

ZUFFELATO-RIBAS, K.C.; RODRIGUES, J.D. **Estaquia**: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2001. 39 p.

3 ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL DE *Eucalyptus grandis* À FERRUGEM (*Puccinia psidii* Winter) AO MICROSCÓPIO DE LUZ

Resumo

Apesar dos grandes prejuízo econômicos decorrentes de infecções causadas pela ferrugem na cultura do eucalipto, e da ampla exploração da resistência inter e intra específica de *Eucalyptus spp* no desenvolvimento de clones comerciais, pouco se conhece sobre a influência dos fatores genéticos tanto do patógeno quanto do hospedeiro no desenvolvimento do fungo. Com o objetivo de identificar os estágios de desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**, avaliar a resposta de cada genótipo à presença do fungo e estabelecer os melhores intervalos para a realização das análises moleculares, clones dos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** foram inoculados e avaliados sob o microscópio de luz em 12 intervalos. A visualização do patógeno foi possível a partir da 36^a hora após a inoculação (h.a.i.), somente no genótipo **Susceptível 04**. A partir do intervalo 72 h.a.i o patógeno apresentou rápido desenvolvimento no genótipo susceptível e aos 6 dias após a inoculação (d.a.i.) o mesofilo encontrava-se colonizado em diversas partes da folha. O processo de esporulação foi observado a partir do nono dia e grande aumento no número e tamanho das pústulas foi observado aos 12 d.a.i. além de diversas alterações nas células do hospedeiro, incluindo acúmulo de amido e compostos fenólicos. Estruturas como vesículas, célula mãe do haustório e haustório não foram evidenciadas. A presença do fungo não foi detectada no genótipo **Resistente 03** em nenhum dos intervalos.

Palavras-chave: *Eucalyptus*; *Puccinia psidii*; Interação planta-patógeno; Microscopia de luz

Abstract

Large economical losses are caused by *Puccinia psidii* infection in eucalyptus plantations. Although both inter and intra specific resistance have long been used in the development of commercial clones, little is known about the influence of genetic factors in the fungus and the plant, during disease development. This study was designed to identify the development stages of the **MF1** during infection of **Resistant 03** and **Susceptible 04** genotypes, evaluate the cell host response of each genotype to the presence of the pathogen and finally to establish the best intervals to carry out further molecular analyses. Clones of **Resistant 03** and **Susceptible 04** genotypes were challenged with **MF1** isolated evaluated using light microscopy at 12 time points. The visualization of the pathogen was possible from 36 hours post inoculation (h.p.i.), but only in the susceptible genotype. From 72 h.p.i. the pathogen spread quickly inside the susceptible host tissue and at 6 days post inoculation (d.p.i.) the mesophyll was completely colonized in several parts of the leave. The sporulation process was detected at 9 d.p.i. and at 12 d.p.i. the number and size of pustule increased greatly. Cellular alteration as phenolic compounds and starch accumulation was observed in the susceptible host tissue. Fungus structure such as vesicles, haustorial mother cell and haustoria were not observed. No evidence of the presence of the pathogen was found in the tissue of Resistant 03 genotype.

Keywords: *Eucalyptus*; *Puccinia psidii*; Plant-pathogen interaction; Light microscopy

3.1 Introdução

O fungo *Puccinia psidii* pertence à ordem Pucciniales, a qual está classificada no filo Basidiomycota. Essa ordem possui cerca de 6000 espécies descritas e distribuídas em 150 gêneros, todos parasitas obrigatórios em plantas, comumente conhecidos como ferrugem e frequentemente causam grandes prejuízos econômicos (SWERTZ, 1994).

O desenvolvimento desses patógenos é altamente influenciado pelas condições ambientais, e de maneira geral, o início do processo de infecção é fortemente favorecido por períodos de escuro, alta umidade e temperatura ideal, as quais variam de acordo com a espécie.

Na grande maioria das ferrugens, a penetração no tecido do hospedeiro ocorre via estômato, provavelmente influenciado por características físicas e químicas, as quais incluem a orientação das células da epiderme, ornamentações da cutícula, padrões dos cristais de ceras epicuticulares, e gradientes de pH na superfície foliar (revisado por SWERTZ, 1994). Apesar da penetração direta no tecido foliar ser aparentemente menos comum, esse mecanismo vem sendo relatado em algumas espécies como *Puccinia poaram* em *Tussilago farfara* e *P. psidii* em *Syzygium jambos* e *Eucalyptus grandis* (HUNT, 1968; WHIPPS; LEWIS, 1984; XAVIER et al., 2001). Uma vez dentro do tecido do hospedeiro, o fungo inicia o processo de colonização, desenvolvendo diversas estruturas, incluindo as hifas, vesículas, células mãe do haustório e haustório (SWERTZ, 1994).

O processo de infecção por *P. psidii* em folhas de clones resistentes e susceptíveis de *E. grandis* foi descrito por Xavier et al. (2001). Contrariamente ao observado na maioria dos fungos pertencentes à ordem Pucciniales (Uredinales), a penetração de *P. psidii* ocorre entre as paredes anticlinais da célula da epiderme. Após a penetração, a hifa de infecção origina a vesícula sub-epidermal, de onde se desenvolvem as hifas primárias e secundárias. O processo de infecção segue com a formação da célula mãe do haustório (CMH), de onde surge uma hifa que penetra a parede de células do mesofilo, sem romper a membrana plasmática, e origina o haustório, estrutura responsável pela captação de nutrientes da planta para o patógeno. Os autores demonstraram não haver diferença no desenvolvimento do patógeno entre os genótipos resistente e susceptível nos processos de germinação, formação do apressório e penetração. Observou-se porém um atraso de seis horas no desenvolvimento da hifa primária e haustório nas plantas resistentes, que ocorreram respectivamente 12 e 18 horas após a inoculação nas plantas susceptíveis e 18 e 24 horas respectivamente no indivíduo resistente. Após a formação do haustório, detectou-se no genótipo resistente o processo de morte celular, seguido de resposta hipersensível.

A compreensão da dinâmica do desenvolvimento do patógeno no interior do tecido do hospedeiro é de fundamental importância para dar suporte a estudos temporais da interação molecular planta-patógeno. O trabalho desenvolvido por Xavier et al. (2001) foi o primeiro e único estudo até o momento que envolve a análise histológica da interação *P.psidi* e *E.grandis*, e descreve a interação do patógeno com tecidos provenientes de genótipos resistente e susceptível. Entretanto, o estudo foi realizado com um único genótipo resistente e um único genótipo susceptível, bem como apenas um isolado. Diferenças no processo de infecção entre outras ferrugens e hospedeiros são amplamente divulgadas (MCINTOSH; WELLINGS; PARK, 1995), sendo essas diferenças dependentes da genética da interação planta-patógeno e de fatores ambientais. Dessa forma, é possível que patossistemas eucalipto-ferrugem envolvendo outros genótipos e isolados apresentem variações tanto nos padrões de desenvolvimento do fungo quanto na resposta da planta.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a anatomia da interação de *P.psidi* (isolado **MF1**) com os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**, previamente selecionados, para estabelecer os intervalos a serem estudados nas análises moleculares.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Instalação do experimento e coleta do material vegetal

Duas plantas de cada genótipo (**Resistente 03** e **Susceptível 04**) foram preparados, aclimatados e inoculados com o isolado **MF1** (10^5 esporos/mL) conforme descrito no capítulo 2 (Itens **2.2.1** e **2.2.4**). Folhas provenientes dos dois primeiros pares de cada ramo foram coletadas nos intervalos 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.) e 6, 9, 12 dias após a inoculação (d.a.i.).

Em cada um dos intervalos amostrados, três folhas de cada planta foram coletadas, totalizando assim, seis folhas por genótipo por intervalo de coleta.

3.2.2 Microscopia de luz

Imediatamente após a coleta retirou-se, com o auxílio de bisturi, amostras com tamanho próximo de 0,5cm X 0,5cm de cada folha, as quais foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M - pH 7,2 e CaCl₂ 0,001M). O material foi desidratado em diluição seriada de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) por 15 minutos cada, sendo a última (100%) realizada três vezes. As amostras foram então pré-infiltradas com mistura de etanol e resina (Leica

Historesin) na proporção 1:1 por 24 horas e finalmente com resina pura e pós ativador por mais 24 horas. O material foi posteriormente transferido para formas de plástico e polimerizadas com resina e endurecedor. Após 72 horas os blocos foram retirados e seccionados em micrótomo rotativo manual a 5 µm de espessura, sendo as secções coradas com azul de toluidina 0,05% (pH=2,5) (SAKAI, 1973) e as lâminas histológicas montadas em resina sintética (Entellan). As observações e captura de imagens foram feitas em microscópio Zeiss Axioskop 2, com câmera digital acoplada a um computador no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA) da ESALQ.

3.3 Resultados

3.3.1 Avaliação dos sintomas

Os sintomas da doença começaram a se manifestar entre o 5º e o 6º dia, apresentando-se de maneira mais intensa no genótipo resistente. As bordas das folhas apresentaram sinais de encarquilhamento, e manchas cloróticas puderam ser observadas na superfície foliar (Figura 3.1 A). Após esse período inicial, as plantas resistentes mostraram significativa recuperação. Aos 9 d.a.i., esse genótipo mostrava os sintomas atenuados (Figura 3.1 B), não sendo detectado nenhum sinal de esporulação. De maneira oposta, no mesmo intervalo os primeiros sinais de esporulação foram observados nas plantas susceptíveis (Figura 3.1 B), com os urediniósporos aparecendo esparsamente na superfície foliar. Finalmente, aos 12 d.a.i., as plantas susceptíveis apresentaram alta incidência de esporos em ambas as faces das folhas e as plantas resistentes possuíam apenas leves sinais do ataque do patógeno, o que permitiu a visualização somente de pequenas manchas cloróticas (Figura 3.1C).

Figura 3.1- Genótipos Resistente 03 (R03) e Susceptível 04 (S04) inoculados com o isolado MF1. **A-** O genótipo resistente apresenta os sintomas de maneira mais evidentes em comparação com o genótipo susceptível. **B-** Aos 9 d.i.a.s, o genótipo resistente apresenta significativa melhora em relação aos sintomas, sendo as primeiras pústulas visíveis no genótipo susceptível. **C-** Aos 12 dias após a inoculação o genótipo resistente apresenta apenas leves sintomas do contato com o patógeno e o genótipo susceptível apresenta pústulas bastante desenvolvidas. Barras brancas em A, B e C representam 2, 3, e 2,5 cm respectivamente

3.3.2 Avaliação dos cortes histológicos

Os cortes histológicos revelaram que a anatomia foliar de ambos os genótipos é muito semelhante. Dessa forma, provavelmente não há influência desse fator no processo de resistência (Figura 3.2 A e B). A visualização do patógeno foi possível a partir da 36^a h.a.i. somente no genótipo susceptível. Nesse intervalo, a hifa de penetração surge do apressório e penetra entre as paredes anticlinais das células da epiderme, imergindo no mesofilo (Figura 3.2 C).

Entre 36 h.a.i. e 60 h.a.i. apenas pequenos fragmentos de hifas foram observados no genótipo susceptível (Figura 3.2 D) e às 72 h.a.i. foi observado aumento da frequência dessas estruturas nos cortes (Figura 3.3 A).

Figura 3.2- Cortes histológicos de folhas de *E. grandis* nos intervalos 0, 36 e 48 h.a.i. **A-** Genótipo Resistente 03 antes da inoculação (0 h.a.i.). **B-** Genótipo Susceptível 04 antes da inoculação (0 h.a.i.). **C-** Penetração de *P.psidii* entre as paredes anticlinais das células da epiderme do genótipo susceptível 36 h.a.i. A seta preta indica um apressório, de onde parte a hifa de penetração, indicada pela seta vermelha. **D-** Genótipo susceptível 48 h.a.i. O mesofilo apresenta-se pouco colonizado, o que indica baixa taxa de desenvolvimento do patógeno logo após o processo de penetração. Setas indicam hifas do fungo. Barras pretas em A, B e D representam 25 µm. Barra preta em C representa 15 µm

No 6^o d.a.i. o mesofilo encontra-se colonizado em diversas partes e as hifas apresentam-se bastante desenvolvidas e ramificadas (Figura 3.3 B). A presença de alterações celulares nas células do hospedeiro susceptível foi visível a partir do 9^o d.a.i., quando foi possível observar aumento do volume citoplasmático em algumas células próximas às hifas.

No mesmo intervalo tornou-se visível o processo de esporulação sendo possível observar tanto o início do rompimento da epiderme, com as pústulas apresentando tamanho bastante reduzido (Figura 3.3 D), quanto pústulas ainda em formação, sem que a epiderme tenha sido rompida (Figura 3.3 C). Diversas alterações nas células do hospedeiro são claramente visíveis nesse intervalo, tais como hipertrofia celular, células com núcleo hipertrofiado e deformado e intenso acúmulo de amido em algumas células adjacentes às hifas, evidenciado por pontos translúcidos e brilhantes no conteúdo citoplasmático (Figura 3.3 C e D).

Figura 3.3 - Microscopia de luz de folhas de *E. grandis* suscetíveis à *P. psidii* nos intervalos 72 h.a.i., 6 e 9 d.a.i. **A-** No intervalo 72 h.a.i. observa-se aumento no número de hifas detectadas em comparação aos intervalos anteriores. Setas indicam as hifas. **B-** Aos 6 d.a.i. o mesofilo apresenta-se colonizado em diversos pontos. Nesse intervalo é possível observar as hifas bem desenvolvidas e ramificadas. Setas pretas indicam algumas hifas. Seta vermelha indica um ponto de ramificação de uma hifa. **C-** Pústula em formação aos 9 d.a.i. Setas pretas indicam células com grande quantidade de amido evidenciado por pontos translúcidos e brilhantes no conteúdo celular. Setas vermelhas indicam hifas do fungo. **D-** Aos 9 d.a.i. observa-se o início do processo de esporulação. Nesse intervalo as pústulas apresentam tamanho bastante reduzido. Barras pretas representam 50 µm

Aos 12 d.a.i., tanto pústulas bastante desenvolvidas, quanto novas pústulas em formação, foram observadas em diversas partes do tecido vegetal e em ambas as faces da folha (Figura 3.4 A, B, C e D). Nesse intervalo, algumas células do hospedeiro apresentaram acúmulo de compostos fenólicos evidenciado pela coloração escura do conteúdo intracelular (Figura 3.4 B), e outras se apresentam rompidas ou sem a definição da parede celular (Figura

3.4 D). Entretanto, o acúmulo de amido nas células adjacentes ao patógeno não é mais evidente.

Figura 3.4 - Microscopia de luz de folhas de *E.grandis* susceptíveis à *P.psidii* aos 12 d.a.i. **A-** Abertura de pústulas na epiderme abaxial. Três pústulas são visíveis no momento de sua abertura. É possível observar nitidamente a epiderme se rompendo, indicado pelas setas vermelhas, e a liberação dos primeiros esporos, indicado pelas setas pretas. **B-** Pústula já desenvolvida com acúmulo de compostos fenólicos (setas pretas) **C-** Pústulas desenvolvidas, presentes nas superfícies abaxial e adaxial. **D-** Células rompidas ou sem definição de parede aos 12 d.a.i. Setas pretas indicam células rompidas. Setas vermelhas indicam degeneração celular. Barras pretas em A, B e D representam 37 μ m. Barra preta em C representa 80 μ m

Estruturas como a vesícula sub-epidermal, célula mãe do haustório e haustório não foram evidenciadas. Não foi detectada a presença do patógeno no indivíduo resistente nos intervalos estudados e além disso, não se observou o desencadeamento de resposta hipersensível, evidenciado pela presença de necrose.

3.4 Discussão

O aparecimento dos sintomas iniciou-se entre o quinto e o sexto dia, com sinais de encarquilhamento das bordas das folhas infectadas e aparecimento de pequenas manchas cloróticas, sendo os primeiros esporos detectados a partir do nono dia. Diversos estudos mostram grandes divergências em relação ao tempo de aparecimento das primeiras pústulas,

podendo variar entre 4 e 15 dias após a inoculação (CASTRO et al., 1983; CASTRO, BERGAMIM; KRUGNER, 1984; RUIZ et al., 1989; COUTINHO; FIGUEIREDO, 1984; XAVIER et al., 2001). Essas divergências apresentadas entre os patossistemas envolvidos possivelmente se deve a diferenças ambientais as quais o material biológico foi submetido bem como por fatores genéticos que influenciam o nível de susceptibilidade do hospedeiro e o nível de patogenicidade do fungo.

A resposta inicial mais intensa presente nas plantas resistentes sugere que esse genótipo é capaz de detectar o patógeno rapidamente e desencadear uma forte resposta de defesa, impedindo seu desenvolvimento. O genótipo susceptível por sua vez, aparentemente detecta a presença do patógeno tardiamente, sendo incapaz de desencadear uma resposta de defesa efetiva.

Conforme previamente descrito, o monitoramento do processo de colonização do fungo no tecido vegetal do genótipo susceptível foi possível apenas a partir da 36^a hora, não sendo possível observar as etapas iniciais de desenvolvimento do patógeno que envolvem germinação e formação do apressório. O fato de o material vegetal ter sido totalmente imerso no tampão de fixação, assim como as sucessivas etapas de imersão que envolvem o processo de desidratação durante o preparo da amostra, possivelmente removeram o patógeno da superfície da folha, impedindo a visualização das etapas de germinação e formação do apressório.

No genótipo resistente, não foi detectada a presença do fungo em nenhum dos intervalos estudados. A exemplo do genótipo susceptível, é provável que o patógeno tenha sido removido da superfície foliar durante o preparo da amostra, não sendo possível o monitoramento de seu desenvolvimento durante a germinação e formação do apressório.

A falta de evidências da presença do patógeno nos demais intervalos de estudo poderia ser explicada pela ausência de penetração no tecido do hospedeiro resistente, possivelmente devido à presença de alguma barreira física como cutícula mais espessa. Entretanto, os cortes histológicos não mostraram diferenças na anatomia das folhas provenientes dos dois genótipos. Além disso, os sintomas apresentados pela planta entre o quinto e o sexto dia após a inoculação evidenciam claramente que nenhuma barreira física impediu o reconhecimento do patógeno, o que indica a provável ocorrência do processo de penetração. Dessa forma, é possível que a resposta de defesa desencadeada pelo genótipo resistente bloqueie o desenvolvimento do patógeno logo após a penetração, sendo os sintomas observados entre o quinto e sexto dia, um reflexo dessa resposta, e não uma evidência da presença do patógeno.

O processo de penetração entre as paredes anticlinais da célula da epiderme, evidenciado na 36^a h.a.i. corroboram com os resultados encontrados por Xavier et al. (2001) e por Hunt (1968). Esse mecanismo de penetração é bastante incomum entre os Pucciniales (Uredinales), que geralmente utilizam o estômato como via de acesso ao interior do hospedeiro (SWERTZ, 1994). O patógeno apresenta taxa de desenvolvimento lenta entre a 36^a e a 60^a h.a.i evidenciada pelo reduzido número de hifas encontradas no genótipo susceptível nesses intervalos. A partir do intervalo 72 h.a.i. o fungo se espalha rapidamente, e o mesofilo encontra-se colonizado em diversas regiões aos 6 d.a.i. O mesmo resultado foi encontrado por Xavier et al. (2001).

Alterações nas células do hospedeiro susceptível somente foram claramente visíveis a partir do 9^o d.a.i., quando em locais próximos à formação das primeiras pústulas, foi possível observar um aumento do volume citoplasmático em algumas células do hospedeiro próximas às hifas. O mesmo resultado foi encontrado por Mares (1979) em estudos da interação entre *Puccinia striiformis* e trigo, ao sexto dia de infecção. Ainda nesse intervalo pode ser observado intenso acúmulo de amido em algumas células adjacentes às hifas. Mudanças no conteúdo de amido após o processo de infecção vêm sendo relatado em muitas doenças foliares. O padrão geral envolve diminuição inicial do conteúdo de amido seguido de aumento desse carboidrato nas células presentes no local da infecção e posterior declínio (MEHROTRA; AGGARWAL, 2003). Macdonal e Strobel (1970) observaram diminuição no conteúdo de amido em cloroplastos de folhas de trigo entre o 5^o e 9^o dia após a inoculação com *Puccinia striiformis*. Entretanto, entre o 9^o e o 12^o dia, o conteúdo de amido dobrou nos cloroplastos de células adjacentes as hifas. Os autores sugerem que mudanças na atividade da enzima ADP glucose pirofosforilase podem contribuir para tais alterações. Folhas de *E.grandis* infectadas com *P.psidii* aparentemente possuem o mesmo padrão de variação no conteúdo desse carboidrato, uma vez que é possível observar um aumento no conteúdo intracelular em células adjacentes aos locais de infecção aos 9 dias após a inoculação, seguido de um posterior declínio aos 12 d.a.i., quando a presença de amido no interior das células não é mais visível.

Ainda aos 12 d.a.i., diversas células do hospedeiro susceptível apresentam nítido acúmulo de compostos fenólicos, evidenciados pela coloração escura presente no conteúdo intracelular (ESAU, 1974). Compostos fenólicos são metabólitos secundários envolvidos em processos como pigmentação, crescimento, reprodução e resistência a patógenos. Alguns desses compostos são estocados nas células vegetais em formas inativas e na presença de patógenos são convertidos em sua forma ativa (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI,

2006). No presente estudo, também aos 12 d.a.i., quando as pústulas se encontravam em estágio avançado de desenvolvimento, muitas células apresentavam-se sem definição da parede celular ou mesmo rompidas. Mares (1979) observou rompimento de células de trigo penetradas pelo haustório de *Puccinia striiformis* a partir do oitavo dia de infecção. A visualização do haustório pelo autor foi possível graças à utilização de microscopia eletrônica de transmissão. Limitações em termos de resolução apresentadas pela técnica de microscopia de luz provavelmente impediram a visualização do haustório no interior de células de eucalipto. Entretanto, é possível inferir que o rompimento das células possa ser devido à presença dessa estrutura.

3.5 Conclusão

As diferenças entre os tempos de aparecimento das primeiras pústulas, descrito em diversos trabalhos, bem como as diferenças no desenvolvimento do patógeno em relação ao trabalho descrito por Xavier et al. (2001) evidenciam a existência de variações na dinâmica do desenvolvimento do patógeno na interação entre *E.grandis* e *P.psidii*, reforçando a necessidade do conhecimento do processo de colonização do fungo no patossistema modelo para dar suporte as análises moleculares.

O genótipo resistente provavelmente detecta a presença do fungo mais rapidamente em relação ao genótipo susceptível, desencadeando uma resposta de defesa mais rápida e efetiva, bloqueando o desenvolvimento do patógeno.

A penetração no tecido do hospedeiro entre as paredes anticlinais da célula da epiderme confirma esse mecanismo de acesso ao interior do hospedeiro pelo fungo.

Modificações nas células do hospedeiro, típicas de resposta à presença de patógenos puderam ser claramente monitoradas, entretanto não foi possível evidenciar a presença do fungo no genótipo resistente, nem mesmo visualizar estruturas como vesícula sub-epidermal, CMH e haustório no genótipo susceptível através da técnica utilizada. A ausência de tais resultados são possivelmente devido a limitações da técnica empregada, como poder de resolução e espessura dos cortes, e preparo da amostra, que levou à remoção das estruturas da superfície foliar. Dessa forma, faz-se necessário o estabelecimento de uma técnica que permita monitorar o desenvolvimento do patógeno bem como identificar o desenvolvimento de suas estruturas em ambos os genótipos para o estabelecimento dos intervalos a serem estudados nas análises de transcrito.

Referências

- CASTRO, H.A. ; BERGAMIM, F.A. ; KRUGNER, T.L. Padrão de produção de uredosporos em mudas de *Eucalyptus spp* inoculadas artificialmente com *Puccinia psidii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 10, n. 1/2, p. 155-170, 1984.
- CASTRO, H.A. ; KRUGNER, T.L. ; IDERIHA, C.H.F. ; CAPPELLO, M.S.C. ; MARCHI, A. B. Inoculação cruzada de Eucalyptus, goiaba (*Psidium Guajava*) e jambeiro (*Sizygium Jambos*) com *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 491-497, 1983.
- COUTINHO, L.N.; FIGUEIREDO, M.B. Efeito da temperatura na produção de uredosporos e teliosporos de *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n.2, p.326, 1984.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1974, 312p.
- HUNT, P. Cuticular penetration by germinating uredosporos. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 51, p. 103-112, 1968.
- LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO, F. **Phytochemistry: Advances in Research**. Trivandrum, 2006, chap.2, p. 23-67.
- MACDONAL.PW; STROBEL, G. Adenosine diphosphate-glucose pyrophosphorylase control of starch accumulation in rust-infected wheat leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 46, n. 1, p. 126-135, 1970.
- MARES, D. Microscopic study of the development of yellow rust (*Puccinia-Striiformis*) in a wheat cultivar showing adult-plant resistance. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 15, n. 3, p. 289-292, 1979.
- MCINTOSH RA; WELLINGS CR; PARK RF. **Wheat rusts: an atlas of resistance genes**. CSIRO Australia: Kluwer Academic Publishers, 1995, 288 p.
- MEHROTRA, R.S.; AGGARWAL, A. **Plant Pathology**. New Deli, 2003, p.846
- RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A., VALE, F.X.R. Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade da luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 55-61, 1989.
- SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.
- SWERTZ, C. A. Morphology of germlings of urediniospores and its value for the identification and classification of grass rust fungi. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 36, p. 1-152, 1994.
- WHIPPS, J. M.; LEWIS, D. H. Infection and subsequent patterns of development of the pycnial-aecial stage of *Puccinia-poarum* on *Tussilago-farfara* and effect of the fungicide, oxycarboxin, on fungal growth. **Transactions of the British Mycological Society**, London v. 82, p. 455-467, 1984.

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**, Clayton v. 30, n. 3, p. 277-281, 2001.

4 ESTABELECIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO ENTRE *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA

Resumo

O desenvolvimento de *Puccinia spp* no interior do tecido do hospedeiro é dividido em diversas fases, com a formação de várias estruturas. O processo de infecção inicia-se com a germinação dos urediniósporos e formação do apressório, seguido da penetração do patógeno e colonização do tecido do hospedeiro terminando com o processo de esporulação. Dadas as dificuldades encontradas para observar o desenvolvimento do patógeno nas etapas iniciais de seu desenvolvimento, bem como a ausência de evidências de sua presença no genótipo Resistente 03, descritas no capítulo anterior, fez-se necessário o estabelecimento de um método que permitisse monitorar todas as etapas do processo de infecção de *Puccinia psidii* em *Eucalyptus grandis*. Dessa forma, desenvolveu-se um método simples de preparo de folhas inteiras, que permitiu o monitoramento de todas as etapas de desenvolvimento do patógeno, desde a germinação dos urediniósporos, até a fase de esporulação por meio de análises de microscopia de epifluorescência. O método também se mostrou promissor quando aplicado em estudos de microscopia confocal e para a preservação dos urediniósporos para serem analisados ao microscópio eletrônico de varredura.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; *Puccinia psidii*; Microscopia de epifluorescência; Microscopia confocal; Microscopia eletrônica de varredura

Abstract

The infection process of *Puccinia spp* inside the susceptible host is divided into several phases. It starts with urediniospore germination and appressorium formation, followed by penetration and colonization of host tissue ending with the sporulation process. Given the difficulty in monitoring the beginning of the infection process, as well as the inability to observe the presence of the fungus inside the resistant host tissue, as previously described in the last chapter, it was necessary to develop a method which allowed the whole infection process of *Puccinia psidii* in susceptible eucalyptus genotypes to be monitored. A simple and efficient whole leaf preparation method was established and it allowed the whole infection process to be monitored, from urediniospore germination to sporulation. The method was also shown to be promising when applied to confocal and scanning electron microscopy.

Keywords: *Eucalyptus grandis*; *Puccinia psidii*; Epifluorescence microscopy; Confocal microscopy; Scanning electron microscopy

4.1 Introdução

Patógenos biotróficos desenvolveram a habilidade de suprimir ou evitar as respostas de defesa das plantas absorvendo nutrientes do tecido vegetal vivo até completarem seu ciclo de vida (VOGEL et al., 2004). *Puccinia psidii* é um fungo biotrófico obrigatório, e até o momento somente estudos envolvendo a germinação desse patógeno foram descritos *in vitro* (FERREIRA, 1981; PIZA; RIBEIRO, 1988; FIGUEIREDO, 2001), não havendo nenhum

relato de sucesso na formação de micélio ou outras estruturas fora do tecido do hospedeiro. Dessa forma, o estudo do desenvolvimento de *P. psidii* deve ser realizado por meio da análise do tecido do hospedeiro contaminado.

Diversos métodos para análises de microscopia vêm sendo empregados para se estudar a colonização do tecido foliar por fungos. Entretanto, métodos que envolvem a preparação de folhas inteiras têm demonstrado serem os mais eficientes para se estudar todo o processo de infecção, devido à praticidade e rapidez. Dessa forma, diversos trabalhos têm empregado estratégias que envolvem a fixação e o clareamento do tecido vegetal seguido da coloração específica do patógeno. A etapa de clareamento pode ser realizada por meio de fervura do material vegetal em soluções clareadoras (ROHRINGER et al., 1977; DIEZ-NAVAJAS et al., 2007; CHASSOT et al., 2008), ou simplesmente pela imersão do material nessas soluções à temperatura ambiente (BRUZZESE; HASAN, 1983; KEANE; LIMONGIELLO; WARREN, 1988).

De maneira geral, os métodos que envolvem a fervura do material vegetal trazem excelentes resultados, permitindo uma visão bastante nítida do patógeno no interior da folha (DIEZ-NAVAJAS et al., 2007). Entretanto, o estudo dos estágios iniciais do processo de infecção é prejudicado, uma vez que as estruturas dos patógenos presentes nas primeiras etapas de seu desenvolvimento podem ser removidas, por se localizarem na superfície foliar. Por outro lado, a imersão do material vegetal em soluções clareadoras à temperatura ambiente facilita a visualização dos processos iniciais de infecção, embora grande parte das estruturas iniciais do desenvolvimento do patógeno possam ser perdidas (CARVER; INGERSONMORRIS, 1989). Além disso, dependendo da anatomia foliar, a visualização das estruturas internas do tecido vegetal é prejudicada, uma vez que o processo de clareamento por imersão em solução clareadora não é tão eficiente quanto o processo de fervura.

Carver e Ingersonmorris (1989) descreveram um método bastante simples e eficiente que permite o clareamento do tecido vegetal e impede que estruturas do patógeno sejam removidas da superfície foliar. Nesse método as folhas não são completamente imersas, mas ao invés disso, colocadas em papel de filtro embebido com solução clareadora. Zhang e Dickinson (2001) obtiveram bons resultados adaptando esse método ao estudo da interação entre *Triticum aestivum* (trigo) e *Puccinia recondita*.

Devido às dificuldades em se estudar os estágios iniciais do desenvolvimento de *P. psidii* em folhas de *Eucalyptus grandis*, bem como detectar a presença do patógeno em plantas resistentes e identificar as estruturas de infecção como vesículas, células mãe do haustório e haustórios em plantas susceptíveis, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um

método simples que permita a visualização de todo o processo de infecção de *P. psidii* em folhas susceptíveis de *E. grandis* ao microscópio de epifluorescência, para posterior aplicação nos materiais biológicos que compõem o patossistema modelo descrito no capítulo 2. Além disso, o método desenvolvido para o preparo da amostra foi também testado para aplicação em estudos ao microscópio confocal de varredura a laser (microscópio confocal) e ao microscópio eletrônico de varredura.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Instalação dos experimentos e coleta do material vegetal

Dois experimentos foram conduzidos, cada um com 50 plantas de *E. grandis* susceptíveis à *P. psidii* (material M09D1), com idade aproximada de 100 dias foram aclimatadas e inoculadas com o isolado **MF1** (solução 10^5 urediniósporos/mL) conforme descrito no capítulo 2 (item **2.2.1**). Folhas provenientes dos dois primeiros pares de cada ramo foram coletadas nos intervalos de 0 e 24 horas após a inoculação (h.a.i.) e 6, 9 e 15 dias após a inoculação (d.a.i.), totalizando seis folhas em cada um dos intervalos amostrados.

4.2.2 Desenvolvimento do método de fixação e processamento da amostra

Imediatamente após a coleta, folhas inteiras provenientes do primeiro experimento foram imersas em solução fixadora/clareadora (etanol e ácido acético glacial 3:1 v/v) por pelo menos 24 horas e posteriormente imerso em água milli-Q para reidratação por pelo menos 3 horas. Antes da visualização, o material vegetal foi corado por 5 minutos com solução de calcofluor (fluorescence brightener 28 Sigma F3543), montado em água entre lâmina e lamínula. A visualização ao microscópio de epifluorescência revelou que as estruturas do patógeno foram removidas durante o preparo da amostra.

Para evitar que o patógeno se destaque das folhas quando imerso na solução fixadora/clareadora, o material vegetal proveniente do segundo experimento, imediatamente após a coleta, foi fixado segundo Carver e Ingersonmorris (1989), modificado por Zhang e Dickinson (2001). As folhas foram colocadas em papel de filtro embebido em solução fixadora/clareadora (etanol e ácido acético glacial 3:1 v/v) por pelo menos 24 horas (Figura 4.1 A), transferidas para papel de filtro embebido em água milli-Q por pelo menos 4 horas (Figura 4.1 B) e finalmente estocadas em papel de filtro embebido em lactoglicerol (ácido láctico, glicerol e água milli-Q 1:1:1 v/v/v) (Figura 4.1 C). Para garantir que toda a folha tivessem contato com as soluções, a nervura central foi removida com o auxílio de bisturi

antes do início do processo de fixação. O material vegetal foi corado por 5 minutos com solução de calcofluor, montado em lâminas histológicas, coberto com lamínula e observado ao microscópio de epifluorescência. Apesar da retenção das estruturas do fungo na superfície foliar, o clareamento não foi eficiente o bastante a ponto de permitir a visualização do interior da folha (Figura 4.2).

Em virtude da não visualização do interior da folha, uma nova etapa foi então adicionada durante o preparo das amostras. Imediatamente antes de serem coradas, as amostras foram transferidas para placa de Petri contendo papel de filtro embebido em solução fervente de KOH. As placas foram mantidas em banho-maria, dentro de placas maiores, para manutenção da temperatura da solução (Figura 4.1 D). Foram testadas três diferentes concentrações de KOH (1, 1,5 e 2M) e quatro diferentes períodos de fervura (2, 5, 10 e 15 minutos). As amostras foram então coradas com calcofluor e montadas em lâminas conforme previamente descrito. Duas concentrações da solução de calcofluor, 0,1 e 0,2% foram testadas. Para verificar se o patógeno apresenta autofluorescência algumas lâminas foram montadas sem serem coradas.

Figura 4.1- Desenvolvimento do método para preparo das amostras: **A**- Fixação e primeira etapa do clareamento do material vegetal. A nervura central de cada folha foi removida e cada metade foi alocada em papel de filtro embebido em solução fixadora/clareadora. **B** – Reidratação do material vegetal. As amostras foram transferidas para papel de filtro contendo água Milli-Q para reidratação. **C**- Armazenamento do material vegetal. Após o período de reidratação o material vegetal foi armazenado em papel de filtro embebido em solução de lactoglicerol até o momento das análises. **D**- Segunda etapa do clareamento do material vegetal. Imediatamente antes de serem analisadas, as folhas foram alocadas em papel de filtro contendo solução fervente de KOH e mantidas em banho-maria para manutenção da temperatura

Figura 4.2- Fixação do material biológico em papel de filtro embebido com solução fixadora/clareadora. A fixação em papel de filtro preservou o patógeno na superfície foliar. Entretanto houve apenas um clareamento parcial do material vegetal, não sendo possível a visualização do interior da folha. Barra branca representa 50 μ m

4.2.3 Avaliação e validação do método desenvolvido

4.2.3.1 Microscopia confocal

O mesmo preparo de amostra foi realizado para as análises ao microscópio confocal. Para tanto foram utilizadas amostras de material vegetal coletadas às 24 h.a.i. aos 15 d.a.i.

4.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

O preparo das amostras analisadas ao microscópio eletrônico de varredura foi realizado segundo os mesmos procedimentos previamente descritos com exceção da etapa de fervura em solução de KOH. O material foi desidratado em sílica gel por 30 minutos, coberto com ouro e montado em *stubs*. Para verificar a eficiência do método em preservar o material biológico, realizou-se a análise do material a fresco. A fim de comparar a qualidade da fixação com métodos previamente descritos, realizou-se também a fixação com vapor de ósmio, desidratação em sílica por 3 horas e posterior cobertura com ouro segundo protocolo descrito por Kitajima e Leite (1999). Foram utilizadas amostras do material vegetal coletada aos 15 d.a.i.

4.2.4 Obtenção das imagens

As análises de microscopia de epifluorescência foram realizadas em microscópio Zeiss Axioskop 2, utilizando a seguinte combinação de filtros: filtro de excitação azul (BP 450-490 nm), divisor de feixe (FT 510 nm) e filtro verde de barreira (LP 515 nm). As análises ao microscópio confocal foram realizadas em microscópio Olympus FV1000 com excitação a 488 nm e emissão a 510 nm. As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em microscópio LEO 435VP, Cambridge Instruments. O microscópio confocal foi utilizado no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da ESALQ. Os microscópios de epifluorescência e eletrônico de varredura foram utilizados no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA) da ESALQ.

4.3 Resultados

4.3.1 Desenvolvimento do método de fixação e preparo do material vegetal para microscopia de epifluorescência

O preparo da amostra quando por imersão do material vegetal em solução fixadora/clareadora e posteriormente em água removeu o patógeno da superfície do hospedeiro. A realização de todas as etapas em papel de filtro impediu a remoção do patógeno, o que tornou possível sua visualização na superfície foliar. Entretanto, o processo de clareamento não foi eficiente a ponto de permitir a visualização do interior da folha. Além disso, a visualização das etapas iniciais do desenvolvimento do patógeno na superfície foliar não foi tão nítida devido à intensidade da fluorescência emitida pelo material vegetal (Figura 4.2).

A combinação do método de imersão incompleta com o método de fervura em KOH permitiu o suficiente clareamento da folha para visualização do desenvolvimento do patógeno em seu interior, sem remover as estruturas do fungo da superfície foliar. Os melhores resultados foram obtidos após a fervura das folhas por 10 minutos em solução KOH (1M).

As análises das lâminas sem a utilização do corante fluorescente revelaram que *P.psdi* apresenta autofluorescência. Entretanto, a adição de calcofluor aumentou a taxa de fluorescência observada (Figura 4.4 B). O aumento da concentração da solução de calcofluor de 0,1% para 0,2% não trouxe melhora evidente na fluorescência do patógeno (dado não mostrado).

4.3.2 Observação das estruturas do patógeno ao microscópio de epifluorescência

A técnica desenvolvida permitiu a visualização de todas as etapas de desenvolvimento do patógeno. Às 24 h.a.i. foi possível a visualização de um único tubo germinativo sem ramificações emergindo de cada urediniósporo germinado. Terminalmente aos tubos germinativos observou-se a formação do apressório, que apresentava fluorescência muito mais intensa, e do qual surgiu a hifa de penetração (Figura 4.3 A).

Seis dias após a inoculação foi possível observar o patógeno se espalhando e colonizando o mesofilo (Figura 4.3 B). Nesse intervalo foi também possível observar a presença da CMH, a qual surgia das hifas de infecção e apresentava fluorescência mais intensa. Apesar do haustório não fluorescer, a observação da CMH é uma evidência clara de sua presença. O mesmo resultado foi também observado por no estudo realizado por Zhang e Dickinson (2001), no qual somente a CMH de *Puccinia recondita* pôde ser visualizada utilizando-se microscopia de epifluorescência. O início do processo de esporulação pode ser observado aos 9 d.a.i. (Figura 4.3 C e D), com as hifas convergindo em vários pontos das folhas para formar as pústulas. A Figura 4.3 C e D permitem observar a mesma região em planos focais diferentes, tornando possível visualizar os primeiros esporos surgindo na superfície foliar e as hifas que originaram as primeiras pústulas.

Figura 4.3- Visualização do processo de infecção de *P.psidii* às 24 h.a.i. e aos 6 e 9 d.a.i. **A-** 24 h.a.i. A germinação de um urediniósporo origina um único tubo germinativo com a formação do apressório terminalmente de onde surge a hifa de penetração. **B-** Aos 6 d.a.i pode-se observa numerosas células mãe do haustório, com uma fluorescência mais intensa (setas brancas). **C-** Aos 9 d.a.i. pode-se observar as primeiras pústulas em formação (PF), onde os primeiros esporos são evidenciados. **D-** A mesma região aos 9 d.a.i. em um plano focal diferente, permitindo visualizar numerosas hifas convergindo para a formação das primeiras pústulas. Barras brancas em A e B representam 45 e 115 μm . Barras brancas em C e D representam 120 μm

Aos quinze dias, quando o processo de infecção encontrava-se em estágio avançado, foi possível visualizar pústulas desenvolvidas com grande abundância de urediniósporos (Figura 4.4 A).

A presença de autofluorescência em *P.psidii* permite a identificação do patógeno no interior e na superfície foliar sem a presença do corante fluorescente. Entretanto, a definição das estruturas não é tão nítida quando comparado ao material corado (Figura 4.4 B).

Figura 4.4- Visualização do processo de infecção aos 15 d.a.i. e presença de autofluorescência de *P. psidii*. **A-** Aos 15 d.a.i. o mesofilo encontra-se completamente colonizado e as pústulas (PS) cobertas de urediniósporos. **B-** Visualização do interior da folha aos 15 d.a.i. sem a presença do corante. *P. psidii* apresenta autofluorescência. Entretanto a presença de calcofluor permite uma visualização mais nítida das estruturas do patógeno. Barras brancas em A e B representam 120 e 65 μm respectivamente

4.3.3 Microscopia confocal

O método mostrou-se eficiente para o preparo do material para análises ao microscópio confocal. Às 24 h.a.i. foi possível visualizar os esporos germinados e o apressório formado terminalmente ao tubo germinativo, assim como na microscopia de epifluorescência, porém com qualidade de imagem superior (Figuras 4.5 A). A figura 4.5 (B, C e D) permite observar a sequência de imagens em três diferentes planos da mesma região, possibilitando visualizar o tecido do hospedeiro apresentando uma fluorescência mais intensa logo abaixo do apressório. A figura 4.5 D mostra nitidamente que o apressório foi formado na junção de três células, indicando que a penetração ocorreu entre as células da epiderme. A figura 4.5 B ainda permite a observação da fluorescência das equínulas do urediniósporo. Aos 15 dias após a inoculação, foi possível visualizar pústulas bem desenvolvidas e novas pústulas em formação (Figura 4.6 A e B). A Figura 4.6 (A) permite a visualização da combinação de imagens sucessivas de diferentes planos de uma pústula prestes a romper a epiderme.

Figura 4.5- Visualização do desenvolvimento de *P.psidi* às 24 h.a.i. ao microscópio confocal. **A**- Diversos esporos germinados com os respectivos apressórios formados terminalmente aos tubos germinativos. **B, C e D**- Imagens sequenciais em três diferentes planos da mesma região. **B**- Terminalmente ao urediniósporo germinado tem-se a formação do apressório. A seta branca indica as equinulas fluorescendo. **C**- Em um próximo plano é possível observar fluorescência no tecido do hospedeiro ao redor do apressório. **D**- Quando o plano não mais permite a visualização do apressório, o tecido do hospedeiro abaixo dessa estrutura apresenta intensa fluorescência (seta branca). É possível observar que a penetração ocorreu entre as células do hospedeiro. A seta vermelha mostra o tubo germinativo que parte do urediniósporo que originou o apressório, visível nos planos anteriores. ES representa um estômato. Barra branca em A representa 160 μ m. Barras brancas em B, C e D representam 18 μ m

Figura 4.6- Formação das pústulas aos 15 dias após a inoculação. **A**- Combinação de imagens sucessivas de diferentes planos de uma pústula ainda em formação. Os urediniósporos encontram-se no interior da folha. **B**- Pústula liberando os urediniósporos. É possível visualizar a epiderme rompida apresentando uma fluorescência mais intensa. barras brancas em A e B representam 80 e 85 μ m respectivamente

4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

A exemplo das análises de microscopia de epifluorescência e confocal, o método de fixação mostrou-se também aplicável para visualização do processo de esporulação. As análises realizadas a fresco permitiram a observação dos esporos com as respectivas ornamentações equinuladas (Figura 4.7 A). Entretanto observou-se menor riqueza de detalhes quando comparado as imagens obtidas a partir de material fixado (Figura 4.7 B, C e D). A fixação com vapor de ósmio permitiu a visualização de mais detalhes das estruturas do patógeno e do material vegetal (Figura 4.7 B). Entretanto, quando o processo de fixação foi realizado com o método descrito no presente trabalho, foi possível observar com maior nitidez tanto os urediniósporos, quanto o tecido vegetal (Figura 4.7 C e D). Na Figura 4.7 C pode-se observar em detalhes um urediniósporo equinulado em uma pústula. A Figura 4.7 D mostra uma pústula desenvolvida, com a presença de urediniósporos maduros e em estágio de formação, quando ainda não possuem as ornamentações equinuladas. É possível observar com detalhes a epiderme rompida no local de origem da pústula e a presença de estômatos.

Quando aplicado ao estudo do início do desenvolvimento do patógeno, que envolve a germinação e formação do apressório na superfície foliar, o método não se mostrou tão eficiente, uma vez que estruturas como tubo germinativo e apressório colabaram (dados não mostrados).

Figura 4.7- Aplicação do método de fixação à microscopia eletrônica de varredura. **A-** Material biológico analisado a fresco. É possível observar os urediniósporos com as ornamentações equinuladas. **B-** Fixação com vapor de ósmio. Esse processo de fixação permitiu a observação de maiores detalhes da estrutura do patógeno e do material vegetal. É possível visualizar os estômatos (ES) na superfície foliar. **C e D-** Fixação pelo método descrito nesse trabalho. **C-** Urediniósporo com as ornamentações equinuladas (seta branca) em uma pústula. **D-** Pústula liberando os urediniósporos. Urediniósporos (US) maduros e imaturos (USI), sem a presença de ornamentações são observados no interior da pústula. O material vegetal encontra-se bem preservado, com estômato (ES) nitidamente observado. Barras brancas em A, B, C e D representam 17,5, 50, 5,8 e 37 μm respectivamente

4.4 Discussão

O primeiro estudo histológico utilizando solução de Calcofluor para monitorar o desenvolvimento de Pucciniales (Uredinales) no interior dos tecidos de seus hospedeiros foi realizado por Rohringer et al. (1977). Desde então, diversos outros trabalhos vêm empregando calcofluor (KUCK et al., 1981) ou outros corantes fluorescentes como, uvitex 2B (MOLDENHAUER; MOERSCHBACHER; VAN DER WESTHUIZEN, 2006) ou Leucophor BMB (SOUTHERTON; DEVERALL, 1989) para esse tipo de estudo.

O trabalho de Zhang e Dickinson (2001) relata a ocorrência de autofluorescência em *P. recondite*. Embora *P. psidii* e *P. recondite* pertençam ao mesmo gênero, a fluorescência de *P. psidii* foi mais intensa com a utilização de filtro de barreira verde (515 nm) em vez de azul (420 nm), como descrito pelos autores. Apesar da presença de autofluorescência em *P. psidii*, a utilização de solução de calcofluor aumentou a intensidade dessa fluorescência, permitindo visão mais nítida das estruturas do patógeno.

Os métodos de preparação de folhas inteiras (ROHRINGER et al., 1977; CARVER; INGERSONMORRIS, 1989; ZHANG; DICKINSON, 2001; DIEZ-NAVAJAS, et al., 2007) apresentam grande vantagem em relação aos métodos que envolvem emblocamento e secção do material vegetal, por serem métodos rápidos e práticos. Tais métodos envolvem a fixação de folhas infectadas, clareamento e coloração das estruturas do patógeno. Métodos baseados no descrito por Rohringer (1977) vêm sendo extensivamente utilizados, incorporando corantes fluorescentes para visualização das amostras. O material vegetal é geralmente fixado e clareado por meio de fervura em solução de lactofenol/etanol, lavado diversas vezes com etanol e água, imerso em tampão Tris/HCl e finalmente corado. Apesar desse método trazer bons resultados, o grande número de passos envolvidos pode comprometer o entendimento do processo de infecção como um todo, uma vez que as estruturas presentes na superfície foliar podem ser removidas e as estruturas que se encontram no interior do tecido do hospedeiro podem sofrer colapso devido ao excesso de lavagens. Segundo Carver e Ingersonmorris (1989), segmentos foliares que foram sequencialmente imersos em soluções durante o preparo da amostra tiveram grande parte das estruturas do patógeno removidas da superfície da folha. Os mesmos autores obtiveram grande sucesso ao descreverem o método em que todas as etapas do preparo da amostra são realizadas em papel de filtro embebido com as devidas soluções, evitando a remoção das estruturas do patógeno da superfície foliar. Zhang e Dickinson (2001) modificaram esse método para estudar a interação entre trigo e *P. recondita*. Enquanto esse protocolo foi bastante eficiente para o processo de clareamento de folhas de trigo (folhas iso-bilaterais típicas de monocotiledôneas), a visualização das estruturas internas não foi possível quando aplicado à folhas de eucalipto (folhas dorsi-ventrais típicas de dicotiledôneas), provavelmente devido à presença de parênquima paliádico espesso e denso. Em folhas de trigo não há diferenciação entre o parênquima paliádico e lacunoso (ESAU, 1974), o que facilita a penetração da luz. A combinação da imersão incompleta descrita inicialmente por Carver e Ingersonmorris (1989) com a fervura em solução de KOH permitiu o monitoramento de todo o processo de infecção na interação entre *E. grandis* e *P. psidii* desde a germinação dos urediniósporos até o processo de esporulação. Essa combinação reduziu a remoção das estruturas do fungo da superfície foliar fornecendo uma visão mais representativa da dinâmica de desenvolvimento do patógeno.

As avaliações preliminares realizadas ao microscópio confocal indicaram que o método desenvolvido é promissor para esse tipo de análise, permitindo não somente a aquisição de imagens com riqueza de detalhes, mas também a visualização de alterações no tecido do hospedeiro. A presença de intensa fluorescência no tecido vegetal no local de

formação do apressório pode ser um indicativo de morte celular e formação de necrose (ZHANG; DICKINSON, 2001; MOLDENHAUER; MOERSCHBACHER; VAN DER WESTHUIZEN, 2006; MOLDENHAUER et al., 2008; AYLIFFE, et al., 2011). Entretanto, esse tipo de resposta é comumente descrito em plantas resistentes ou tolerantes que desencadeiam o processo de resposta hipersensível para impedir o desenvolvimento do patógeno. Diversas classes de compostos fenólicos são fortemente autofluorescentes quando irradiados com luz UV (HUTZLER et al., 1998). Dessa forma, tendo em vista a não detecção de necrose bem como as evidências do acúmulo de compostos fenólicos no interior do citoplasma de células do mesofilo descritas no capítulo 3 do presente estudo, é possível que a fluorescência detectada tenha sido devido ao acúmulo de tais compostos e não à presença de necrose.

O método mostrou-se também promissor para aplicação em análises envolvendo microscopia eletrônica de varredura. Essa técnica é ideal para se examinar a superfície de plantas obtendo-se imagens de boa qualidade. Apesar da possibilidade de rápidas observações poderem ser realizadas com material fresco, de maneira geral o material vegetal deve ser desidratado, uma vez que o microscópio é operado em alto vácuo e a maioria dos tecidos vegetais são distorcidos devido à remoção da água quando o material é submetido a essas condições (PATHAN; BOND; GASKIN, 2008). Diversas técnicas têm sido descritas para o processo de remoção de água do material vegetal, sendo a mais comum a secagem do material em aparelho de ponto crítico. O protocolo padrão para essa técnica envolve a fixação do material com glutaraldeído em tampão cacodilato e tetróxido de ósmio seguido de desidratação em série com concentrações crescentes de etanol antes de ser transferido para o aparelho de ponto crítico, onde ocorrerá a secagem do material biológico (PATHAN; BOND; GASKIN, 2008). À exemplo dos problemas apresentados no capítulo 2, as sucessivas etapas em que o material vegetal é imerso durante o processo de desidratação pode remover parte ou todas as estruturas do patógeno da superfície foliar, impedindo uma análise mais precisa do início do processo de infecção. A fixação, segundo método descrito por Kitajima e Leite (1999), evitou a remoção do patógeno da superfície foliar, uma vez que o material biológico não foi imerso em solução para o preparo e a fixação realizada pela presença de vapores de ósmio. Apesar de preservar as estruturas do patógeno na superfície foliar, a visualização das estruturas do fungo e principalmente da superfície foliar não foram tão nítidas.

Quando comparado às análises realizadas com tecido fresco e com a fixação em vapor de ósmio, o método apresentado mostrou-se muito eficiente para a preservação do material biológico. Assim, foi possível a obtenção de imagens que possibilitaram a visualização de

detalhes tanto do material vegetal, quanto dos urediniósporos. Apesar do método não permitir a fixação do material nas etapas iniciais de desenvolvimento do patógeno (germinação dos urediniósporos e formação do apressório) com a mesma eficiência, sua aplicação para o estudo dos estágios finais do processo de infecção mostrou-se viável, podendo também ser empregado em estudos de caracterização de urediniósporos de diferentes raças de *P.psidi*.

4.5 Conclusão

O método desenvolvido mostrou-se eficiente para o estudo do desenvolvimento de *P.psidi* em *E.grandis*. As dificuldades apresentadas no capítulo 3 foram superadas e o desenvolvimento do patógeno pôde ser monitorado desde a germinação até o processo final de esporulação. Os testes preliminares quanto à possibilidade do método em estudos de microscopia confocal foram satisfatórios. As imagens provenientes desse estudo mostraram-se ricas em detalhes e permitiram monitorar alterações no tecido do hospedeiro, que não foram identificadas nos estudos de microscopia de epifluorescência.

Embora a aplicação do método para os estudos de microscopia eletrônica de varredura não permitiu a obtenção de resultados satisfatórios no estudo das primeiras etapas do desenvolvimento do patógeno, o método se mostrou bastante promissor para estudos das etapas finais do processo de infecção, podendo também ser empregado para estudos de caracterização de urediniósporos de diferentes raças de *P.psidi*. Além de um único processo de fixação poder ser utilizado em diferentes tipos de análises, o método apresentado destaca-se por sua praticidade, rapidez, baixo custo e por não utilizar compostos altamente tóxicos como tetróxido de ósmio e glutaraldeído, geralmente utilizados nos processos de fixação de materiais biológicos para análises histológicas.

Referências

- AYLIFFE, M.; DEVILLA, R.; MAGO, R.; WHITE, R.; TALBOT, M.; PRYOR, A.; LEUNG, H. Nonhost Resistance of Rice to Rust Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, n. 10, p. 1143-1155, 2011.
- BRUZZESE, E.; HASAN, S. A WHOLE LEAF CLEARING AND STAINING TECHNIQUE FOR HOST SPECIFICITY STUDIES OF RUST FUNGI. *Plant Pathology*, London, v. 32, n. 3, p. 335-338, 1983.
- CARVER, T. L. W.; INGERSONMORRIS, S. M. Effects of inoculum density on germling development by *Erysiphe graminis f sp avenae* in relation to induced resistance of oat cells to appressorial penetration. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, p. 18-24, 1989.

CHASSOT, C.; BUCHALA, A.; SCHOONBEEK, H.J.; MÉTRAUX, J.P.; LAMOTTE, O. Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 555-567, 2008.

DÍEZ-NAVAJAS, A.M.; GREIF, C.; POUTARAUD, A., MERDINOGLU, D. Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. **Micron**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 680-683, 2007.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1974. 312p.

FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto-ocorrência, temperatura para germinação de uredosporos, produção de teliosporos, hospedeiros alternativos e resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n.6, p. 603-604, 1981.

FIGUEIREDO, M.B. Ciclo vital e ecologia de *Puccinia psidii*. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 69-71, 2001.

HUTZLER, P.; FISCHBACH, R.; HELLER, W.; JUNGBLUT, T.P.; REUBER, S.; SCHMITZ, R.; MARKUS, V.; WEISSENBOCK, G.; SCHNITZLER, J.P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 323, p. 953-965, 1998.

KEANE, P.J.; LIMONGIELLO, N.; WARREN, M.A.. A Modified Method for Clearing and Staining Leaf-Infecting Fungi in Whole Leaves. **Australasian Plant Pathology**, Calyton, v. 17, n. 2, p. 37-38, 1988.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura. 2 ed. Piracicaba. Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária/ESALQ, 1999.48p.

MOLDENHAUER, J.; MOERSCHBACHER, B. M.; VAN DER WESTHUIZEN, A. J. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp tritici) development in resistant and susceptible wheat cultivars. **Plant Pathology**, London, v. 55, n. 4, p. 469-474, 2006.

MOLDENHAUER J.; PRETORIUS, Z.A.; MOERSCHBACHER, B.M.; PRINS, R., VAN DER WESTHUIZEN, A.J. Histopathology and PR-protein markers provide insight into adult plant resistance to stripe rust of wheat. **Molecular Plant Pathology**, Oxford v. 9, n. 4, p. 137-145.

PATHAN, A. K.; BOND, J.; GASKIN, R. E. Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces-Horses for courses. **Micron**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1049-1061, 2008.

PIZA, S.M.T.; RIBEIRO, I.J.A. Influência da luz e da temperatura na germinação de uredosporos de *Puccinia psidii*. **Bragantia**, Campinas, v. 47, n. 1, p.75-78 1988 .

ROHRINGER, R.; KIM, W.K.; SAMBORSKI, D.J.; LOWES, N.K. CALCOFLUOR - optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. **Phytopathology**, Lancaster v. 67, n. 6, p. 808-810, 1977.

SOUTHERTON, S. G.; DEVERALL, B. J. Histological studies of the expression of the *lr9*, *lr20* and *lr28* alleles for resistance to leaf rust in wheat. **Plant Pathology**, London, v. 38, n. 2, p. 190-199, 1989.

TIBURZY, R.; HANSSLER, G.; REISENER, H.J. Visualization of rust haustoria in wheat leaves by using fluorochromes. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 19, n. 3, p. 439-441, 1981.

VOGEL, J.P.; RAAB, T.K.; SOMERVILLE, C.R.; SOMERVILLE, S.C. Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. **The Plant Journal**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 968-978, 2004002E

ZHANG, L.; DICKINSON, M. Fluorescence from rust fungi: a simple and effective method to monitor the dynamics of fungal growth in planta. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 137-141, 2001.

5 APLICAÇÃO DE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA PATÓGENO NO PATOSSISTEMA MODELO *Eucalyptus grandis* - *Puccinia psidii*

Resumo

O entendimento da dinâmica de desenvolvimento do patógeno, bem como a identificação da resposta do hospedeiro a cada etapa do desenvolvimento do fungo é a primeira etapa para a compreensão do mecanismo de resistência. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi aplicar o método de preparo de amostra descrito no capítulo anterior ao patossistema modelo descrito no capítulo 2, para identificar as diferenças no desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**. Não foram encontradas diferenças nos processos de germinação, formação do apressório e penetração que ocorreram às 3, 6, e 12 h.a.i. respectivamente nos dois genótipos. No genótipo **Susceptível 04** foi possível observar a formação da vesícula e da célula mãe do haustório (**CMH**) às 12 e 24 h.a.i. respectivamente e o processo de esporulação iniciando aos 9 d.a.i.. No genótipo **Resistente 03** não foi detectada a formação de **CMH**, tendo o processo de resistência se instalado entre os intervalos 18 e 24 h.a.i.

Palavras-chave: *Eucalyptus*; *Puccinia psidii*; Microscopia de epifluorescência; Processo de resistência

Abstract

Understanding the pathogen development as well as the host response to each stage of the fungus development is the first step to understand resistance process. Thus, the objective of this work was to apply the method of sample preparation described in the last chapter to try and identify the differences between the development of **MF1** inside the **Resistant 03** and **Susceptible 04** genotype. No differences were found in urediniospore germination, appressorium formation and penetration process which occurs at 3, 6 and 12 h.a.i. respectively in both genotypes. The vesicle and haustorial mother cell (**HMC**) were observed in the susceptible genotype at 12 and 24 h.p.i. respectively and the sporulation process was observed starting at 9 d.p.i. In the **Resistant 03** genotype **HMC** were not observed and the resistance process was established between 12 and 24 h.a.i.

Keywords: *Eucalyptus*; *Puccinia psidii*; Epifluorescence microscopy; Resistance process

5.1 Introdução

A ferrugem do eucalipto causada pelo basideomiceto *Puccinia.psidii* é uma doença de amplo espectro que afeta dezenas de hospedeiros da família *Mirtaceae*, considerada atualmente a maior ameaça à cultura do Eucalipto. A utilização de genótipos resistentes é a maneira mais eficiente para o controle da doença de modo que a existência de variabilidade tanto intra quanto inter específica vem sendo amplamente explorada em programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de genótipos resistentes. Entretanto, o conhecimento do mecanismo molecular de resistência ainda é muito pouco conhecido.

O entendimento da dinâmica de colonização do patógeno, bem como a reação do hospedeiro, é o primeiro passo para a compreensão do mecanismo de resistência e para se traçar estratégias de estudos moleculares e bioquímicos. Tendo em vista a existência de diferenças no processo de colonização devido a fatores ambientais e genéticos (do patógeno e do hospedeiro) em patossistemas envolvendo outros Pucciniales (Uredinales) e seus hospedeiros (MCINTOSH; WELLINGS; PARK, 1995), pode-se dizer que o conhecimento da dinâmica de colonização de *P.psidi* em eucalipto é escasso, uma vez que apenas um estudo foi realizado até o momento, com a utilização de apenas um isolado do patógeno e dois genótipos do hospedeiro (XAVIER et al., 2001).

Os resultados apresentados no capítulo 3 evidenciam de maneira bastante clara a resposta do hospedeiro susceptível à presença de *P.psidi*. Entretanto, o método empregado não permitiu a identificação de algumas estruturas de infecção do patógeno como vesículas e haustórios, nem monitorar o desenvolvimento do fungo no genótipo resistente. No capítulo 4 foi descrito o desenvolvimento de um método simples e eficiente, que permitiu a identificação dessas estruturas por meio de microscopia de epifluorescência. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi a aplicação desse método para o monitoramento do desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** previamente selecionados conforme descrito no capítulo 2.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Instalação dos experimentos e coleta do material vegetal

Dois clones de cada genótipo (**Resistente 03** e **Susceptível 04**) foram preparados, aclimatados e inoculados com o isolado **MF1** (10^5 esporos/mL) conforme descrito no capítulo 2 (Itens **2.2.1** e **2.2.4**). Folhas provenientes dos dois primeiros pares de cada ramo foram coletadas nos intervalos 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h.a.i. e 6, 9, 12 d.a.i.

Em cada intervalo, três folhas de cada planta foram coletadas, totalizando assim, seis folhas por genótipo.

5.2.2 Fixação e preparo das amostras

Imediatamente após a coleta, o material vegetal foi fixado e preparado conforme método desenvolvido e descrito no capítulo 4.

5.2.3 Coloração do material biológico com azul de anilina

Folhas coletadas às 3 e 6 h.a.i. foram coradas com solução de azul de anilina (0,05%) em solução de K_2HPO_4 (0,067M, pH=9,0) para complementar os estudos do desenvolvimento do patógeno na superfície do hospedeiro. Esse material não foi submetido à etapa de fervura em solução de KOH.

5.2.4 Obtenção das imagens

As análises foram realizadas em microscópio Zeiss Axioskop 2, utilizando a seguinte combinação de filtros: filtro de excitação azul (BP 450-490nm), divisor de feixe (FT 510nm) e filtro verde de barreira (LP 515nm).

Para a análise das amostras coradas com azul de anilina o mesmo microscópio foi utilizado, porém sem a utilização do sistema de fluorescência. As análises foram realizadas no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA) da ESALQ.

5.3 Resultados

5.3.1 Observação da dinâmica de desenvolvimento do patógeno em folhas dos genótipos Resistente 03 e Susceptível 04

O desenvolvimento do isolado **MF1** de *P.psidi* foi monitorado em folhas provenientes dos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** nos mesmos 12 intervalos utilizados para as análises de microscopia de luz descritas no capítulo 3 (**item 3.2.1**). Não observaram-se diferenças no desenvolvimento do patógeno em ambos os genótipos nos processos de germinação, formação do apressório e penetração. O processo de germinação iniciou-se às 3 h.a.i. (Figuras 5.1 A e B e 5.2 A e B) e a formação do apressório foi visualizada às 6 h.a.i. (Figuras 5.1 C e D e 5.2 C e D). De cada urediniósporo germinado emergiu um único tubo germinativo sem ramificações, com o apressório formado terminalmente a cada tubo, evidenciado por fluorescência mais intensa. As análises realizadas com coloração de azul de anilina, sem a fluorescência, revelaram que o conteúdo citoplasmático dos urediniósporos transfere-se gradualmente para o tubo germinativo à medida que esse cresce, e finalmente deposita-se no apressório (Figura 5.2 C e D).

Figura 5.1 - Análises de microscopia de fluorescência nos intervalos 3 e 6 h.a.i. **A e B**- Germinação dos urediniósporos (US) nos genótipos Resistente 03 e Susceptível 04, respectivamente. As setas indicam os tubos germinativos **C e D** - Formação do apressório (AP) terminalmente aos tubos germinativos (TG) nos genótipos Resistente 03 e Susceptível 04 respectivamente. Barras brancas representam 50 μ m em A e B e 80 μ m em C e D

Figura 5.2 - Coloração com azul de anilina de folhas coletadas às 3 e 6 h.a.i. **A e B**- Germinação dos urediniósporos (US) nos genótipos Resistente 03 e Susceptível 04, respectivamente. O conteúdo citoplasmático é gradualmente transferido para o tubo germinativo (TG) à medida que este cresce. **C e D** - Formação do apressório (AP) terminalmente aos tubos germinativos (TG) nos genótipos Resistente 03 e Susceptível 04, respectivamente. O conteúdo citoplasmático do urediniósporo é transferido para o apressório recém-formado. Barras brancas representam. Barras brancas em A, B, C e D representam 30, 45, 75 e 90 μ m respectivamente

O processo de penetração pôde ser observado às 12 h.a.i. com a visualização da hifa de penetração surgindo do apressório (Figura 5.3 A e B). No mesmo intervalo foi possível observar a vesícula sub-epidermal surgindo a partir da hifa de penetração no indivíduo susceptível (Figura 5.3 B). Essa estrutura não foi detectada no indivíduo resistente (Figura 5.3 A). Às 24 h.a.i. foi possível observar a formação da célula mãe do haustório (CMH) no indivíduo susceptível (Figura 5.3 D), a qual surgiu terminalmente às hifas primárias, apresentando fluorescência mais intensa. No mesmo intervalo, foi possível observar no genótipo resistente apenas fragmentos de hifas no interior das folhas (Figura 5.3 C).

Figura 5.3 -Microscopia de epifluorescência nos intervalos 12 e 24 h.a.i. **A e B**- Penetração às 12 h.a.i. nos genótipos Resistente 03 e Susceptível 04 respectivamente. De cada apressório (AP) surge a hifa de penetração (setas brancas). No genótipo susceptível é possível visualizar a formação da vesícula sub-epidermal (seta vermelha). **C e D** - Genótipos Resistente 03 e Susceptível 04 respectivamente às 24 h.a.i. No genótipo resistente foi possível observar apenas fragmentos de hifas no interior das folhas (seta branca). No genótipo susceptível foi possível visualizar a formação da CMH (seta branca). Barras brancas representam 40 μ m em A e B, 60 μ m em C e 75 μ m em D

Nos demais intervalos de estudo não foi possível detectar o fungo no interior do genótipo resistente. No genótipo susceptível, entre o intervalo 24 h.a.i. (quando ocorre a visualização das primeiras CMH) e 60 h.a.i., não se observa o desenvolvimento do patógeno no interior do tecido do hospedeiro, de modo que somente a visualização de pequenas hifas, as quais originam as CMH (dados não apresentados), puderam ser observadas. Entretanto, na

72^a h.a.i. observou-se o início da formação das hifas secundárias, o que indica o início à fase de colonização do mesofilo (Figura 5.4 A). Tais resultados corroboram aqueles previamente obtidos nos experimentos de microscopia de luz descritos no capítulo 3, onde entre a 36^a e a 60^a h.a.i. apenas poucos fragmentos de hifas foram observados no interior do indivíduo susceptível, com aumento na quantidade e no tamanho dessa estrutura às 72 h.p.i. Após o início da formação das hifas secundárias o patógeno se desenvolveu rapidamente e no 6^o d.a.i. foi possível observar grande parte desse tecido colonizado (Figura 5.4 B), a exemplo do resultado encontrado no estudo de microscopia de luz (capítulo 3). Aos 9 d.a.i. iniciou-se o processo de esporulação no genótipo susceptível. O mesofilo encontrava-se completamente tomado e as hifas convergiam em diversos pontos da folha para formar pequenas pústulas (Figura 5.4 C). Finalmente aos 12 d.a.i. as pústulas encontravam-se desenvolvidas com um elevado número de urediniósporos (Figura 5.4 D). Não foram detectadas alterações nas células do hospedeiro. A tabela 5.1 resume a dinâmica de desenvolvimento do isolado MF1 nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**.

Figura 5.4- Microscopia de epifluorescência nos intervalos 72 h.a.i., 6 e 9 d.a.i. no genótipo **Susceptível 04**. **A**- Início da fase de colonização do mesofilo às 72 h.a.i. Observou-se CMH (seta branca) e o início do desenvolvimento das hifas secundárias (setas vermelhas). **B**- Aos 6 d.a.i., o mesofilo encontrava-se colonizado em diversas partes da folha. CMH são indicadas pelas setas brancas. **C**- Aos 9 d.a.i., com o mesofilo todo colonizado, observou-se as primeiras pústulas em formação (PF). **D**- Aos 12 d.a.i. a superfície foliar encontrava-se coberta de urediniósporos. Em muitos pontos não foi possível identificar pústulas individuais. Barras brancas em A, B, C e D representam 50, 85, 130 e 260 μ m respectivamente

Tabela 5.1- Dinâmica do desenvolvimento do isolado **MF1** de *Puccinia psidii* nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**

Hospedeiro	Intervalo de estudo							
	3 h.a.i.	6 h.a.i.	12 h.a.i.	24 h.a.i.	72 h.a.i.	6 d.a.i.	9 d.a.i.	12 d.a.i.
Susceptível 04	Germinação dos urediniospóros	Formação do apressório	Penetração e formação da vesícula sub-epidermal	Formação da célula mãe do haustório	Início da fase de colonização	Mesofilo colonizado em diversos pontos da folha	Início do processo de esporulação	Pústulas desenvolvidas
Resistente 03	Germinação dos urediniospóros	Formação do apressório	Penetração	Resposta de defesa instalada	Patógeno não detectado	Patógeno não detectado	Patógeno não detectado	Patógeno não detectado

5.4 Discussão

O processo de infecção por ferrugens pode ser agrupado em diversas fases (Niks, 1983), e a resposta de defesa ocorre em qualquer uma delas (Hu e Rijkenberg, 1998). Dessa forma, análises histológicas têm sido geralmente utilizadas para a identificação da fase em que o desenvolvimento do patógeno é bloqueado (HU; RIJKENBERG, 1998; XAVIER et al., 2001; AYLIFFE, 2011; ZHANG et al., 2011) de modo que a escolha do método de análise depende das características do patossistema que se deseja estudar.

O método desenvolvido e descrito no capítulo 4 mostrou-se eficiente para o monitoramento de toda a dinâmica de desenvolvimento de *P.psidii* em folhas de *E. grandis* resistentes e susceptíveis. Os resultados obtidos a partir dessas análises não somente corroboram com aqueles provenientes das análises de microscopia de luz (capítulo 3), confirmando o desenvolvimento do patógeno mesmo em experimentos independentes, como também os complementam, tornando possível a identificação de estruturas anteriormente não detectadas e a identificação do intervalo em que o genótipo resistente é capaz de interromper o desenvolvimento do patógeno.

O processo de germinação iniciou-se às 3 h.a.i. com posterior formação do apressório às 6 h.a.i. em ambos os genótipos. As análises descritas por Xavier et al. (2001) também revelaram não haver diferença entre os processos de germinação e formação do apressório nos genótipos resistentes e susceptíveis estudados. Entretanto esses dois eventos ocorreram às 6 e 12 h.a.i. respectivamente, evidenciando diferenças no início do desenvolvimento entre o isolado **MF1** e o isolado estudado pelos autores. A função do apressório é auxiliar no processo de penetração do patógeno no tecido do hospedeiro. Para isso, essa estrutura se fixa firmemente no tecido vegetal e produz a hifa de penetração que irá perfurar a cutícula

permitindo o acesso do patógeno ao tecido do hospedeiro (MEHROTRA; AGGARWAL, 2003).

No presente estudo, em ambos os genótipos, detectou-se o processo de penetração às 12 h.a.i. Entretanto, somente no genótipo susceptível foi possível observar a formação da vesícula sub-epidermal. Segundo Mehrotra e Aggarwal (2003), o conteúdo do apressório é depositado no interior da vesícula, de onde partem posteriormente uma ou mais hifas que darão origem aos haustórios. A não visualização da vesícula no genótipo resistente pode ser devido à ausência de sua formação, com a planta bloqueando o desenvolvimento do patógeno antes do desenvolvimento dessa estrutura. (HU; RIJKENBERG, 1998) estudaram o desenvolvimento de *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* em espécies não-hospedeiras e observaram que em sorgo o desenvolvimento do patógeno é bloqueado após a formação da vesícula subestomática. Entretanto, no presente trabalho, a observação de fragmentos das hifas de *P.psidi* no genótipo resistente às 24 h.a.i. é uma forte evidência de que houve a formação da vesícula, uma vez que tais hifas são geralmente originadas a partir da vesícula (SWERTZ, 1994). Assim, é possível que dificuldades de visualização, devido à baixa frequência em que estão presentes nesse intervalo, pôde ter impossibilitado sua identificação no genótipo resistente. Os fragmentos de hifas visualizados na 24^a h.a.i são esparsamente encontrados, o que impossibilitou detectar sua origem ou sinal de continuidade em seu desenvolvimento. Esse fato leva à conclusão de que não somente o patógeno penetrou o tecido do genótipo resistente, mas também foi bloqueado rapidamente, com a resposta de defesa instalada entre a 12^a e a 24^a h.a.i.

A CMH é claramente visível às 24 h.a.i. no genótipo susceptível e apresenta fluorescência mais intensa que as demais hifas. Apesar do haustório não apresentar fluorescência, sua presença é evidenciada pela nítida visualização da CMH. O mesmo resultado foi relatado por Zhang e Dickinson (2001) e por Jacobs et al. (1996) em estudos da interação entre *Puccinia recondita* e trigo onde somente as CMH apresentavam fluorescência, o que evidencia a presença do haustório. Segundo Mehrotra e Aggarwal (2003) a formação do haustório estabelece uma relação muito específica com a membrana plasmática da célula do hospedeiro, sem causar danos consideráveis, uma vez que isso levaria a célula da planta à morte. Conforme o haustório cresce, há uma invaginação da membrana plasmática da célula vegetal para acomodar essa estrutura, formando-se assim a membrana extra-haustorial, sobre a qual o fungo mantém forte controle, alterando suas propriedades semipermeáveis. Dessa forma, a membrana perde a capacidade de controle do fluxo de nutrientes e açúcares passam livremente, nutrindo o patógeno. Xavier et al., (2001) observaram a formação do haustório no

genótipo resistente às 24 h.a.i. com desencadeamento do processo de morte celular, caracterizando a presença de resposta hipersensível.

A resposta hipersensível é claramente detectada pela intensa fluorescência das células do hospedeiro, de modo que há relatos tanto do uso da mesma combinação de filtros utilizada para a visualização da fluorescência do patógeno (ZHANG; DICKINSON, 2001), quanto da utilização de diferentes combinações (JACOBS et al., 1996; KEMP et al., 1999; BENDER, et al., 2000) para a detecção desse processo. Entretanto, no presente estudo, não foi detectado tal fenômeno em nenhum dos intervalos, mesmo quando utilizadas diferentes combinações de filtros. Zhang e Dickinson (2001), observaram que somente após a formação das CMHs a presença de necrose foi detectada, indicando que trata-se de um evento pós formação do haustório. Dessa forma, aparentemente o genótipo **Resistente 03** bloqueia o desenvolvimento do patógeno antes do haustório ser formado, não se desencadeando o processo de morte celular. A não identificação de morte celular nos estudos envolvendo a secção do material vegetal descritos no capítulo 3 é mais uma evidência da ausência desse fenômeno no processo de resistência do genótipo **Resistente 03** à *P.psidi*. Além disso as folhas do material resistente mostram atenuação dos sinais da infecção decorridos alguns dias após o início dos primeiros sintomas, evidenciando que não houve morte celular nesse genótipo.

Apesar do presente trabalho não ter permitido o monitoramento de modificações no tecido do hospedeiro, essas alterações foram claramente avaliadas nas análises realizadas ao microscópio de luz (capítulo 3), de modo que ambos os estudos são absolutamente complementares.

5.5 Conclusão

A aplicação da técnica descrita no capítulo 4 foi eficiente para se entender o desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**. Não observaram-se diferenças no desenvolvimento do patógeno em ambos os genótipos nos processos de germinação dos urediniósporos, formação do apressório e penetração, com a formação da vesícula sub-epidermal visível somente no genótipo susceptível. O processo de resistência apresentado pelo genótipo **Resistente 03** ocorre entre a 12^a e a 24^a h.a.i. e após a formação do haustório no genótipo **Susceptível 04**, aparentemente o fungo entra em estado de latência, até o início da formação das hifas secundárias. Enquanto esse estudo possibilitou a visualização das estruturas de infecção do patógeno, bem como a identificação do intervalo onde seu desenvolvimento é bloqueado no genótipo resistente, o estudo descrito no capítulo 3

possibilitou o entendimento da dinâmica das alterações que ocorrem nas células do hospedeiro susceptível, indicando que os estudos são absolutamente complementares. As diferenças encontradas durante o desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos estudados, e os resultados apresentados por Xavier et al.(2001) confirmam os resultados já descritos em outros patossistemas envolvendo Pucciniales (Uredinales) e seus hospedeiros, nos quais fatores genéticos tanto do patógeno quanto do hospedeiro e fatores ambientais possuem influência na dinâmica do desenvolvimento do patógeno (MCINTOSH; WELLINGS, 1995). Dessa forma, o estudo criterioso do padrão de desenvolvimento do isolado e a resposta específica de cada genótipo hospedeiro são essenciais antes de se iniciar estudos moleculares e bioquímicos.

Referências

- AYLIFFE, M.; DEVILLA, R.; MAGO, R.; WHITE, R.; TALBOT, M.; PRYOR, A.; LEUNG, H. Nonhost Resistance of Rice to Rust Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, n. 10, p. 1143-1155, 2011.
- BENDER, C.M.; PRETORIUS, Z.A.; KLOPPERS, F.J.; SPIES, J.J. Histopathology of leaf rust infection and development in wheat genotypes containing Lr12 and Lr13. **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 148, n. 2, p. 65-76, 2000.
- HU, G. G.; RIJKENBERG, F. H. J. Development of early infection structures of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* in non-host cereal species. **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin v. 146, n. 1, p. 1-10, 1998.
- JACOBS, A.S.; PRETORIUS, Z.A.; KLOPPERS, F.J.; AND T. S. COX, T.S. Mechanisms associated with wheat leaf rust resistance derived from *Triticum monococcum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, n. 6, p. 588-595, 1996.
- KEMP, G.; BOTHA, A.M.; KLOPPERS, F.J.; RETORIUS^b, Z.A. Disease development and beta-1,3-glucanase expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 45-52, 1999.
- MCINTOSH RA; WELLINGS CR; PARK RF. Wheat Rusts - An Atlas of Resistance Genes. CSIRO Australia: Kluwer Academic Publishers, 288p, 1995.
- MEHROTRA R .S.; AGGARWAL A. **Plant Pathology**, New Deli, 2003, p.846
- SWERTZ, C. A. Morphology of germlings of urediniospores and its value for the identification and classification of grass rust fungi. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 36, p. 1-152, 1994.

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**, Calyton, v. 30, n. 3, p. 277-281, 2001.

ZHANG, G.; LI, Y.M.; SUN, Y.F.; WANG, J.M.; LIU, B. Molecular characterization of a gene induced during wheat hypersensitive reaction to stripe rust. **Biologia Plantarum**, Praha v. 55, n. 4, p. 696-702, 2011.

ZHANG, L.; DICKINSON, M. Fluorescence from rust fungi: a simple and effective method to monitor the dynamics of fungal growth in planta. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 3, p. 137-141, 2001.

6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Eucalyptus grandis* RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À *Puccinia psidii* POR MEIO DA TÉCNICA DE *RNA-Seq*.

Resumo

Diversas estratégias são utilizadas pelos patógenos para driblar o sistema de defesa das plantas, para invasão e colonização do tecido vegetal. Da mesma forma, uma série de outras estratégias são utilizadas pelas plantas para impedir o desenvolvimento de microorganismos patogênicos e manter sua integridade. Apesar dos grandes prejuízos econômicos decorrentes do ataque do fungo *Puccinia psidii* a plantações de eucalipto e do conhecimento da existência de resistência inter e intra-específica, pouco se conhece sobre o mecanismo molecular de resistência. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar a interação molecular planta patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *P. psidii* ao nível transcricional e identificar genes relacionados ao mecanismo de resistência. Com base no desenvolvimento do isolado **MF1** no patossistema modelo descrito nos capítulos anteriores, seis intervalos de interesse foram estabelecidos para a realização de análises de *RNA-Seq*. As análises revelaram grandes diferenças no perfil transcricional dos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** em resposta ao isolado **MF1** e o envolvimento de diversos genes conhecidamente envolvidos no processo de resistência de plantas à patógenos. Para validação dos resultados e melhor compreensão do processo de resistência, 15 genes foram selecionados para análises de *qPCR*. Os resultados obtidos nesse estudo, somados aos resultados apresentados nos capítulos 2, 3, 4 e 5, permitiram-nos propor um modelo para explicar o mecanismo molecular de resistência.

Palavras chave: *Eucalyptus grandis*; *Puccinia psidii*, Interação molecular planta-patógeno *RNA-Seq*. PCR em Tempo Real

Abstract

A plethora of strategies are used by phytopathogens to break plant defense barriers in order to invade and colonize plant tissues. At the same time a profusion of other strategies are used by plants to avoid or minimize the pathogen invasion and development. Although large economic losses can be experienced due to *Puccinia psidii* attack and natural resistance in *Eucalyptus* trees is well documented, little is known about the molecular mechanism of resistance. Thus we aimed to study the molecular plant microbe interaction between *Eucalyptus grandis* and *Puccinia psidii* at the transcriptional level in order to identify candidate genes related to rust resistance. Based on the information generated in the previous chapters, six time points were selected to perform *RNA-Seq* analysis. Large differences were found in the transcriptional profiles between resistant and susceptible genotypes and the candidate genes related to the plant resistance process were identified. In order to validate the results and to better understand the resistance process, 15 genes were selected to be studied by *qPCR*. Together with the results presented in the chapters 2, 3, 4 e 5, we were able to propose a model to explain the molecular basis of resistance.

Keywords: *Eucalyptus grandis*; *Puccinia psidii*, Interação Molecular Plant microbe-Interaction, *RNA-Seq*. Real Time PCR

6.1 Introdução

Dois tipos básicos de resistência são conhecidos, a resistência monogênica e a resistência quantitativa. A resistência monogênica baseia-se no princípio de interação gene a gene, onde um único gene *R* é capaz de reconhecer e impedir a ação de um gene *Avr* do patógeno, conforme revisado no capítulo 1. Esse tipo de resistência é facilmente quebrada devido à presença de variabilidade genética do patógeno e a consequente existência de várias raças. Entretanto, algumas plantas possuem *clusters* de genes de resistência capazes de reconhecer e impedir a ação de diversas raças do patógeno. No caso da resistência quantitativa dois ou mais genes estão envolvidos no processo levando a uma diminuição no progresso da doença e aumento do período de latência, tornando mais difícil a ocorrência de quebra de resistência (KELLER et al., 2000).

Apesar da existência de resistência intra e interespecífica de *Eucalyptus spp* à *Puccinia psidii* ser amplamente conhecida (DIANESE; MORAES; SILVA, 1984; DIANESE, HARIDASAN; MORAES, 1986; CARVALHO et al., 1998; XAVIER et al., 2007; ZAUZA et al., 2010), o mecanismo molecular de resistência ainda é pouco estudado.

Análises com marcadores moleculares RAPD indicam uma região de aproximadamente 5 cM que flanqueia um gene com importante papel no mecanismo de resistência, *Ppr1* (*P. psidii* resistance gene 1) (JUNGHANS et al., 2003). Esse gene foi mapeado no grupo de ligação 3 no mapa genético de referência para eucalipto desenvolvido por Brondani et al. (2006) (MAMANI et al., 2010). Recentemente mapeou-se um QTL que explica 42% da variabilidade fenotípica existente em uma população de irmãos completos, segregante para resistência e susceptibilidade (ROSADO et al., 2010).

Moon et al. (2007) estudaram a expressão gênica de plantas resistentes e susceptíveis, em condições naturais de infecção. Os autores identificaram 110 genes diferencialmente expressos, dos quais 70 mostraram-se preferencialmente expressos nas plantas resistentes e 40 nas plantas susceptíveis. A análise dos genes com aumento de expressão nas plantas resistentes mostrou a presença de genes envolvidos no processo de polarização celular e reforço da parede celular. Diversos genes que codificam proteínas potencialmente envolvidas na resposta de defesa como quitinases (importantes para a hidrólise da parede celular do fungo e produção de elicitores), isoflavona redutase (envolvida na produção de fitoalexinas) e SGT1 (potencialmente relacionada à degradação de proteínas e que tem demonstrado estar envolvida na regulação da resistência conferida por diversos genes *R*) mostraram aumento de expressão nas plantas resistentes. Entretanto, seis dos 20 genes mais expressos nas plantas

resistentes apresentavam função desconhecida. Apesar da identificação de genes que codificam a produção de catalase, reconhecidamente envolvida no processo de resposta hipersensível, os autores não identificaram genes *R* clássicos que poderiam interagir com produtos de genes *Avr* do patógeno. Dessa forma, os autores colocam em dúvida a indução da resposta hipersensível para conter o desenvolvimento do fungo.

Os dados de sequências gênicas de *Eucalyptus spp* aumentaram significativamente nos últimos anos. Mizrachi, et al. (2010) descreveram um banco de dados que conta com 18.894 *Expressed Sequence Tags (ESTs)* provenientes de 6 diferentes tecidos de um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus Urophylla* (<http://eucspresso.bi.up.ac.za/>). Quase 80 mil *ESTs* estão disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Além disso, a liberação dos primeiros "Drafts" do genoma de *E.grandis* no início de 2011 juntamente com as anotações preliminares, tornaram públicos 44.974 transcritos e 9.961 transcritos alternativos (PHYTOZOME, 2011).

Dessa forma, diante da escassez de estudos sobre o mecanismo molecular de resistência do eucalipto à *P. psidii* e frente aos dados de sequências gênicas de *Eucalyptus spp* recentemente gerados, o presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da interação molecular planta-patógeno entre *E. grandis* e *P. psidii* ao nível do transcrito por meio da técnica de *RNA-Seq*. Para tanto, o objetivo específico do trabalho foi identificar a resposta de hospedeiros resistente e susceptível diante de cada etapa de desenvolvimento do patógeno. Assim, o patossistema previamente estabelecido (genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** e isolado **MF1**), descrito no capítulo 2 foi utilizado como modelo para o estudo. Os dados referentes à dinâmica do desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**, detalhados nos capítulos 3 e 5, serviram de base para o estabelecimento dos intervalos de estudo.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Instalação do experimento e coleta do material vegetal

Seis plantas de cada genótipo (**Resistente 03** e **Susceptível 04**) foram preparadas, aclimatadas e inoculadas com o isolado **MF1** (10^5 esporos/mL) conforme descrito no capítulo 2 (Itens **2.2.1** e **2.2.4**). Tendo em vista as condições homogêneas proporcionadas pela câmara de crescimento, as plantas foram aleatoriamente dispostas (Figura 6.1).

Figura 6.1- Instalação do experimento para as análises de *RNA-Seq*. As plantas foram dispostas aleatoriamente em câmara de crescimento Conviron E15. Os nomes em preto representam clones do genótipo Resistente 03 (R03) e os nomes em vermelho representam clones do genótipo Susceptível 04 (S04). Os números entre parênteses indicam a repetição biológica que cada planta representa

Com base na dinâmica do desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** seis intervalos de estudo foram estabelecidos; 1) Zero hora (tratamento controle); 2) 6 horas após a inoculação (h.a.i.) (formação do apressório); 3) 12 h.a.i. (penetração do patógeno); 4) 18 h.a.i. (estabelecimento da resposta de defesa); 5) 24 h.a.i. (formação do haustório no genótipo susceptível); 6) 72 h.a.i. (início da formação das hifas secundárias no genótipo susceptível).

Em cada intervalo, folhas provenientes dos dois primeiros pares de cada ramo foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas individualmente à -80°C (Figura 6.2 A). Dessa forma, o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com parcelas subdivididas no tempo e seis repetições biológicas.

6.2.2 Organização do material vegetal para a análise do transcrito

Para a condução dos experimentos de análise da expressão gênica, o material biológico foi organizado da seguinte maneira em cada intervalo de estudo:

1. Para cada genótipo (**Resistente 03** e **Susceptível 04**), 200 mg de material vegetal, proveniente de cada repetição, foram misturados, formando um *Bulk* (Figura 6.2 B). Cada *bulk* foi submetido à extração de RNA total, isolamento do mRNA, síntese do cDNA e sequenciamento em "Pataforma 454 Roche GS FLX - Titanium" e análise do perfil transcricional por meio de *RNA-Seq* (Figura 6.2 D e E).
2. O material biológico vegetal proveniente de cada repetição foi agrupado dois a dois. Assim, 1200 mg (600 mg de cada planta) foram misturados, para constituição das repetições biológicas (Figura 6.2 C). Cada

repetição foi submetida à extração do RNA Total, posterior isolamento do RNAm e PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR) para validação dos dados gerados pelo sequenciamento (Figura 6.2 G).

Figura 6.2 -Estratégia para análise da expressão gênica. **A-** Após a inoculação com o isolado MF1, o material vegetal coletado em cada uma das 6 repetições foi macerado e armazenado individualmente. **B-** Em cada intervalo de estudo, uma parte do material vegetal de cada repetição foi misturado, formando-se um *bulk* para cada genótipo. **C-** Em cada intervalo de estudo, os clones de cada genótipo foram agrupados 2 a 2, sendo o material vegetal misturado formando-se assim 3 repetições biológicas. **D-** Em cada intervalo os dois *bulks* foram submetidos a sequenciamento em plataforma "Pataforma 454 Roche GS FLX - Titanium". **E-** Os *reads* gerados pelo processo de sequenciamento foram utilizados para as análises de RNA-Seq. **F-** Os genes com maior aumento e diminuição de expressão foram escolhidos como genes candidatos. **G-** Com base no nível de expressão e anotação funcional de cada gene, 15 genes foram escolhidos para validação dos resultados por meio de PCR em tempo real

6.2.3 Extração do RNA Total

A extração do RNA total foi realizada segundo Zeng e Yang (2002) com algumas modificações. Adicionou-se 12 mL de tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl pH=8; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 0.05% v/v espermidina; 2% v/v 2-mercaptoetanol) a 65°C a 1,2 g de material vegetal previamente macerado. O material foi homogeneizado (vortex) e incubado a 65°C por 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 7,2 mL de CIA (Álcool isoamílico: Clorofórmio 1:24), o material foi homogeneizado (vortex) e centrifugado (10.000g por 10 minutos). Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se outros 7,2 mL de CIA e o material foi novamente homogeneizado e centrifugado (10.000g por 10 minutos). Essa etapa foi repetida mais duas vezes. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual adicionou-se 0,25 volumes de LiCl (10M) seguido de homegeinização e incubação a 4°C por 16 horas para precipitação do RNA total. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (16.000g a 4°C por 30 minutos), o *pellet* resultante lavado três vezes com etanol 75%, seco por 10 minutos a temperatura ambiente e ressuspendido em 120 µL água Milli-Q tratada com 1% de DEPC.

6.2.4 Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído

As amostras de RNA foram avaliadas quanto à pureza e quantificadas com auxílio da espectrofotometria em dois comprimentos de onda, 260nm e 280nm. A razão entre as absorbâncias (A_{260nm}/A_{280nm}) é utilizada como uma medida de qualidade das amostras. Valores entre 1,6 a 2.0 indicam boa qualidade de RNA extraído. Já a absorbância a 260 nm (A_{260nm}) é utilizada para a quantificação do RNA total extraído segundo a fórmula apresentada na figura 6.3.

$$[RNA] = \frac{A_{260nm} \times F_c \times F_d}{1000}$$

Figura 6.3- Fator de conversão (F_c) que indica a equivalência de uma unidade de absorbância no comprimento de onda de 260 nm correspondente a 40 µg RNA.mL⁻¹. F_d é o fator de diluição da amostra. O valor final é dividido por 1000 para expressar a unidade de concentração de RNA em µg µL⁻¹. Fonte: Sambrook et al. (1989)

6.2.5 Sequenciamento do mRNA (RNA-Seq)

O sequenciamento do RNA foi realizado junto à empresa MACROGEN (<http://www.macrogen.com>), em "Plataforma 454 Roche GS FLX - Titanium" utilizando-se de

7/8 da placa. A parte referente ao 1/8 restante foi utilizada para o sequenciamento de uma amostra não relacionada a esse trabalho. Trezentos microgramas de RNA total de cada tratamento foram enviados para a empresa sendo 12 bibliotecas de cDNA (uma biblioteca para cada genótipo em cada intervalo de estudo) construídas e sequenciadas.

6.2.6 Construção das Bibliotecas de cDNA

Para a construção das bibliotecas de cDNA o mRNA é isolado e fragmentado em solução de ZnCl_2 . As duas fitas do cDNA são então sintetizadas e finalmente ligadas à adaptadores.

6.2.7 Amplificação e sequenciamento

Os fragmentos de cDNA ligados aos adaptadores são imobilizados em micropartículas (*beads*) sob condições que favorecem a ligação de um único fragmento por *bead*. Os *beads* são então emulsificados com os reagentes de PCR em microreatores, onde ocorre a reação de amplificação. Após a amplificação os *beads* são depositados nos poços de uma placa *PicoTiter* (os quais o diâmetro permite a inserção de um único *bead*) e a placa é então inserida no sequenciador. As bases (ATCG) são sequencialmente depositadas na placa sempre na mesma ordem e o nucleotídeo complementar à fita molde gera um sinal de luz que é registrado por uma câmera CCD, e a intensidade do sinal é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados. O processamento dos dados foi realizado com o auxílio do programa *Roche GS FLX software* (v 2.5.3) e os dados gerados disponibilizados nos formatos "*FASTA*", "*QUAL*" e "*SFF*". Os manuais que descrevem os procedimentos realizados em cada etapa estão disponíveis no website da ROCHE (<http://my454.com/>).

6.2.8 Análise de RNA-Seq

6.2.8.1 Construção da Referência

Para a construção da referência, realizaram-se os procedimentos a seguir:

1. Download das seguintes sequências:
 - a. 54.935 sequências codificantes (*coding sequences* - CDS) disponibilizadas pela rede EUCAGEN (disponíveis em <http://www.phytozome.net/>), nomeadas como "Referência 1".
 - b. 77.617 *ESTs* provenientes de *Eucalyptus spp* disponíveis no NCBI;

- c. 18.894 *ESTs* geradas e disponíveis conforme descrito por Mizrachi et al. (2010);
 - d. 47.538 *ESTs* provenientes de *Puccinia spp*, disponíveis no NCBI.
2. Mapeamento das 77.617 *ESTs* (NCBI) e das 18.894 *ESTs* (Mizrachi et al., 2010) contra a "Referência 1" (Figura 6.4 A).
 3. *De novo assembly* das sequências não mapeadas e adição dos novos *contigs* e *singletons* à Referência 1, formando assim a "Referência 2" (Figura 6.4 B).
 4. Mapeamento dos *reads* contra a "Referência 2" (Figura 6.4 C).
 5. Mapeamento dos *reads* que não tiveram homologia na "Referência 2" contra as 47.538 *ESTs* provenientes de *Puccinia spp* e eliminação das sequências mapeadas (Figura 6.4 D).
 6. *De novo assembly* dos *reads* remanescentes (Figura 6.4 E) e adição dos novos *contigs* formados à "Referência 2" formando assim a "Referência 3" (Figura 6.4 F);
 7. Mapeamento dos *reads* contra a "Referência 3" e identificação de sequências que não tiveram os *reads* alinhados (Figura 6.4 G);
 8. Remoção das sequências que não tiveram os *reads* alinhados e formação da "Referência Final", chamada apenas de Referência (Figura 6.4 H).

As etapas descritas no ítem 6.2.8 foram realizadas com o auxílio do programa "*CLC Genomics Workbench*". As etapas de mapeamento foram realizadas por meio da função *Mapping Reads* e as etapas de *De novo assembly* foram realizadas por meio da função *De novo assembly*. Em todas as etapas foram utilizados os parâmetros padrões do programa.

Figura 6.4 - Construção da Referência. **A-** Mapeamentos das sequências (barras verdes) provenientes do NCBI e do banco de dados descrito em Mizrahi et al., (2010) contra a "Referência 1". **B-** As sequências não mapeadas (barras verdes pequenas) foram submetidas ao processo de *De novo assembly* e os novos *contigs* e *singletons* (barra grande verde) foram adicionados à "Referência 1", formando a "Referência 2". **C-** Mapeamento dos *reads* provenientes do sequenciamento (barras vermelhas) contra a "Referência 2". **D-** Os *reads* que não tiveram homologia com a "Referência 2" (barras vermelhas) foram mapeados contra os *ESTs* de *Puccinia spp.*, disponíveis no NCBI (barra amarela) para eliminação de sequências provenientes do patógeno. **E-** Os *reads* que não tiveram homologia com a "Referência 2" e com as sequências provenientes de *Puccinia spp.* (barras vermelhas pequenas) foram submetidas ao processo de *De novo assembly*, formando novos *contigs* (barra vermelha grande) para a identificação de possíveis genes ainda não descritos em eucalipto. **F-** Os novos *contigs* formados (barra vermelha) foram adicionados à "Referência 2", formando assim a "Referência 3". **G-** Os *reads* provenientes do sequenciamento foram mapeados contra a "Referência 3", para identificação de sequências sem homologia com os *reads* (Regiões indicadas em cinza). **H-** Remoção das sequências sem homologia com os *reads* (regiões em cinza), para a formação da "Referência Final", chamada apenas de Referência

6.2.8.2 Anotação funcional das sequências que compõem a Referência

As sequências que compõem a Referência foram anotadas e categorizadas com o auxílio do programa *Blast2GO* (CONESA et al., 2005) versão "PRO" seguindo as configurações padrões do programa:

6.2.8.3 Identificação dos genes diferencialmente expressos

O programa *CLC Genomics Workbench* foi utilizado para mensurar o número de *reads* unicamente mapeados (*unique gene reads*) as sequências da Referência em cada uma das 12 bibliotecas e construção de uma matriz com os dados gerados. A matriz foi importada para o Pacote *DEGSeq* do Programa R (WANG et al., 2010) o qual foi utilizado para comparar cada tratamento a seu respectivo controle (Figura 6.5 A) e os tratamentos envolvendo os dois genótipos estudados em cada intervalo de estudo (Figura 6.5 B). Em ambas as análises foram utilizados os seguintes parâmetros: Método MARS ("*MA-plot-based method with random sampling model*") e $P\text{-valor} \leq 0,05$ ajustado para o teste de correlações múltiplas segundo Storey e Tibshirani (2003).

6.2.8.4 Seleção dos genes candidatos

Após a identificação dos genes diferencialmente expressos em relação a seus respectivos controles identificaram-se os genes com aumento e diminuição de expressão comuns e exclusivos a cada genótipo.

Figura 6.5 - Seleção dos genes candidatos. **A**- Comparação da expressão gênica de cada tratamento em relação a seu respectivo controle (linhas vermelhas) com o auxílio do Pacote DEGSeq para o Programa R. **B**-Após a identificação dos genes diferencialmente expressos realizou-se a comparação entre os genótipos Resistente 03 e Susceptível 04 dentro de cada intervalo (setas vermelhas)

Para avaliar a distribuição dos valores de expressão dos genes diferencialmente expressos exclusivos a cada tratamento foram construídos histogramas com o auxílio do *Programa R*. Dentro de cada tratamento 5% por cento dos genes com maior aumento e 5% dos genes com maior diminuição de expressão em relação ao tratamento controle foram selecionados como genes candidatos. Com base no nível de expressão e anotação funcional, 14 genes foram então selecionados para validação por meio de PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*).

6.2.8.5 Avaliação da distribuição das categorias funcionais

A distribuição dos *GO-terms* dos genes diferencialmente expressos de cada genótipo em relação aos tratamentos controles foi avaliada com o auxílio do programa *BLAST2GO* por meio do *Teste Exato de Fisher* ($FDR \leq 0,01$), onde foram considerados os termos mais específicos.

6.2.9 Validação dos resultados por *qPCR*

6.2.9.1 Desenho dos *primers*

Os *primers* para os genes selecionados foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* (v.0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Para assegurar a especificidade de cada par de *primers* as sequências foram alinhadas (*BLASTX*) contra os bancos de dados do NCBI, *Phytozome* e contra as sequências descritas por Mizrachi et al. (2010). As sequências selecionadas foram as que somente apresentaram homologia com o gene de interesse (Tabela 6.1).

6.2.9.2 Seleção dos genes de referência

Com base em resultados prévios obtidos no *Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas*, 4 genes de referência foram selecionados como candidatos para a normalização da expressão gênica. Os genes selecionados foram os que mostraram menores variações de expressão em folhas contaminadas com *P. psidii* em condições naturais de infecção (MOON et al., 2007). Os genes escolhidos foram: *Actina 2*, *Succinil CoA sintetase/ligase*, *NAPD-isocitrato desidrogenase* e *Piruvato quinase* (Tabela 6.1).

Para a seleção do melhor par a ser utilizado como normalizador foram utilizados dois aplicativos, o Norm-Finder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTTOFT, 2004) e o Genorm (VANDESOMPELE et al., 2002). Ambas as análises indicaram os genes *Actina 2* e *NAPD-isocitrato desidrogenase* como os mais estáveis (Tabela 6.1).

Tabela 6.1-Genes selecionados para validação e sequência dos primers (continua)

Gene	Identificação	Sequência
<i>Proteína Induzida por Injúria</i>	Eucgr.K00912.1	F: CCACCAGGGGAAGAGGAG R: GCCCCAGCAGTTCAGGTA
<i>F-box1</i>	Eucgr.L01506.1	F: GCTGTTTGTTTGCTGTGGAC R: CCTTGGCTACCTTGCTCTTC
<i>F-box2</i>	gi:255553315	F: AGAAGCAATCCCCCATCAGC R: GCCTCGTAATCATCCGACCT
<i>F-Box3</i>	Eucgr.D00718.1	F: TGTAGGACTTGAGGCTGTTGC R: GGGTAAAACCAGGGCAGTTC
<i>GRAS</i>	Eucgr.G02939.1	F: GGTCTTGAGGCACGATTAGC R: TGGGAAACCATAGAGGATGC
<i>R2R3-MYB</i>	Eucgr.C00826.1	F: GTCCAGAGCAATACCCCAAC R: GAGCATCGGGCTTACTTGAT
<i>Receptor LRR- Quinase</i>	Eucgr.I00656.1	F: GGTTCATCCACATAGTTTTG R: GCCTCGTTTCCACACAGC
<i>Inibidor de PME</i>	gi:225466053	F: GTGTGCGTCCAGTCCCTCT R: GTCCCCCATCTCCTCCAG
<i>WRKY</i>	Eucgr.B03381.1	F: AGCAACCACCTCCACAAAAG R: GGCGACCTCCTGATAGACCT
<i>TIR-NBS-LRR</i>	Eucgr.E02513.1	F: CCCTGTGAGTTTGAAGGAGTT R: AAGAGTCCGAAGACAAGAAAGA
<i>MORN</i>	Eucgr.J00424.1	F: TTTTGGTTCTGTCGCTGTTG R: CGGAGTTGCCTTTACTGAGG
<i>MYB</i>	Eucgr.B03606.1	F: GAACTCCAGCAGCAATCCTC R: GCGGTCCCATTTTGATACAC

<i>AIG1</i>	Eucgr.F02982.1	F: GGAGGACTATTTGGGTCGTG R: GCCCCTTCTTCATTTCAAC
<i>F-Box3</i>	Eucgr.D00718.1	F: TGTAGGACTTGAGGCTGTTGC R: GGGTAAAACCAAGGCAGTTC
<i>MLP</i>	Eucgr.G02167.2	F: GCGACAATGCTACCTCTTCC R: ACCACCGACAGGCTCTTG
<i>Actina 2</i>	Egrandis 0.047270m	F: ATCACAATTGGGGCTGAGAG R: GGAGGTGCAACCACTTTGAT
<i>NAPD-isocitrato desidrogenase</i>	Egrandis 0.014061m	F: CTGTTGAGTCTGGCAAGATGAC R: CATTTAATTCCTCCCAACAAA

Eucgr: Identificação dos genes no banco de dados do sequenciamento de *Eucalyptus grandis* (<http://www.phytozome.net/>). *gi*: identificação do gene no NCBI. Os genes com identificação do NCBI são provenientes do processo de *De novo assembly* descrito na Figura 6.3.

6.2.9.3 Isolamento do RNA mensageiro e síntese de cDNA

Para cada repetição biológica designada para a validação dos dados (Figura 6.2 C), o RNA total foi extraído e quantificado conforme previamente descrito (itens **6.2.3** e **6.2.4**).

A purificação do mRNA foi realizada a partir de 50 µg de RNA total, com auxílio do *kit Dynabeads® mRNA purification* (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante.

O cDNA de cada gene foi sintetizado com o auxílio do *kit SuperScript™ One-Step RT-PCR Platinum® Taq* (Invitrogen), com a utilização de *Primers* específicos. Cada reação foi preparada à partir de 6,25 µL de Tampão 2X concentrado (0,4 mM de cada dNTP e 2,4 mM de MgSO₂), 1,25 µL de cada *Primer* (5µM), 0,25 µL de RT/Platinum®Taq e 3,5 µL de RNAm, totalizando 12,5 µL de volume final. Os tubos com as misturas de reação foram colocados em termociclador e submetidos as seguintes etapas: 1 ciclo de 50°C por 30 minutos e 94°C por 2 minutos para síntese de cDNA e pré-desnaturação da enzima transcriptase reversa e 10 ciclos de 94°C durante 45 segundos, à 55, 56, 60 ou 62°C, dependendo do primer, durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos e 30 segundos para amplificação dos fragmentos.

6.2.9.4 PCR quantitativo em Tempo Real (*qPCR*)

As reações de *qPCR* foram realizadas no equipamento *iQ5* (BioRad) e a mistura de cada reação foi composta de 400 nM de cada *Primer* 12,5 µL de *SYBR Green* (*SYBR Green real-time RT-PCR SuperMix-UDG*) e 2 µL de cDNA diluído (2:1), compondo um volume final de 20 µL. As reações de amplificação foram realizadas segundo a seguinte programação: 1 ciclo a 95°C por 15 minutos para desnaturação do cDNA; 40 ciclos de amplificação de 20 segundos a 95°C; 30 segundos a 55, 56, 60 ou 62°C (dependendo dos primers) para o anelamento dos *Primers* por 30 segundos e 72°C por 30 segundos para amplificação dos fragmentos, com leitura da fluorescência a 72°C; 1 ciclo de 95°C por 30 segundos, 1 ciclo de 55°C por 30 segundos e 1 ciclo para construção de curvas de dissociação dos primers com a temperatura se elevando de 55°C até 95°C, e a cada minuto leituras da fluorescência.

O aplicativo *LingRegPCR* (RAMARKERS et al., 2003) foi utilizado para o cálculo da eficiência de cada reação e extração dos dados de *Cq*.

Os valores da expressão relativa foram calculados com o auxílio do *software REST* (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). O *software REST* compara os valores médios de *Cq* dos tratamentos e posteriormente calcula a expressão relativa aos genes de referência segundo a seguinte equação:

$$ER = \frac{(E_{\text{Alvo}})^{\Delta Cq}}{(E_{\text{Referência}})^{\Delta Cq}}$$

Onde: **ER**= Expressão Relativa; **E**= Eficiência média do gene; $\Delta Cq = Cq_{\text{Susceptível}} - Cq_{\text{Resistente}}$

O *P-valoré* calculado a partir do teste estatístico "*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*" com 2000 randomizações.

Para verificar a correlação existente entre as duas plataformas de análise, os valores de expressão detectados pelas técnicas de *RNA-Seq* e *qPCR*, que apresentaram diferenças estatísticas significativas em ambas as técnicas de acordo com o teste utilizado para cada análise, foram comparados por meio do *Coefficiente de Correlação de Pearson (R)*

6.3 Resultados

6.3.1 Avaliação dos sintomas

Após a inoculação com o patógeno o desenvolvimento dos sintomas foi avaliado diariamente. Todas as plantas apresentaram o comportamento esperado (Figura 6.6 e 6.7) com o desenvolvimento dos sintomas ocorrendo conforme previamente observado e detalhado no capítulo 3 (item 3.3.1).

Figura 6.6- Folhas coletadas de cada um dos clones dos genótipos Resistente 03 (R03) e Susceptível 04 (S04) antes da inoculação com o isolado MF1. Os números que se encontram entre parênteses à frente da identificação de cada folha referem-se à repetição biológica que as folhas foram provenientes. Barras brancas representam 2 cm

Figura 6.7 - Folhas coletadas de cada um dos clones dos genótipos Resistente 03 (R03) e Susceptível 04 (S04) aos 15 d.a.i. com o isolado MF1. Os números que se encontram entre parênteses à frente da identificação de cada folha referem-se à repetição biológica que as folhas foram provenientes. Barras brancas representam 2 cm

6.3.2 Sequenciamento do mRNA (*RNA-Seq*)

O sequenciamento do mRNA gerou um total de 685.236 *reads* (250.968.328 bases) (Tabela 6.2), com um tamanho médio de 365,41 bases (Figura 6.8 e 6.9). O número de *reads* gerados no sequenciamento do genótipo **Resistente 03** (391.115 *reads*) foi superior ao gerado no sequenciamento do genótipo **Susceptível 04** (294.121 *reads*). Entretanto, o tamanho médio

dos fragmentos sequenciados foi praticamente o mesmo (369,42 bases no genótipo **Resistente 03** e 361,40 bases no genótipo **Susceptível 04**).

Tabela 6.2- Número e tamanho dos reads sequenciados em cada biblioteca

Biblioteca	Número de <i>Reads</i>	Número de bases sequenciadas	Tamanho médio dos <i>Reads</i>
R03 - 0 h.a.i.	59.050	22.110.301	374,43
R03 - 6 h.a.i.	69.823	26.395.313	378,03
R03 - 12 h.a.i.	71.868	27.566.742	383,57
R03 - 18 h.a.i.	74.927	27.413.041	365,86
R03 - 24 h.a.i.	67.037	24.396.779	363,93
R03 - 72 h.a.i.	48.410	16.979.059	350,74
S04 - 0 h.a.i.	36.846	13.569.581	368,28
S04 - 6 h.a.i.	48.063	17.454.012	363,15
S04 - 12 h.a.i.	52.510	19.955.944	380,04
S04 - 18 h.a.i.	49.073	17.542.898	357,49
S04 - 24 h.a.i.	50.241	17.976.301	357,8
S04 - 72 h.a.i.	57.388	19.608.357	341,68
Total	685.236	250.968.328	365,41

Figura 6.8 - Distribuição do comprimento dos reads sequenciados em cada biblioteca proveniente do genótipo Resistente 03. **A**-Tratamento controle (0 h.a.i.). **B**- 6 h.a.i. **C**- 12 h.a.i. **D**- 18 h.a.i. **E**-24 h.a.i. **F**- 72 h.a.i

Figura 6.9- Distribuição do comprimento dos reads sequenciados em cada biblioteca proveniente do genótipo Susceptível 04. **A**-Tratamento controle (0 h.a.i.). **B**- 6 h.a.i. **C**- 12 h.a.i. **D**- 18 h.a.i. **E**-24 h.a.i. **F**- 72 h.a.i

6.3.3 Construção da referência

O processo de remoção de sequências de baixa qualidade realizado pelo programa *CLC Genomics Workbench* removeu apenas 94 sequências restando 685.142 *reads* para as análises. Inicialmente esses *reads* foram mapeados diretamente contra a Referência 1 (54.935 sequências) (descrito no item 6.2.8.1), resultando em apenas 44,14% de homologia. As sequências provenientes do NCBI e descritas em Mizrachi et al. (2010), as quais juntas

somam 96.511, foram então mapeadas contra a Referência 1 (Figura 6.4 A). Como resultado 60.523 sequências foram mapeadas e 35.988 permaneceram sem alinhamento. O processo de *De novo assembly* com as 35.988 sequências resultou na formação de 4.600 novos *contigs* (tamanho médio de 668 bases) e 14.611 *singletons* (tamanho médio 525,82 bases), os quais foram adicionados à Referência 1, para a formação da "Referência 2" (74.146 sequências) (Figura 6.4 B). Esse procedimento aumentou a taxa de mapeamento para 87,15%. Os 12,85% dos *reads* remanescentes somavam 88.015 sequências. O mapeamento dessas sequências contra as sequências de *Puccinia spp* (47.538 *ESTs*) disponíveis no NCBI (Figura 6.4 D) resultou no alinhamento de 30.324 *reads* a 268 sequências de *Puccinia spp*. Essas sequências foram então removidas e as 57.691 sequências restantes foram então submetidas ao processo de *De novo Assembly* (Figura 6.4 E), resultando na formação de 5.993 novos *contigs* (tamanho médio de 465 bases) e 15.815 *reads* (tamanho médio de 250 bases) permaneceram sem alinhamento. As sequências sem alinhamento foram descartadas e os novos *contigs* formados foram adicionados à "Referência 2" para a formação da "Referência 3" (Figura 6.4 F), composta de 80.139 sequências.

Os *reads* foram então mapeados contra a nova referência e como resultado 663.715 *reads* se alinharam a 36.606 sequências (Figura 6.4 G), o que representou uma taxa de alinhamento de 96,87%. As sequências da "Referência 3" que não tiveram alinhamento de nenhum *read* (47.538 sequências) foram então removidas para a formação da "Referência Final", chamada apenas de Referência (Figura 6.4 H).

6.3.4 Identificação dos genes diferencialmente expressos e seleção dos genes candidatos

Em cada tratamento, os *reads* gerados pelo sequenciamento na *Plataforma 454 FLX da Roche* foram mapeados contra a Referência com o auxílio do programa *CLC Workbench*. Dos 685.152 *reads* provenientes das 12 bibliotecas sequenciadas, 480.586 (70,14%) foram mapeados, permanecendo 204.566 (29,85%) sem alinhamento. Considerando apenas os *reads* mapeados, 78,88% (379.122 *reads*) alinharam-se a sequências únicas. Os 101.464 *reads* restantes (21,12%) mostraram-se inespecíficos, alinhando-se a duas ou mais sequências da Referência (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Número de reads mapeados em cada biblioteca, durante a análise de *RNA-Seq*.

Biblioteca	<i>Reads</i> mapeados	<i>Reads</i> unicamente mapeados	<i>Reads</i> não específicos	<i>Reads</i> não mapeados	Total
Resistente 0.h.a.i.	41.215	32.718	8.497	17.828	59.043
Resistente 6 h.a.i.	47.833	37.572	10.261	21.978	69.811
Resistente 12 h.a.i.	49.838	40.023	9.815	22.021	71.859
Resistente 18 h.a.i.	52.860	41.684	11.176	22.060	74.920
Resistente 24 h.a.i.	47.162	37.538	9.624	19.875	67.037
Resistente 72 h.a.i.	34.260	27.540	6.720	14.147	48.407
Susceptível 0 h.a.i.	25.940	20.493	5.447	10.895	36.835
Susceptível 6.h.a.i.	33.585	25.712	7.873	14.470	48.055
Susceptível 12 h.a.i.	35.955	28.675	7.280	16.550	52.505
Susceptível 18 h.a.i.	34.731	26.869	7.862	14.332	49.063
Susceptível 24 h.a.i.	35.331	27.653	7.678	14.908	50.239
Susceptível 72 h.a.i.	41.876	32.645	9.231	15.502	57.378
Total	480.586	379.122	101.464	204.566	685.152

Os *reads* unicamente mapeados foram importados para pacote *DEG-Seq* do programa "R" para identificação dos genes diferencialmente expressos em cada tratamento em relação aos respectivos controles e os genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos em cada intervalo. O número médio de genes em cada tratamento que tiveram *reads* alinhados foi de 7.709. Considerando apenas os *reads* unicamente mapeados, o número médio de genes por tratamento foi de 5435 (Tabela 6.4). O número de genes diferencialmente expressos identificados em cada tratamento em relação ao tratamento controle variou de 717 a 1553, com uma média de 1.234 genes por tratamento (Tabela 6.4). Em cada tratamento os genes diferencialmente expressos em relação ao tratamento controle com aumento e diminuição de expressão foram separados. O número de genes com aumento de expressão variou de 229 a 899 (média de 597,81) e com redução de expressão variou de 488 a 752 (média de 636,81). A Figura 6.10 mostra a o número de genes diferencialmente expressos com aumento ou diminuição de expressão, exclusivos e comuns entre os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**.

Tabela 6.4 - Total de genes diferencialmente expressos em cada tratamento em relação aos respectivos controles. Os tratamentos controles (0 h.a.i.) foram comparados entre si assumindo o genótipo Susceptível como controle.

Tratamento	<i>Número de Genes com sequências mapeadas</i>	<i>Número de Genes com sequências unicamente mapeadas</i>	Genes com aumento de expressão	<i>Genes com redução de expressão</i>	<i>Total de Genes diferencialmente expressos</i>
Resistente 0.h.a.i.	6.233	4.342	836	636	1.472
Resistente 6 h.a.i.	8.610	6.066	640	752	1.392
Resistente 12 h.a.i.	10.173	7.272	328	707	1.035
Resistente 18 h.a.i.	9.478	6.674	591	747	1.338
Resistente 24 h.a.i.	8.971	6.371	442	670	1.112
Resistente 72 h.a.i.	4.978	3.510	561	667	1.228
Susceptível 0 h.a.i.	4.619	3.239	-----	-----	-----
Susceptível 6.h.a.i.	7.974	5.536	736	554	1.290
Susceptível 12 h.a.i.	8.266	5.928	229	488	717
Susceptível 18 h.a.i.	7.865	5.512	634	545	1.179
Susceptível 24 h.a.i.	8.330	5.917	680	585	1.265
Susceptível 72 h.a.i.	7.005	4.856	899	654	1.553
Média	7.709	5.435	597,81	636,81	1.234

Figura 6.10 -Diagramas de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos comuns e exclusivos dos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** em relação aos tratamentos controles. **A**- Proporção de genes diferencialmente expressos nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** em todos os intervalos. **B**- Genes diferencialmente expressos no genótipo **Resistente 03** em relação ao **Susceptível 04** no intervalo 0 h.a.i.. **C, D, E e F** - Genes diferencialmente expressos com aumento e redução de expressão nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** nos intervalos 6, 12, 18, 24, 72 h.a.i. respectivamente. Círculos amarelos e verdes representam genes com redução de expressão (*Down*) nos genótipos **Susceptível 04** e **Resistente 03** respectivamente. Círculos vermelhos e roxos genes com aumento de expressão (*UP*) nos genótipos **Susceptível 04** e **Resistente 03** respectivamente. Os diagramas foram construídos com o auxílio do programa *Venn Master* (KESTLER et al., 2008)

Para avaliar a distribuição dos valores de expressão dos genes diferencialmente expressos foram construídos histogramas (Figuras 6.11 e 6.12) e 10% dos genes com maior diferença de expressão (5% com maior aumento e 5% com maior diminuição) em relação ao tratamento controle foram então selecionados como genes candidatos para o estudo da interação molecular entre *E. grandis* e *P. psidii*. Considerando os doze tratamentos, 391 genes (188 genes provenientes das bibliotecas do genótipo **Resistente 03** e 203 provenientes das bibliotecas do genótipo **Susceptível 04**) encontraram-se nesse critério. Com base no nível de expressão e anotação funcional, 14 genes foram selecionados para validação dos resultados por meio de *qPCR*.

Figura 6.11-Distribuição dos genes diferencialmente expressos no genótipo **Resistente 03**. As letras indicam os seguintes intervalos: **A e B**, 0 h.a.i. **C e D**, 6 h.a.i. **E e F**, 12 h.a.i. **G e H**, 18 h.a.i. **I e J**, 24 h.a.i. **L e M**, 72 h.a.i. Histogramas em roxo representam genes com aumento de expressão (UP). Histogramas em verde representam genes com redução de expressão (Down). Valores de expressão normalizados (Log2)

Figura 6.12-Distribuição dos genes diferencialmente expressos no genótipo **Susceptível 04**. As letras indicam os seguintes intervalos: **A e B**, 6 h.a.i. **C e D**, 12 h.a.i. **E e F**, 18 h.a.i. **G e H**, 24 h.a.i. **I e J**, 72 h.a.i. Histogramas em vermelho representam genes com aumento de expressão (UP). Histogramas em amarelo representam genes com redução de expressão (Down). Valores de expressão normalizados (Log2).

6.3.5 Avaliação da distribuição dos *GO-Terms*

Para facilitar a análise global do perfil de expressão gênica e avaliar as categorias funcionais dos genes induzidos pela presença do patógeno nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**, a distribuição dos *GO-terms* mais específicos dos genes diferencialmente expressos de cada genótipo foi comparada com as categorias funcionais dos genes que compõem a referência por meio do *Teste Exato de Fisher* com o auxílio do programa *BLAST2GO*.

Tal análise revelou 22 *GO-terms* identificados no genótipo **Resistente 03**, dos quais 6 relacionados à Componente Celular, 8 à Função Molecular e 8 à processo Biológico (Tabela

6.6 e Figura 6.12 B). No genótipo **Susceptível 04**, 14 *GO-terms* foram identificados, dos quais 4 referentes à Componente Celular, 5 à Função Molecular e 5 à Processo Biológico (Tabela 6.6 e Figura 6.12 A). Dos 22 *GO-terms* identificados no genótipo **Resistente 03**, 16 apresentaram aumento da frequência em relação à referência e 6 diminuição. No genótipo **Susceptível 04** todos os *GO-terms* apresentaram aumento de frequência.

Tabela 6.5- Comparação das categorias funcionais dos genes diferencialmente expressos no genótipo Susceptível 04 em relação à referência

GO-ID	GO-term	Categoria	P-Value	Sequências testadas	Sequências na referência	Resultado
GO:0005840	Ribosome	C	3.16E-12	118	556	over
GO:0003735	structural constituent of ribosome	F	1.17E-11	111	519	over
GO:0016168	chlorophyll binding	F	5.53E-10	18	19	over
GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	P	1.69E-09	22	35	over
GO:0009535	chloroplast thylakoid membrane	C	7.77E-09	47	164	over
GO:0009523	photosystem II	C	3.50E-08	28	71	over
GO:0018298	protein-chromophore linkage	P	6.14E-07	14	20	over
GO:0022900	electron transport chain	P	1.14E-06	35	126	over
GO:0009853	photorespiration	P	7.30E-06	11	15	over
GO:0016984	ribulose-bisphosphate carboxylase activity	F	2.78E-05	9	11	over
GO:0009522	photosystem I	C	3.24E-05	16	41	over
GO:0016210	naringenin-chalcone synthase activity	F	3.44E-05	5	1	over
GO:0003746	translation elongation factor activity	F	6.53E-05	19	60	over
GO:0006414	translational elongation	P	6.56E-05	22	77	over

Identificação dos *GO-terms* no banco de dados do "*Gene Ontology*". **P**=Processo biológico, **C**=Componente Celular, **F**=Função Molecular. Sequências testadas: Número de sequências que apresentaram diferenças de expressão que se encaixavam em cada categoria. Sequências na referências Número total de sequências da Referência que se encaixavam dentro de cada categoria. Resultado: *Over* indica que o total de genes diferencialmente expressos dentro da categoria foi maior. *Under* indica que o total de genes dentro da categoria foi menor.

Tabela 6.6- Comparação das categorias funcionais dos genes diferencialmente expressos no genótipo Resistente 03 em relação à Referência

GO-ID	GO-term	Categoria	P-Value	Sequências testadas	Sequências na referência	Resultado
GO:0005840	ribosome	C	8.18E-19	140	534	over
GO:0003735	structural constituent of ribosome	F	1.30E-18	133	497	over
GO:0009522	photosystem I	C	1.44E-11	25	32	over
GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	P	1.44E-11	25	32	over
GO:0016168	chlorophyll binding	F	1.35E-10	19	18	over
GO:0004713	protein tyrosine kinase activity	F	1.12E-09	57	1116	under
GO:0006468	protein amino acid phosphorylation	P	2.45E-09	82	1418	under
GO:0004674	protein serine/threonine kinase activity	F	3.14E-09	75	1326	under
GO:0018298	protein-chromophore linkage	P	1.98E-08	16	18	over
GO:0009535	chloroplast thylakoid membrane	C	9.88E-08	46	165	over
GO:0009523	photosystem II	C	1.07E-07	28	71	over
GO:0055114	oxidation reduction	P	3.59E-06	303	2166	over
GO:0004802	transketolase activity	F	8.06E-06	5	0	over
GO:0006414	translational elongation	P	1.58E-05	24	75	over
GO:0009207	purine ribonucleoside triphosphate catabolic process	P	3.78E-05	67	355	over
GO:0003746	translation elongation factor activity	F	4.05E-05	20	59	over
GO:0043531	ADP binding	F	6.12E-05	14	344	under
GO:0031967	organelle envelope	C	7.00E-05	87	507	over
GO:0009840	chloroplastic endopeptidase Clp complex	C	8.42E-05	4	0	over
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	P	1.1E-04	162	2041	under
GO:0016491	oxidoreductase activity	F	1.66E-04	307	2322	over
GO:0019219	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	P	1.70E-04	67	985	under

Figura 6.13.- Distribuição dos GO-Terms. **A** - Distribuição dos *GO-terms* dos genes diferencialmente expressos no genótipo Resistente 03. **B**- Distribuição dos *GO-terms* dos genes diferencialmente expressos do genótipo Susceptível 04. Os valores apresentados representam as porcentagens de cada GO-Term em relação à referência

6.3.6 Validação das análises de *RNA-Seq* por *qPCR*

O 14 genes selecionados para validação dos resultados foram submetidos à análise da expressão gênica por meio de *qPCR*. As análises de *qPCR* foram realizadas ao nível de três repetições técnicas e três repetições biológicas. Para verificar a correlação existente entre as duas plataformas de análise o *Coefficiente de Correlação de Pearson (R)* foi calculado. A presença de um único dado discrepante (Proteína Induzida por Injúria 18 h.a.i.) fez com que o coeficiente de correlação apresentasse um baixo valor ($R = 0,224$) (Figura 6.14A), o que indicaria uma baixa correlação entre as análises. Entretanto, a exclusão desse dado mostrou que as análises entre as duas plataformas apresentaram alta correlação ($R = 0,731$) (Figura 6.14B).

Figura 6.14- Correlação entre os genes diferencialmente expressos encontrados nas análises de *RNA-Seq* e *qPCR*. **A-** A presença de um único dado discrepante (ponto vermelho) faz com que a correlação entre os dados seja baixa. **B-** A remoção do dado discrepante mostra que os dados possuem alta correlação. A correlação entre os dados foi medida pelo *Coefficiente de Correlação de Pearson (R)*

6.3.7 Análise da expressão gênica

Para a validação dos resultados advindos das análises de *RNA-Seq*, melhor compreensão das diferenças entre os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** no processo de interação molecular de *E. grandis* com *P. psidii* e identificação de genes envolvidos no processo de resistência, 14 genes foram selecionados para análises de *qPCR*. Dentre eles encontram-se 3 isoformas de *F-Box*, as quais foram nomeadas como *F-Box 1*, *F-Box2* e *F-Box3*, para facilitar a discussão dos dados.

As análises mostraram que a presença do patógeno influenciou a regulação de todos os genes analisados. Apenas três genes apresentaram diferenças de expressão entre os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** antes da presença do patógeno (Figura 6.15 A e 6.16 A e C). De maneira geral, a maioria dos genes mostrou aumento de expressão no genótipo **Resistente 03** nos intervalos 6, 12, 18 e 24 h.a.i. e posterior diminuição de expressão

no intervalo 72 h.a.i. Os genes *AIG1*, *MLP* e *F-Box3* (Figura 6.16 A e C) apresentaram um perfil transcricional diferente dos demais genes, apresentando diminuição nos níveis de expressão no genótipo **Resistente 03** na maior parte dos intervalos analisados. O gene *TIR-NBS-LRR* mostrou-se ligeiramente mais expresso no genótipo **Susceptível 04** no início do processo de infecção, às 6 h.a.i. Às 12 h.a.i. esse gene mostrou rápido aumento de expressão no genótipo **Resistente 03** e às 18 e 24 h.a.i. não foram detectadas diferenças significativas em relação ao genótipo **Susceptível 04**. Entretanto, às 72 h.a.i. observa-se novamente esse gene mais expresso no genótipo resistente (Figura 6.15A).

O nível de expressão do gene que codifica o Receptor LRR-Quinase foi inicialmente superior no genótipo **Susceptível 04** sem a presença do patógeno. Nos intervalos 12 e 18 h.a.i, observou-se esse gene com expressão superior no genótipo **Resistente 03** e às 24 h.a.i. não foram encontradas diferenças significativas entre os dois genótipos. Finalmente às 72 h.a.i. esse gene apresentou-se novamente mais expresso no genótipo **Susceptível 04** (Figura 6.15A).

O gene que codifica o domínio MORN mostrou um aumento gradual de expressão entre os intervalos 6 e 18 h.a.i. no genótipo **Resistente 03**. Às 24 h.a.i. o nível de expressão diminuiu até o intervalo 72 h.a.i., quando, a exemplo do tratamento controle, não são encontradas diferenças significativas entre os dois genótipos (Figura 6.16B).

Todos os fatores de transcrição analisados apresentaram perfil semelhante de expressão. Nenhum dos genes apresentou diferença entre os genótipos antes da presença do patógeno e com excessão do gene que codifica o fator de transcrição GRAS (Figura 6.15 B), os demais mostraram-se mais expressos no genótipo **Resistente 03** a partir das 6 h.a.i. O gene do fator de transcrição WRKY manteve o mesmo nível de expressão até às 12 h.a.i., com diminuição gradual nos níveis de expressão entre os intervalos 18 e 24 h.a.i, quando não são mais detectadas diferenças entre os dois genótipos (Figura 6.15 B). O gene responsável pela transcrição da proteína GRAS, apesar de não apresentar diferenças de expressão entre os genótipos no início do processo de infecção (6 h.a.i.) mostrou um rápido aumento às 12 h.a.i. no genótipo **Resistente 03**, seguido de progressiva diminuição até o intervalo 24 h.a.i., quando não mais são encontradas diferenças de expressão entre os dois genótipos (Figura 6.15B). Os dois genes que codificam os fatores de transcrição MYB mostraram progeressivo aumento entre às 6 e 12 h.a.i. no genótipo **Resistente 03** (Figura 6.15 C). A expressão desses genes diminuiu gradualmente entre os intervalos 18 e 72 h.a.i. no genótipo **Resistente 03**.

Todos os genes responsáveis pela expressão de fatores de transcrição apresentaram-se mais exporecidos no genótipo **Susceptível 04** no intervalo 72 h.a.i (Figura 6.15 B e C).

Os perfis de expressões dos genes que codificam as proteínas F-Box foram consideravelmente diferentes entre si. Todos mostraram maior expressão no intervalo 18 h.a.i. no genótipo **Resistente 03** e maior expressão no genótipo **Susceptível 04** no intervalo 72 h.a.i. O gene *F-Box1* teve aumento de expressão às 6 h.a.i. e se manteve constante até às 24 h.a.i. (Figura 6.15 D) O gene *F-Box2* mostrou-se mais expresso no genótipo **Resistente 03** às 6 e às 18 h.a.i.. Não sendo detectadas diferenças significativas entre os genótipos nos intervalos 0, 6 e 24 h.a.i., entretanto às 72 h.a.i. esse gene mostra-se muito mais expresso no genótipo **Susceptível 04** (Figura 6.15 D) O gene *F-box3* apresentou maior nível de expressão no genótipo **Resistente 03** apenas às 18 h.a.i., sendo que nos intervalos 0, 6 e 72 h.a.i. o nível de expressão foi superior no genótipo **Susceptível 04** (Figura 6.16A).

A expressão do gene *PMEI* foi superior no genótipo **Resistente 03** apenas no intervalo 12 h.a.i. Em todos os demais intervalos não se observou diferença de expressão entre os genótipos (Figura 6.16 B).

O gene responsável pela transcrição da Proteína Induzida Por Injúria foi o que apresentou maiores diferenças entre os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**. Não foi detectada diferenças na expressão desse gene nos dois genótipos sem a presença do patógeno, entretanto, a partir das 6 h.a.i. o gene mostra-se mais expresso no genótipo **Resistente 03**, com aumento de mais de duas mil vezes no intervalo 12 h.a.i. A expressão desse gene diminui no intervalo 18 h.a.i. e mantém-se constante até às 24 h.a.i. No intervalo 72 h.a.i. não são mais detectadas diferenças de expressão entre os dois genótipos (Figura 6.16 A).

O gene *AGI1* mostrou-se mais expresso no genótipo **Susceptível 04** nos intervalos 12 e 24 h.a.i. Nos demais intervalos não foram detectadas diferenças significativas entre os dois genótipos (Figura 6.16 C).

O gene que codifica a proteína MLP apresentou-se mais expresso no genótipo **Susceptível 04** nos intervalos 0,6,12 e 72 h.a.i. No genótipo **Resistente 03** observou-se maior nível de expressão desse gene no intervalo 18 h.a.i. Não foram detectadas diferenças significativas entre os genótipos no intervalo 24 h.a.i (Figura 6.16 C).

Figura 6.15- Valores de expressão obtidos pelas técnicas de *RNA-Seq* (heatmaps à esquerda) e qPCR (gráficos de barras à direita). Os heatmaps foram construídos com o auxílio do *software Cluster and TreeView*. Os valores de expressão provenientes das análises de qPCR indicam a expressão de cada gene no genótipo Resistente 03 em relação ao genótipo Suscetível 04. **A:** *Receptor LRR quinase*, *TIR-NBS-LRR* **B:** *GRAS*, *WRKY*. **C:** *R2R3-MYB* e *MYB*. **D:** *F-Box1*. e *F-Box2*. Cores verde e vermelho representam aumento e redução de expressão respectivamente

Figura 6.16- Valores de expressão obtidos pelas técnicas de *RNA-Seq* (heatmaps à esquerda) e qPCR (gráficos de barras à direita). Os heatmaps foram construídos com o auxílio do *software Cluster and TreeView*. Os valores de expressão provenientes das análises de qPCR indicam a expressão de cada gene no genótipo Resistente 03 em relação ao genótipo Susceptível 04. **A:** *F-Box3* e proteína Induzida por Injúria. **B:** *MORN* e *PMEI*. **C:** *AIG1* e *MLP*. Cores verde e vermelho representam aumento e redução de expressão respectivamente

6.4 Discussão

A resistência de *Eucalyptus spp* à *P.psidi* vem sendo amplamente explorada para o desenvolvimento de genótipos superiores em programas de melhoramento genético. Apesar da primeira descrição da doença afetando o gênero ter sido realizada há mais de 70 anos (JOFFLY et al., 1940), o primeiro estudo molecular visando a identificação de genes de resistência somente foi publicado em 2003 (JUNGHANS et al., 2003) e apenas um estudo contrastando o perfil geral de expressão gênica entre genótipos resistentes e susceptíveis à ferrugem foi realizado (MOON, 2007). O estabelecimento do patossistema modelo (Capítulo 2), o estudo detalhado da dinâmica do desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos selecionados (Capítulos 3 e 5) e a liberação dos primeiros *Drafts* do genoma de *E. grandis*, cujas sequências são provenientes da planta Brasuz, progenitora dos genótipos selecionados, forneceram bases sólidas para a realização da análise da expressão gênica. Tais fatos somados à disponibilidade de técnicas de *High-Throughput Sequencing* fornecem uma oportunidade

sem precedentes para o entendimento da interação molecular planta-patógeno entre *E. grandis* e *P. psidii* e para a identificação de genes de resistência, os quais poderão ser utilizados para produção de plantas transgênicas de clones comerciais susceptíveis, bem como para o desenvolvimento de marcadores moleculares para a seleção assistida de plantas resistentes.

Dessa forma, com base no desenvolvimento do isolado **MF1** nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**, estabeleceu-se um desenho experimental no qual 6 pontos de estudo foram analisados pela técnica de *RNA-Seq*. A avaliação dos sintomas nos genótipos estudados mostrou que todas as repetições apresentaram os resultados esperados (Capítulo 3, ítem **3.3.1**) e dessa forma todas as plantas foram utilizadas para as análises subsequentes.

O sequenciamento de transcritos vem sendo há muito tempo reconhecido como um eficiente método para a descoberta de genes. Comparados com os métodos tradicionais, a técnica de *RNA-Seq* vem aumentando imensamente a taxa de sequenciamento, permitindo a quantificação global de genes expressos (HAAS; ZODY, 2010). As duas plataformas de *High-Throughput Sequencing* mais frequentemente utilizadas são a *ROCHE 454 FLX Titanium* e *Illumina Genome Analyser* (LUO et al., 2012). As duas plataformas apresentam grandes diferenças quando comparadas, principalmente com relação ao tamanho das sequências geradas. Enquanto a plataforma *ROCHE 454 FLX Titanium* produz *reads* com até 1000 pares de base (pb) (ROCHE, 2012), a plataforma *Illumina Genome Analyser* produz *reads* com até 150 pb (ILLUMINA, 2012). Essa diferença faz com que o número de sequências geradas pela plataforma *Illumina* seja superior. Dessa forma, quando comparado com trabalhos que utilizaram essa plataforma de sequenciamento (MARIONI et al., 2008; WONG; CANNON; WICKNESWARI, 2011; XU et al., 2011) o número *reads* produzidos no presente trabalho foi baixo. Entretanto, segundo Luo et al. (2012), a correlação entre as duas plataformas com relação a cobertura das sequências identificadas é muito alta ($R^2 > 0,9$) e assim ambas formas de análise promovem uma visão geral equivalente das amostras analisadas. Os mesmos autores apresentam uma comparação detalhada entre os dois métodos de sequenciamento. Por outro lado, quando comparado com trabalhos que utilizaram a mesma plataforma, a diferença entre o número de *reads* não é tão grande, sendo explicada pelo número de placas sequenciadas (WEBER et al., 2007; GARG et al., 2011; VILLAR et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Após a etapa de sequenciamento foi necessária a construção de um banco de dados de referência para realização do mapeamento dos *reads* e identificação dos genes diferencialmente expressos. A base da referência foram as sequências provenientes do sequenciamento do genoma do eucalipto, e uma vez que esse ainda não foi concluído, *ESTs*

depositadas no NCBI e *ESTs* disponíveis no banco de dados descrito em Mizrachi et al. (2011) foram adicionadas à referência, removendo-se as sequências redundantes. Tendo em vista que se analisou o tecido do hospedeiro contaminado com o patógeno, moléculas de RNA provenientes do microrganismo foram extraídas e sequenciadas. Os *reads* gerados dessa forma foram então removidos da referência por meio da comparação com sequências de *Puccinia spp* depositadas no NCBI. Os *reads* que não tiveram homologia com sequências de *Eucalyptus spp* e com *Puccinia spp* foram submetidos ao processo de *De novo assembly* na tentativa de identificar genes ainda não descritos em *Eucalyptus spp*. Finalmente, para facilitar as análises, as sequências da referência que não possuíam homologia com os *reads* gerados foram removidas e a referência final foi então utilizada para a análise de *RNA-Seq*.

Considerando que para a construção das bibliotecas amostras provenientes das seis repetições biológicas foram utilizadas para a formação de um *Bulk*, o método MARS ("*MA-plot-based method with random sampling model*"), descrito por Wang et al. (2010) foi escolhido para a identificação dos genes diferencialmente expressos. Para cada gene analisado, o *P-valor* calculado, foi corrigido para o *Q-valor* segundo Storey e Tibshirani (2003). O *Q-valor* baseia-se na taxa de descobrimento falso (FDR - *False Discovery Rate*), que fornece uma medida de significância de cada característica testada, considerando que milhares estão sendo testadas simultaneamente (STOREY; TIBSHIRANI, 2003).

Utilizando-se os critérios acima, duas análises foram realizadas. Primeiramente identificou-se os genes diferencialmente expressos em relação aos tratamentos controles. O intuito dessa análise foi a identificação de genes induzidos na planta pela presença do patógeno. Posteriormente, a comparação entre os genótipos foi realizada para contrastar os níveis de expressão dos genes entre os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**. A análise da distribuição dos *GO-terms* fornecidas pelo *software BLAST2GO* mostrou grandes diferenças no perfil da resposta dos dois genótipos à presença do fungo, especialmente nos processos celulares envolvendo oxido-redução e nas funções moleculares relacionadas à atividade de oxido-redutase. Após o reconhecimento da presença do patógeno as proteínas R rapidamente disparam o processo de defesa que inclui a explosão oxidativa (GOMEZ-GOMEZ; BOLLER, 2000; ZIPFEL et al., 2006; BENT; MACKEY, 2007; CHINCHILLA et al., 2007; BOLLER; FELIX, 2009). As espécies reativas de oxigênio podem agir diretamente contra o microorganismo ou contribuir indiretamente na defesa da planta promovendo ligações cruzadas entre componentes da parede celular (BOLLER; FELIX, 2009). Nuehse et al. (2007) e Benschop et al. (2007), em estudos independentes, relatam a participação da enzima NADPH Oxidase na mediação do processo de explosão oxidativa.

A porcentagem das sequências que tiveram *GO-terms* relacionados a oxido-redução em relação à referência foram as mais altas dentro do genótipo **Resistente 03**. Por outro lado, não foram identificadas diferenças significativas na relação dessas categorias com a referência no genótipo **Susceptível 04** considerando o parâmetro utilizado ($FDR \leq 0,01$).

Após a identificação dos genes induzidos pela presença do patógeno, objetivou-se identificar os genes com maior envolvimento no mecanismo de resistência. Assim, optou-se por eliminar das análises os genes diferencialmente expressos que apresentaram a mesma tendência (aumento ou diminuição de expressão) nos dois genótipos e selecionar 10% dos genes com maiores diferenças de expressão (5% com maior aumento e 5% com maior diminuição) em relação aos tratamentos controle. Com base na anotação funcional fornecida pelo *software* *BLAST2GO* e nos níveis de expressão de cada transcrito, 14 genes foram selecionados para melhor compreensão do mecanismo de defesa de *E. grandis* à *P. psidii*, e validação dos dados de expressão provenientes das análises de *RNA-Seq*.

A correlação entre os dados originários das duas plataformas foi analisada a partir do *Coeficiente de Correlação de Pearson*. Com exceção de um único dado discrepante, a correlação entre as duas plataformas foi alta, indicando que os dados de expressão dos demais genes gerados pelas análises de *RNA-Seq* podem ser utilizados para o entendimento do processo de resistência.

Conforme esperado as análises de *qPCR* mostraram que a presença do patógeno influenciou a expressão de todos os genes analisados. Com exceção dos genes *MLP* e *Receptor LRR-Quinase*, todos os demais não apresentaram diferenças de expressão entre os genótipos sem a presença do fungo, o que mostra que a diferença na expressão desses genes entre os genótipos estudados é desencadeada pela presença do patógeno. De maneira geral, a expressão foi maior no genótipo **Resistente 03** em comparação com o genótipo **Susceptível 04** nos intervalos 6, 12, 18 e 24 h.a.i. e posterior queda nos valores de expressão no intervalo 72 h.a.i. Os resultados previamente descritos no capítulo 5 mostraram que não há diferenças no processo de germinação dos urediniósporos, formação do apressório e penetração do isolado **MF1** nos genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**, que ocorrem nos intervalos 3, 6 e 12 h.a.i., com o processo de defesa instalado entre os intervalos 12 e 24 h.a.i. Nesse intervalo é possível observar a formação da célula mãe do haustório no genótipo **Susceptível 04**, sendo que no genótipo **Resistente 03** apenas fragmentos do patógeno são detectados em pontos esparsos da folha. O intervalo 72 h.a.i. caracteriza-se pelo início do processo de colonização do mesofilo pelo fungo no genótipo susceptível.

Conforme revisado no capítulo 1, o processo de defesa das plantas inicia-se com o reconhecimento de elicitores pelos receptores PPR (*Pattern Recognition Receptors*), que possuem o domínio extracelular LRR (*Leucine-Rich Repeat*), responsável pela especificidade, e um domínio intracelular serina/treonina quinase. A ativação desses receptores ativa uma cascata de quinases que resultará na produção de proteínas R, e finalmente no processo de resistência (BENT; MACKEY, 2007). Em plantas o domínio *TIR* é encontrado quase que exclusivamente em proteínas R e desempenham um importante papel no processo de defesa (SWIDERSKI, BIRKER; JONES, 2009). O maior nível de expressão do gene que codifica o *Receptor LRR-Quinase* às 12 h.a.i. no genótipo **Resistente 03**, intervalo que ocorre a penetração do patógeno, indica que sua ativação é provavelmente estimulada por meio do reconhecimento de sinais da própria planta, **MIMPs** (*Microbe-Induced Molecular Patterns*) ou **DAMPs** (*Damage Associated Molecular Patterns*), e não pelo reconhecimento de sinais oriundos diretamente do patógeno, **PAMPs** (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*). A expressão do gene *TIR-NBS-LRR* no mesmo intervalo mostra que a produção de proteínas R foi também estimulada pela penetração do patógeno.

Em plantas, vias de sinalização envolvendo mensageiros secundários, como a via de sinalização **PI** ("*Phosphatidylinositol*") são conhecidas (MA, et al., 2006; ISCHEBECK; SEILER; HEILMANN, 2010; MIKAMI; SAAVEDRA; SOMMARIN, 2010). Nessa via a enzima Fosfatidilinositol Monofosfato Quinase (PIPK) desempenha um papel chave na produção de fosfolipídios de membrana, que possuem um importante papel na transdução de vários sinais relacionados ao desenvolvimento e resposta a estresses por meio da regulação da organização do citoesqueleto, ativação de canais de íons e tráfico de vesículas (XUE, CHEN, ME, 2009; ISCHEBECK; SEILER; HEILMANN, 2010). Múltiplas cópias do domínio MORN (*Membrane Occupation and Recognition Nexus*) já foram encontradas nessas proteínas (MA et al. 2006) cuja ação é responsável pela produção de Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, um mensageiro intracelular crítico envolvido no tráfico de vesículas e modulação do citoesqueleto de actina, além de ser o substrato da fosfolipase C para produzir dois mensageiros secundários, o Diacilglicerol que permanece na membrana, e o Inositol-1,4,5-trifosfato, que se difunde pelo citoplasma (MIKAMI et al., 2010; LAXALT, MUNNIK, 2002). Acredita-se que a ativação dessas proteínas é regulada pelo domínio MORN (MA, et al., 2006; IM et al., 2007; KUSANO et al., 2008) e já foram descritos estudos sobre a participação da via de sinalização do **PI** em processos de resistência à patógenos (VAN DER LUIT, PIATTI et al., 2000). Segundo Laxalt e Munnik (2002), após a detecção de elicitores por receptores de membrana é ativada uma via de transdução de sinais mediada por

mensageiros secundários, que levam a ativação de uma cascata de quinases, ativação de fatores de transcrição e instalação da resposta de defesa.

Os fatores de transcrição desempenham um papel fundamental nos organismos, organizando a expressão temporal e espacial de genes em resposta à estímulos do ambiente (BEDON, et al., 2010). Dentre os fatores de transcrição analisados no presente estudo encontram-se dois membros da família dos MYBs, sendo um pertencente ao grupo R2R3-MYB, um membro da família WRKY, um dos mais estudados fatores de transcrição envolvidos na resposta de plantas à patógenos e uma proteína GRAS, cujas semelhanças estruturais, a presença de um sinal de localização nuclear e o fato de diversas dessas proteínas terem sido localizadas no núcleo sugerem que também constituam uma família de fatores de transcrição (HIRSCH; OLDROYD, 2009).

A família dos fatores de transcrição MYBs possuem como característica comum domínios MYB repeats (R). Em plantas o maior grupo desses fatores de transcrição são os R2R3-MYBs, cuja maioria dos motivos utilizados para sua classificação são somente encontrados em organismos vegetais. Apesar dos domínios MYBs serem bastante conservados, a extremidade C-Terminal é variável e contém domínios de ativação ou repressão, e resíduos conservados de serina e treonina, que podem corresponder à sítios de modificações pós-traducionais (FELLER et al., 2011).

O envolvimento desses fatores de transcrição na regulação da resposta tanto a estresses bióticos como abióticos é amplamente estudado. Liu et al. (2011) observaram um aumento significativo nos níveis de transcritos do fator de transcrição *TaPIMP1*, um membro do grupo *R2R3-MYBs*, em plantas de trigo inoculadas com o patógeno *Bipolaris sorokiniana*. Essa mesma proteína, quando expressa em tabaco, aumentou a resistência das plantas à *Ralstonia solanacearum*, além de aumentar a tolerância à estresses hídrico e salino. Jia et al. (2011) demonstraram que a expressão da proteína MYB73 em *Arabidopsis*, um outro membro da família R2R3-MYBs, foi induzida pelo patógeno *B. oryzae* e sugerem que esse fator de transcrição está envolvido na via de sinalização mediada por ácido salicílico (AS) e jasmonato (JA). Bedon et al. (2010) sugerem o envolvimento da proteína MYB14, um membro do Subgrupo 4 (Sg4) dos fatores de transcrição R2R3 MYBs de *Arabidopsis*, em uma ampla resposta de defesa em coníferas (*Picea glauca*).

As proteínas GRAS são proteínas exclusivas de plantas e possuem importantes papéis em processos como desenvolvimento e transdução de sinais (BOLLE, 2004). O nome da família deriva dos primeiros três genes caracterizados **GAI**, **RGA** and **SCR** (DILAURENZIO et al., 1996; PENG et al., 1997; SILVERSTONE; CIAMPAGLIO; SUN, 1998) e de maneira

geral os membros dessa família exibem considerável homologia uns aos outros na extremidade C-Terminal e grande diversidade na extremidade N-Terminal, sugerindo que essa região está relacionada à especificidade de suas funções biológicas (TIAN et al., 2004). Diversos trabalhos demonstram o envolvimento desses genes na interação entre plantas e microorganismos (KALO et al., 2005; SMIT et al., 2005). Mayrose et al. (2006) observaram o acúmulo de seis transcritos pertencentes a família GRAS durante o processo de infecção de tomate à *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Fode et al. (2008) identificaram um membro das proteínas GRAS envolvido na ativação de promotores de genes relacionados à resposta de defesa induzidos pelo ácido salicílico (AS).

Os fatores de transcrição WRKY compreendem uma superfamília de proteínas com alta afinidade às sequências de DNA "W box" e compartilham a sequência conservada WRKYGQK, a qual, junto com um domínio dedo de zinco, caracteriza o domínio WRKY (MAEO et al., 2001). Conforme revisado no capítulo 1, a presença de patógenos, elicitores e substâncias sinalizadoras, como o ácido salicílico, estimulam o aumento da expressão de genes que codificam essas proteínas. Esses fatores de transcrição estão entre os mais bem estudados no envolvimento em respostas de defesa (revisado no capítulo 1). Moreau et al. (2012) sugerem a participação dos fatores de transcrição WRKY46 e WRKY54 na ativação da defesa de *Arabidopsis* à *Erwinia amylovora*. Wu et al. (2011) relatam aumento da resistência de *Arabidopsis* ao fungo biotrófico *Botrytis cinerea* em plantas que superexpressavam o fator de transcrição WRKY28. Da mesma forma, plantas que tiveram a expressão desse gene inibida, mostraram-se susceptíveis ao patógeno. Análises de *RNA-Seq* de plantas de soja revelam grande aumento de dois genes que contêm o domínio WRKY33 em plantas resistentes inoculadas com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, quando comparado com plantas susceptíveis submetidas ao mesmo tratamento (KIM et al., 2011). Zheng et al. (2011) demonstraram que o gene *CaWRKY30* *Capsicum annuum* L. apresentou aumento de expressão em resposta a diversos patógenos, assim como ao tratamento com ácido salicílico.

Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que os 4 fatores de transcrição analisados estão envolvidos nos processos de defesa de *E. grandis* à *P. psidii*. Com exceção do fator de transcrição GRAS, a expressão de todos os demais é detectada às 6 h.a.i. A diminuição nos níveis de expressão dos genes de todos os fatores de transcrição a partir das 18 h.a.i. indica que os mesmos são responsáveis por ativar a transcrição de genes envolvidos no processo de resistência, uma vez que no intervalo 24 h.a.i. a expressão de três,

dos quatro fatores de transcrição estudados, não apresentam diferenças significativas entre os dois genótipos.

As atividades celulares dos eucariotos são coordenadas através de uma complexa e interligada rede mantida pela produção e degradação de proteínas que dessa forma estão sob um delicado controle espacial e temporal (HO; TSAI; CHIEN, 2006).

A via de degradação proteica desses organismos envolve a marcação de substratos, os quais serão degradados via proteossomo 26S. Esse processo é realizado pela adição sequencial de ubiquitinas (Ub) e é mediado por três enzimas: E1 (enzima de ativação), E2 (enzima de conjugação) e E3 (Ubiquitina ligase). A enzima E1 utiliza ATP para formar uma forte ponte tioéster com Ub. A enzima E2 por sua vez recebe Ub de E1 e dois tipos de E3 são responsáveis por transferir Ub de E2 para o substrato. A E3 com domínio HECT, transfere a Ub diretamente para o substrato e a E3 com domínio RING, transfere Ub para E3 HECT, que irá finalmente transferir a Ub para o substrato. A E3 RING ligase melhor caracterizada é o complexo SCF ("*Skp-Cullin-Fbox*"), composto por 4 componentes principais, entre os quais uma proteína F-Box. Detalhes sobre essas proteínas podem ser encontrados em Ho; Tsai e Chien (2006).

Estudos demonstram a indução da expressão de genes que codificam essas proteínas em resposta a diversos tipos de estresses, como injúria, tratamentos químicos com ácido salicílico, metil jasmonato e ácido absísico e inoculação com patógenos (LIU et al., 2002).

A ativação de proteínas R nas células em resposta à microorganismos tem como consequência efeitos negativos que afetam o desenvolvimento da planta e dessa forma, a expressão constitutiva dessas proteínas, apesar de aumentar a resistência à patógenos, pode levar à respostas autoimunes e alterar o desenvolvimento, como por exemplo o desenvolvimento do fenótipo anão. Assim, o nível de proteínas R nas células deve estar sob múltiplos níveis de um rigoroso controle negativo, que envolve a participação do complexo SCF (CHENG et al., 2011).

A análise da expressão relativa dos genes *F-Box1*, *F-Box2* e *F-Box3* mostrou que esses genes apresentaram maior indução pela presença do patógeno no genótipo **Resistente 03**, uma vez que não eram detectadas diferenças entre os níveis de expressão de *F-Box1* e *F-Box2* entre os dois genótipos no tratamento controle, e *F-Box3*, que se apresentava inicialmente mais expresso no genótipo **Susceptível 04**, teve aumento gradual de expressão no genótipo **Resistente 03** até o intervalo 18 h.a.i. Esses resultados demonstram que a via de degradação que envolve o complexo SCF pode estar envolvida como reguladora do nível de proteínas R, uma vez que às 24 h.a.i. apenas o gene *F-Box1* mostrou-se mais expresso no genótipo

Resistente 03 e às 72 h.a.i. os genes *F-Box1*, *F-Box2* e *F-Box3* foram mais expressos no genótipo **Susceptível 04**.

As pectinas são os principais constituintes da parede celular das plantas, representadas por grupos heterogêneo de polímeros, dos quais os homogalacturanos (HGA) são os mais importantes. Esses polisacarídeos são sintetizados no complexo de golgi e secretados na parede celular em um estado altamente metil-esterificado (revisado por MICHELI, 2001). A enzima pectinametilesterase (PME) catalisa a remoção dos esteres dos HGA (JOLIE et al., 2010), tornando-os susceptíveis à ação de hidrolases como as endopoligalacturonases, contribuindo assim para diminuição da rigidez da parede celular (BRUMMELL; HARPSTER, 2001; WAKABAYASHI; HOSON; HUBER, 2003). Proteínas inibidoras da pectinametilesterase (PMEI), ao contrário das PMEs não se apresentam fortemente ligadas à parede celular e provavelmente desempenham um importante papel fisiológico na regulação dessas enzimas em plantas. A PMEI melhor caracterizada é encontrada em Kiwi (BALESTRIERI et al., 1990) e diversas sequências homólogas são encontradas em diversas plantas (JOLIE et al., 2010). Essas proteínas apresentam pequena heterogeneidade na extremidade N-terminal, o que pode ser atribuído à presença de múltiplas isoformas (JOLIE et al., 2010). A ação desses inibidores é específica à enzimas PMEs, e a proteína PMEI de Kiwi demonstrou atuar como inibidor de PMEs de diversas plantas como laranja, maçã, tomate, batata, banana e morango. A ação inibidora da enzima se dá pela formação de um complexo estequiométrico inativo 1:1 entre a enzima e o inibidor através de uma interação não covalente e reversível, sendo específica para a inibição de PMEs de plantas. (Revisado por JOLIE et al., 2010). Esses inibidores podem ter importante papel na defesa das plantas, inibindo a ação de PMEs endógenas e assim diminuindo a susceptibilidade da parede celular à enzimas pectinolíticas produzidas por patógenos (BELLINCAMPI et al., 2004; JUDE, 2006; LIONETTI et al., 2007). A superexpressão de duas isoformas de PMEI em *Arabidopsis* resultou em aumento da resistência da planta ao patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea* (LIONETTI, 2007). Em trigo, tratamentos com Ácido Salicílico e H₂O₂ induziram a expressão do inibidor taPMEI (HONG et al., 2010). O silenciamento gênico da isoforma *CaPMEII* em *Capsicum annuum* levou ao aumento da susceptibilidade das plantas à *Xanthomonas campestris* (NA et al., 2008).

O alto nível de expressão do gene *PMEI* estudado no intervalo 12 h.a.i., demonstra que a ação inibidora da PME possui um importante papel no processo de resistência de *E. grandis* à *P. pisidii*, uma vez que esse intervalo corresponde ao momento de penetração do patógeno.

De Lorenzo et al (2011) descrevem um mecanismo, **PIMS** (*Pectin Integrity*

Monitoring System), no qual a integridade da pectina é monitorada para alertar a célula no caso de danos. Uma importante parte desse mecanismo é o reconhecimento de oligogalacturonídeos (**OGs**), que são fragmentos da própria parede celular, os quais são liberados após a ação de poligalacturonases (PG). A alta expressão do gene *PMEI* no genótipo **Resistente 03** no intervalo 12 h.a.i. somado ao fato do mecanismo de penetração ocorrer entre as paredes anticlinais da célula da epiderme, conforme apresentado nos capítulos 3 e 4 e por Xavier et al. (2001), sugerem que o mecanismo de penetração do patógeno envolve a liberação de hidrolases como as PGs. A ação dessas enzimas resultaria na liberação de **OGs**, que ativariam vias de defesa, as quais envolvem a participação de proteínas inibidoras da PME, que bloqueiam a ação de PMEs endógenas tornando a parede celular mais espessa e dificultando o desenvolvimento do fungo.

Injúrias causadas tanto pelo ataque de patógenos quanto por herbivoria levam à ativação das respostas de defesa das plantas (BENT; MACKEY, 2007) e genes relacionados à expressão de proteínas induzidas por injúria podem ser expressos localmente, ou seja, no local da injúria, ou sistematicamente, em folhas não atacadas (RYAN, 2000). Romeis et al. (1999) demonstraram que a MAP-Quinase WIPK (*Wounding-Induced Protein Kinase*) foi rapidamente ativada em células em suspensão de tabaco que expressavam o gene de resistência *Cf-9* de tomate, quando tratadas com o elicitor *Avr9*. Kim, Bove e Assmann (2008) demonstraram que a superexpressão de genes *UBA2* em *Arabidopsis*, um gene induzido por injúria mecânica, levou à expressão de diversos genes relacionados à processos de defesa. Schenk et al. (2008) identificaram que plantas de canola quando inoculadas tanto com *Alternaria brassicicola*, quanto com ácido salicílico mostraram aumento de expressão de genes de resposta à injúria. O alto nível de expressão desse gene no genótipo **Resistente 03** sugere que esse transcrito desempenha um importante papel no mecanismo de defesa de *E. grandis* à *P. psidii*. O aumento de expressão desse gene inicia-se às 6 h.a.i. e atinge o maior nível de expressão às 12 h.a.i.

As proteínas GTP *Binding* são componentes chave de complexos biológicos, envolvidos no controle do crescimento e desenvolvimento de eucariotos sob condições normais e estresse (WANG; LI, 2009). Apesar de diversas proteínas dessa família (IAN, *Immune-Associated Nucleotide-Binding proteins*) estarem diretamente relacionada à defesa de plantas, a expressão do gene *AIG1*, o qual codifica a proteína AIG1, pertencente às GTP-*Binding*, parece não estar envolvido no processo de resistência de *E. grandis* à *P. psidii*. O gene mostrou-se diferencialmente expresso entre os dois genótipos em apenas dois intervalos e em ambos mais expresso no genótipo **Susceptível 04**.

As proteínas MLPs (*Major Latex Protein*) são proteínas que foram primeiramente descritas no latex de papoula (*Papaver somniferum*) (NESSLER; ALLEN; GALEWSKY, 1985). São proteínas exclusivas de plantas e já foram descritas em espécies como *Arabidopsis*, pêssego, morango, melão pepino e soja. Essas proteínas têm sido relacionadas ao desenvolvimento de frutos e flores e apesar de estarem envolvidas em processos de defesa (LYTLE et al., 2009) o gene que codifica essa proteína parece ter menor participação no processo resistência de *E. grandis* à *P. psidii* quando comparados à outros genes estudados nesse trabalho, uma vez que apresentou maior expressão no genótipo **Resistente 03** somente no intervalo 18 h.a.i.

Com exceção de três genes estudados (*MLP*, *F-Box 3* e *Receptor LRR-Quinase*) todos os demais não apresentaram diferenças entre os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** antes da inoculação com o patógeno. Além disso esses três genes apresentaram mudanças significativas no padrão de expressão após a inoculação. Esses fatos mostram que a estratégia na análise dos dados gerados pela técnica de *RNA-Seq* para a seleção dos genes candidatos foi muito eficiente. A alta correlação encontrada entre as duas análises, demonstrada pelo *Coeficiente de Correlação de Pearson*, indica que os demais dados gerados pela técnica de *RNA-Seq* podem ser utilizados para posteriores análises.

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que o mecanismo de resistência de *E. grandis* à *P. psidii* é complexo, envolvendo a participação de diferentes vias de sinalização, diversas famílias de fatores de transcrição, genes diretamente envolvidos no processo de defesa e vias de degradação de proteínas.

É interessante notar que a maioria dos genes estudados apresentaram diminuição nos valores de expressão a partir do intervalo 18 h.a.i. no genótipo **Resistente 03** e muitos foram mais expressos no genótipo **Susceptível 04** no intervalo 72 h.a.i. Esses dados sugerem que esse genótipo desencadeia a resposta de defesa tardiamente, o que não possibilita a contenção do processo de infecção. Esse fato reforça a hipótese levantada no capítulo 2 de que o genótipo **Resistente 03** detecta a presença do patógeno mais rapidamente que o genótipo **Susceptível 04** desencadeando uma resposta de defesa mais rápida e efetiva, bloqueando o desenvolvimento do patógeno. O perfil de expressão do gene que codifica o domínio *MORN* sugere que a ativação da sinalização por meio da via do **PI** age nos primeiros momentos do processo de infecção, antes da penetração do patógeno. Alguns trabalhos demonstram a existência de receptores localizados na parede celular de plantas (BOUDART et al., 2007; JAMET et al., 2008). e assim a percepção da presença do patógeno nesse intervalo pode ser realizada por meio dessas proteínas. Aparentemente o patógeno utiliza-se de enzimas

hidrolases como as PGs para auxiliar no processo de penetração. A ação dessas enzimas é então minimizada com a inibição das PME endógenas, processo evidenciado pela alta expressão do gene *PMEI* no intervalo em que ocorre a penetração do patógeno (12 h.a.i.). O processo de penetração por sua vez resulta na produção de compostos das próprias plantas que servem de elicitores para a ativação do Receptor LRR-Quinase, que inicia outro processo de sinalização, complementando a indução do processo de defesa. A comparação entre os perfis de expressão dos fatores de transcrição estudados e dos genes envolvidos nos processos de sinalização permite sugerir que os dois fatores de transcrição da família dos MYBs e o fator de transcrição WRKY sejam ativados pela via de sinalização do **PI**, enquanto os fatores de transcrição GRAS podem ser ativados pela via de sinalização iniciada pelo Receptor NBS-LRR. Os fatores de transcrição por sua vez ativam a expressão de genes responsáveis pela produção de proteínas envolvidas no bloqueio direto da presença do patógeno como a proteína TIR-NBS-LRR.

Durante todo o processo de interação entre *E. grandis* e *P. psidii*, observa-se a participação da via de degradação proteica mediada pelo proteossomo 26S, evidenciada pela expressão dos 3 genes *F-Box*. A diferença no perfil de expressão desses genes sugere que as vias de degradação podem estar agindo em diferentes frentes, incluindo o controle nos níveis de proteínas R, que poderiam ocasionar danos ao hospedeiro. Dentre todos genes analisados o gene que mostrou maior envolvimento no processo de resistência foi o gene responsável pela expressão da Proteína Induzida Por Injúria, cujos níveis de expressão relativa ultrapassaram duas mil vezes nos genótipo **Resistente 03**.

Os dados apresentados nesse capítulo, somados aos resultados descritos nos capítulos anteriores, nos permitiram a apresentação de um modelo para explicar o mecanismo de resistência, associando cada etapa do desenvolvimento do patógeno as respostas dos genótipos à nível transcricional.

6.4.1 Apresentação do modelo de resistência de *Eucalyptus grandis* a *Puccinia psidii*

Após a formação do apressório às 6 h.a.i. inicia-se um mecanismo de sinalização para indução do processo de defesa. Nessa etapa ainda não se observa a penetração do patógeno, e dessa forma, a percepção de sua presença é realizada por proteínas da parede celular. Esse sinal é então reconhecido pela proteína PIPK, que contém o domínio MORN, que inicia o processo de transdução de sinal via mensageiros secundários. Essa via de sinalização leva à

ativação de uma cascata de quinases, que por sua vez ativa fatores de transcrição, incluindo membros da família dos MYBs e WRKY, que modulam a atividade de proteínas como a Proteína Induzida por Injúria (Figura 6.17 A e 6.18). Às 12 h.a.i. o patógeno vence as barreiras físicas impostas pela planta e penetra no tecido vegetal. Conforme descrito nos capítulos 3 e 4, esse processo ocorre entre a parede das células anticlinais. Para auxiliar o processo de penetração o fungo utiliza-se de enzimas hidrolíticas como as PGs, que degradam a parede celular permitindo o acesso ao conteúdo citoplasmático. Esse processo leva à liberação de fragmentos da parede que são percebidos pelo Receptor LRR-Quinase o qual inicia então uma nova cascata de quinases, levando à ativação de uma segunda frente de resposta de defesa (Figuras 6.17 C e 6.18). Nessa etapa, outros fatores de transcrição como GRAS estão envolvidos e por se tratar de elicitores provenientes da própria planta, esses fragmentos oriundos da parede celular são chamados de MIMPs ou DAMPs (revisado no capítulo 1). A rápida transcrição da proteína PME1, que age diretamente na parede celular, impede a ação de PMEs endógenas, dificultando assim a ação das PGs fúngicas no processo de penetração. Ao mesmo tempo tem-se a ação da proteína TIR-NBS-LRR, que se liga diretamente ao patógeno (Figuras 6.17 C e 6.18). À partir das 18 h.a.i., o desenvolvimento do fungo está bloqueado no genótipo resistente, os níveis dos transcritos envolvidos no processo de defesa começam a diminuir e às 24 h.a.i., intervalo em que apenas fragmentos do patógeno são detectados, a maioria dos genes volta ao nível de expressão basal. Nesse momento tem-se instalada a resposta **PTI** (*Pathogen Trigger Immunity*) (Figuras 6.17 E), revisada no capítulo 1.

O genótipo susceptível não é capaz de detectar a presença do patógeno nos momentos iniciais do processo de infecção (Figura 6.17 B), sendo às 12 h.a.i. observada a formação da vesícula sub-epidermal (Figura 6.17 D). Nesse intervalo o patógeno, já no interior do tecido vegetal, libera efetores que interferem na ação dos genes de defesa auxiliando na manutenção do patógeno no tecido da planta, caracterizando a ocorrência de **ETS** (*Effector Triggered Susceptibility*), revisada no capítulo 1. **ETS** é mantida até o intervalo 72 h.a.i. (Figura 6.17 F e H) quando o fungo inicia o processo de colonização. Nessa etapa o rápido crescimento do patógeno permite sua detecção pelo genótipo **Susceptível 04**, que aumenta a expressão dos genes relacionados ao processo de defesa. Entretanto, não é mais possível conter o desenvolvimento do fungo.

A Figura 6.18 esquematiza as duas vias de sinalização propostas nesse modelo com os genes envolvidos e os horários de sua ação.

Figura 6.17. **A-** A ativação do processo de defesa mediada por mensageiros secundários inicia-se antes da penetração do patógeno. **C-** Enzimas hidrolíticas auxiliam a penetração do fungo, liberando DAMPs que são reconhecidos pelo Receptor LRR-Quinase, ativando uma segunda frente de defesa. **E-** Instalação de **PTI**. **G:** Patógeno não mais detectado. Os genes de defesa voltam ao nível basal. **B:** A presença do patógeno não é reconhecida pelo genótipo susceptível. **D:** Desenvolvimento da vesícula sub-epidermal e liberação de efetores. **E:** Formação do haustório e liberação de mais efetores pelo patógeno. **H:** Início do processo de colonização e ativação do processo de defesa no genótipo susceptível. As vias escritas em cinza indicam as expressões dos genes são detectadas, entretanto em nível baixo. Detralhes sobre as imagens do patógeno são apresentadas no capítulo 5

Figura 6.18- A indução do processo de defesa inicia-se antes da penetração do patógeno e ocorre via mensageiros secundários, iniciada pela enzima PIPK, que possui o domínio MORN. Após o patógeno penetrar a célula do hospedeiro, a liberação de fragmentos da parede celular levam à ativação do receptor LRR-Quinase, que inicia uma segunda frente de defesa. A partir de então ambas as vias de defesa agem juntas, levando à ativação de fatores de transcrição, levando então à resposta de defesa. Os números em vermelho indicam o horário que a expressão de cada gene foi detectada

6.5 Conclusão

Diferenças marcantes foram encontradas nos perfis transcricionais do genótipo **Resistente 03** e **Susceptível 04** após a inoculação com o patógeno. O processo de resistência está diretamente relacionado à reações de oxido-redução e envolve a participação de diversos componentes. A via de sinalização do PI provavelmente está envolvida na ativação do processo de resistência nos estágios iniciais do desenvolvimento do patógeno, sendo a ativação dessa via estimulada por receptores localizados na parede celular. O processo de penetração do fungo é observado às 12 h.a.i. envolvendo a liberação de PGs para auxiliar no rompimento da parede celular. Como consequência tem-se a liberação de DAMPs que atuam como elicitores para ativação de receptores como o Receptor LRR-Quinase, iniciando uma segunda frente de defesa contra o patógeno. A ação de PMEI inibe a atividade de PMEs endógenas dificultando a ação das PGs fungicas, contribuindo para a contenção do desenvolvimento do fungo às 12 h.a.i.. Além disso, nesse intervalo observou-se o maior nível de expressão da maioria dos genes apresentados no modelo proposto, o que indica que esse intervalo é chave no processo de resistência. Esse processo envolve a ativação de cascatas de quinases responsáveis pela transdução de sinais que levam a ativação de diversos fatores de transcrição, entre eles membros da família WRKY, MYB e GRAS, que estão envolvidos no processo de regulação da expressão de genes de defesa. A atividade do proteossomo 26S é constante durante todo o processo de resistência, sendo que o processo de degradação proteica pode estar envolvido também no controle da atividade de Proteínas R, evitando o efeito negativo que a expressão dessas proteínas podem desempenhar caso a expressão não seja controlada. Além dos 14 genes selecionados para validação e melhor compreensão do processo de defesa as análises de *RNA-Seq* permitiram identificar outros 13.513 genes diferencialmente expressos considerando os dois genótipos e os seis intervalos analisados. A alta correlação encontrada entre os dados provenientes das análises de *qPCR* e *RNA-Seq* fornecida pelo *Coeficiente de Correlação de Pearson* mostra que os demais dados de expressão podem ser utilizados para busca de outros genes envolvidos no processo de resistência e complementação do modelo.

Referências

AN, S.H.; SOHN, K.H.; CHOI, H.W.; HWANG, I.S.; LEE, S.C.; HWANG, B.K. Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 228, n. 1, p. 61-78, 2008.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOF, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

BALESTRIERI, C.; CASTALDO, D.; GIOVANE, A.; QUAGLIUOLO, L.; SERVILLO, L. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 193, n. 1, p. 183-187, 1990.

BEDON, F.; BOMAL, C.; CARON, S.; LEVASSEUR, C.; BOYLE, B.; MANSFIELD, S.D.; SCHMIDT, A.; GERSHENZON, J.; GRIMA-PETTENATI, J.; SÉGUIN, A.; MACKAY, J. Subgroup 4 R2R3-MYBs in conifer trees: gene family expansion and contribution to the isoprenoid- and flavonoid-oriented responses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford v. 61, n. 14, p. 3847-3864, 2010.

BELLINCAMPI, D.; CAMARDELLA, L.; DELCOUR, J.A.; DESSEAUX, V.; D'OVIDIO, R.; DURAND, A.; ELLIOT, G.; GEBRUERS, K.; GIOVANE, A.; JUGE, N.; SØRENSEN, J.F.; SVENSSON, B.; VAIRO, D. Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors **Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v.1696, n. 12, p.265-274, 2004.

BENSCHOP, J.J.; MOHAMMED, S.; O'FLAHERTY, M.; HECK, A.J. SLIJPER, M.; MENKE, F.L. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 6, n. 7, p. 1198-1214, 2007.

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, 2007.

BOLLE, C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 5, p. 683-692, 2004.

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, 2009.

BOUDART, G.; MINIC, Z.; ALBENE, C.; CANUT, H. JAMET, E.; PONT-LEZICA, R.F. Cell Wall Proteome In: SAMAJ, J.; THELEN, J. (Ed.). **Plant Proteomics**, Springer, 2007 chap. 12, p. 169-185.

BRONDANI, R.P.; WILLIAMS, E.R.; BRONDANI, C.; GRATAPAGLIA, D. A Microsatellite-based consensus linkage map for species of Eucalyptus and a novel set of 230 microsatellite markers for the Genus. **BMC Plant Biology**, London, v.6, p. 20, 2006.

BRUMMELL, D. A.; HARPSTER, M. H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 47, n. 1-2, p. 311-340, 2001.

CARVALHO, A.O.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.;M.; CARMO, M.G.F. Resistência de espécies, progênies e procedências de *eucalyptus* à ferrugem, causada por *puccinia psidii* winter. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 33, p. 139-147, 1998.

CHENG, Y.T.; LI, Y.; HUANG, S.; HUANG, Y.; DONG, X.; ZHANG, Y.; LI, X.. Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 35, p. 14694-14699, 2011.

CHINCHILLA, D.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; KEMMERLING, B.; NÜRNBERGE, T.; JONES, J.D.G.; FELIX, G., BOLLER, T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. **Nature**, London v. 448, n. 7152, p. 497-U12, 2007.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

DE LORENZO, G.; BRUTUS, A.; SAVATIN, D.V.; SICILIA, F.; CERVONE, F. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage associated molecular patterns (DAMPs). **Febs Letters**, Cambridge, v. 585, p. 1521-1528, 2011

DIANESE, J.C., HARIDASAN, N.; MORAES, T.S.A. Screening *Eucalyptus* for rust resistance in Bahia. **Tropical Pest Management**, London, v. 32, p. 292-295, 1986.

DIANESE, J. C.; MORAES, T. S. D.; SILVA, A. R. Response of eucalyptus species to field infection by *Puccinia-psidii*. **Plant Disease**, Saint Paul v. 68, n. 4, p. 314-316, 1984.

DI LAURENZIO, L.; WYSOCKA-DILLER, J.; MALAMY, J.E.; PYSH, L.; HELARIUTTA, Y.; FRESHOUR, G.; HAHN, M.G.; FELDMANN, K.A.; BENFEY PN. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. **Cell**, Cambridge, v. 86, n. 3, p. 423-433, 1996.

FELLER, A.; MACHEMER, K.; BRAUN, E.L.; GROTEWOLD, E.. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. **The Plant Journal**, Oxford v. 66, n. 1, p. 94-116, 2011.

FODE, B. SIEMSEN, T.; THUROW, C.; WEIGEL, R.; GATZ, C.. The Arabidopsis GRAS Protein SCL14 Interacts with Class II TGA Transcription Factors and Is Essential for the Activation of Stress-Inducible Promoters. *Plant Cell*, Baltimore, v. 20, n. 11, p. 3122-3135, 2008.

GARG, R.; PATEL, R.K.; JHANWAR, S.; PRIYA, P.; BHATTACHARJEE A.; YADAV, G., BHATIA, S.; CHATTOPADHYAY, D.; TYAGI, A.K.; JAIN, M. Gene Discovery and Tissue-Specific Transcriptome Analysis in Chickpea with Massively Parallel Pyrosequencing and Web Resource Development. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 156, n. 4, p. 1661-1678, 2011.

GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. **Molecular Cell**, Cambridge v. 5, n. 6, p. 1003-1011, 2000.

HAAS, B.J.; ZODY, M.C. Advancing *RNA-Seq* analysis. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 5, p. 421-423, 2010.

HIRSCH, S.; OLDROYD, G.E.D. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v.4, n.8, p.698-700, 2009.

HO, M. S.; TSAI, P. I.; CHIEN, C. T. F-box proteins: the key to protein degradation. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v. 13, n. 2, p. 181-191, 2006.

HONG, M.J.; KIM, D.Y.; LEE, T.G.; JEON, W.B.; SEO, Y.W. Functional characterization of pectin methylesterase inhibitor (*PMEI*) in wheat. **Genes and genetic systems**, Mishima, v.85, p.97-106, 2010.

ILLUMINA. Disponível em:< http://www.illumina.com/systems/hiseq_systems.ilmn>. Acesso: 7 mar. 2012

IM, Y.J.; DAVIS, A.J.; PERERA, I.Y.; JOHANNES, E.; ALLEN, N.S.; BOSS, W.F.. The N-terminal membrane occupation and recognition nexus domain of Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate kinase 1 regulates enzyme activity. **Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 282, n. 8, p. 5443-5452, 2007.

ISCHEBECK, T.; SEILER, S.; HEILMANN, I. At the poles across kingdoms: phosphoinositides and polar tip growth. **Protoplasma**, Leipzig, v. 240, n. 1/4, p. 13-31, 2010.

JAMET, E.; ALBENNE, C.; BOUDART, G.; IRSHAD, M.; CANUT, H.; PONT-LEZICA, R. Recent advances in plant cell wall proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v.8, p.893-90, 2008

JIA, J.; XING, J.; DONG, J.; HAN, J. LIU, J. Functional Analysis of MYB73 of Arabidopsis thaliana Against Bipolaris oryzae. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 10, n. 5, p. 721-727, 2011.

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

JOLIE, R.P.; DUVETTER, T.; VAN LOEY, A.M.; HENDRICKX, M.E.. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. **Carbohydrate Research**, Amsterdam., v. 345, n. 18, p. 2583-2595, 2010.

JUDE, N.Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. Trends In Plant Science, Kidlington, v.11, n.7, p.359-367, 2006.

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**, Berlin, v.108, p.175-180, 2003

KALÓ, P.; GLEASON, C.; EDWARDS, A.; MARSH, J.; MITRA, R.M.; HIRSCH, S.; JAKAB, J.; SIMS, S.; LONG, S.R.; ROGERS, J.; KISS, G.B.; DOWNIE, J.A.; OLDROYD, G.E. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. **Science**, Washington, v. 308, n. 5729, p. 1786-1789, 2005.

KELLER, B.; FEUILLET, C.; MESSMER, M. Genetics of disease resistance: Basic concepts and application in resistance breeding. In SLUSARENKO A, FRASER RSS; VAN LOON LC (Eds). Mechanisms of resistance to plant diseases. Kluwer Academic Publishers, 2000, chap.2, p 101-160.

KESTLER, H.A.; MÜLLER, A.; KRAUS, J.M.; BUCHHOLZ, M.; GRESS, T.M.; LIU, H.; KANE, D.W.; ZEEBERG, B.R.; WEINSTEIN, J.N. VennMaster: Area-proportional Euler diagrams for functional GO analysis of microarrays. **BMC Bioinformatics**, London, v.9, n.67, 2008.

KIM, K.H.; KANG, Y.J.; KIM, D.H.; YOON, M.Y.; MOON, J.K.; KIM, M.Y.; VAN, K.; LEE, S.H. *RNA-Seq* Analysis of a Soybean Near-Isogenic Line Carrying Bacterial Leaf Pustule-Resistant and -Susceptible Alleles. **DNA Research**, Tokyo, v. 18, n. 6, p. 483-497, 2011.

KUSANO, H.; TESTERINK, C.; VERMEER, J.E.; TSUGE, T.; SHIMADA, H.; OKA, A.; MUNNIK, T.; AOYAMA, T. The Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate 5-kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, n. 2, p. 367-380, 2008.

LAXALT, A. MUNNIK, T. Phospholipid signalling in plant defence. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.5, p.1-7, 2002.

LIONETTI, V.; RAIOLA, A.; CAMARDELLA, L.; GIOVANE, A.; OBEL, N.; PAULY, M.; FAVARON, F.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 143, n. 4, p. 1871-1880, 2007.

LIU, H.; ZHOU, X.; DONG, N.; LIU, X.; ZHANG, H.; ZHANG, Z. Expression of a wheat MYB gene in transgenic tobacco enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*, and to drought and salt stresses. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin v. 11, n. 3, p. 431-443, 2011.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; SERINO, G.; DENG, X.W.; DINESH-KUMAR, S.P. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 7, p. 1483-1496, 2002.

LUO, C.; TSEMENTZI, D.; KYRPIDES, N.; READ, T.; KONSTANTINIDIS, K.T. Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. **Plos One**, on line, v.7, n.2, p.1-12, 2012.

LYTLE, B.L.; SONG, J.; DE LA CRUZ, N.B.; PETERSON, F.C.; JOHNSON, K.A.; BINGMAN, C.A.; PHILLIPS, G.N. JR; VOLKMAN, B.F. Structures of two *Arabidopsis thaliana* major latex proteins represent novel helix-grip folds. *Proteins*, New York, v.76, n.1, p.237-243, 2009.

MA, H.; LOU, Y.; LIN, W.H.; XUE, H.W. MORN motifs in plant PIPKs are involved in the regulation of subcellular localization and phospholipid binding. *Cell Research*, Beijing, v. 16, n. 5, p. 466-478, 2006.

MAEO, K; HAYASHI, S; KOJIMA-SUZUKI, H.; MORIKAMI, A.; NAKAMURA, K. Role of conserved residues of the **WRKY** domain in the DNA-binding of tobacco **WRKY** family proteins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v. 65, n. 11, p. 2428-2436, 2001.

MAMANI, E.M.C.; BUENO, N.W., FARIA, D.A.; GUIMARÃES, L.M.S.; LAU, D.; ACELINO C. ALFENAS, A.C; GRATTAPAGLIA, D. Positioning of the major locus for *Puccinia psidii* rust resistance (Ppr1) on the Eucalyptus reference map and its validation across unrelated pedigrees. *Tree Genetics and Genomes*, Heidelberg, v.6, p. 953–962, 2010.

MARIONI, J.C.; MASON, C.E.; MANE, S.M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. *RNA-Seq*: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, New York, v. 18, n. 9, p. 1509-1517, 2008.

MAYROSE, M.; EKENGREN, S.K.; MELECH-BONFIL S.; MARTIN G.B.; SESSA G. A novel link between tomato **GRAS** genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular Plant Pathology*, Oxford, v. 7, n. 6, p. 593-604, 2006.

MICHELI, F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, Kidlington, v. 6, n. 9, p. 414-419, 2001.

MIKAMI; SAAVEDRA; SOMMARIN Is membrane occupation and recognition nexus domain functional in plant phosphatidylinositol phosphate kinases? *Plant Signaling and Behavior*, Georgetown, v.5, n.10 p.1241-1244, 2010

MIZRACHI, E; HEFER, C.A.; RANIK, M.; JOUBERT, F.; MYBURG, A.A. *De novo assembled* expressed gene catalog of a fast-growing Eucalyptus tree produced by Illumina mRNA-Seq. *Bmc Genomics*, London v. 11, 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*, Collingwood, n. 34, p. 1010-1018, 2007.

MOREAU, M.; DEGRAVE, A.; VEDEL, R.; BITTON, F.; PATRIT, O. RENOU J.P.; BARNY, M.A.; FAGARD, M. Contributes to Nonhost Resistance of *Arabidopsis thaliana* Against *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 25, n. 3, p. 421-430, 2012.

NESSLER, C. L.; ALLEN, R. D.; GALEWSKY, S. Identification and characterization of latex-specific proteins in *Opium poppy*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 79, n. 2, p. 499-504, 1985.

NÜHSE T.S.; BOTTRILL A.R.; JONES, A.M.; PECK, S.C. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. **The Plant Journal**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 931-940, 2007.

PENG, J; CAROL, P; RICHARDS; DE, KING, K.E.; COWLING, R.J.; MURPHY G.P.; HARBERD, N.P. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. **Genes and Development**, New York, v. 11, n. 23, p. 3194-3205, 1997.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London v. 30, n. 9, p. 1-12, 2002.

PHYTOZOME. disponível em: <<http://www.phytozome.net/>>. Acesso em 01 nov. 2011.

RAMARKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A.F.M. Assumptionfree analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosciences Letters**, London, v. 339, p. 62-66, 2003.

ROCHE. Disponível em:< <http://454.com/products/gs-flx-system/index.asp>>. Acesso: 7 mar. 2012

ROMEIS, T; PIEDRAS, P.; ZHANG, S.; KLESSIG, D.F.; HIRT, H; JONES;J.D. Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 2, p. 273-287, 1999.

ROSADO, T.B.; TOMAZ, R.S.; JUNIOR, M.F.R.; ROSADO, A.M.; GUIMARÃES, L.M.S.; ARAÚJO, E.F.; ALFENAS, A.C.; CRUZ, C.D. Detection of QTL associated with rust resistance using IBD-based methodologies in exogamic *Eucalyptus spp.* populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Lismore, v.10,p. 321-328, 2010.

RYAN, C. A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1477, n. 1/2, p. 112-121, 2000.

SAMBROOK, J. Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning. In:FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989, 12p.

SCHENK, P.M.; THOMAS-HALL, S.R.; NGUYEN, A.V.; MANNERS, J.M.; KAZAN, K.; SPANGENBERG, G. Identification of plant defence genes in canola using Arabidopsis cDNA microarrays. **Plant Biology**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 539-547, 2008.

SILVERSTONE, A. L.; CIAMPAGLIO, C. N.; SUN, T. P. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 2, p. 155-169, 1998.

SMIT, P.; RAEDTS, J.; PORTYANKO, V.; DEBELLÉ, F.; GOUGH, C.; BISSELING, T.; GEURTS, R. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. **Science**, Washington, v. 308, n. 5729, p. 1789-1791, 2005.

STOREY, J. D.; TIBSHIRANI, R. Statistical significance for genomewide studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 16, p. 9440-9445, 2003. ISSN 0027-8424.

SWIDERSKI, M. R.; BIRKER, D.; JONES, J. D. G. The TIR Domain of TIR-NB-LRR Resistance Proteins Is a Signaling Domain Involved in Cell Death Induction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 2, p. 157-165, 2009.

TIAN, C.G. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 54, n. 4, p. 519-532, 2004.

VAN DER LUIT, A.H.; PIATTI, T.; VAN DOORN, A.; MUSGRAVE, A.; FELIX, G.; BOLLER, T.; MUNNIK, T. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 4, p. 1507-1515, 2000.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 12, 2002.

VILLAR, E.; KLOPP, C.; NOIROT, C.; NOVAES, E.; KIRST, M.; PLOMION, C.; GION, J.M. *RNA-Seq* reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **Bmc Genomics**, London, v. 12, p. 538, 2011.

WAKABAYASHI, K.; HOSON, T.; HUBER, D. J. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 160, n. 6, p. 667-673, 2003.

WANG, L.; FENG, Z.; WANG, X.; WANG, X.; ZHANG, X. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from *RNA-Seq* data. **Bioinformatics**, Oxford v. 26, n. 1, p. 136-138, 2010.

WANG, Z.; LI, X. IAN/GIMAPs are conserved and novel regulators in vertebrates and angiosperm plants. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 4, n. 3, p. 165-167, 2009.

WEBER, A.P.; WEBER, K.L.; CARR, K.; WILKERSON, C.; OHLROGGE, J.B. Sampling the arabidopsis transcriptome with massively parallel pyrosequencing. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, n. 1, p. 32-42, 2007.

WONG, M. M. L.; CANNON, C. H.; WICKNESWARI, R. Identification of lignin genes and regulatory sequences involved in secondary cell wall formation in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* via de novo transcriptome sequencing. **Bmc Genomics**, London v. 12, n.5, p.342, 2011.

WU, L.-T.; ZHONG, G.-M.; WANG, J.-M.; LI, X.-F.; SONG, X.; YANG, Y. Arabidopsis WRKY28 transcription factor is required for resistance to necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 5, n. 30, p. 5481-5488, 2011.

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**, Calyton, v. 30, n. 3, p. 277-281, 2001.

XAVIER, A.A.; SANFENTES, E.V.; JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.4, p.731-735, 2007.

XU, L.; ZHU, L.; TU, L.; LIU, L.; YUAN, D.; JIN, L.; LONG, L.; ZHANG, X. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by *RNA-Seq*-dependent transcriptional analysis and histochemistry. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 15, p. 5607-5621, 2011.

XUE, H.-W.; CHEN, X.; ME, Y. Function and regulation of phospholipid signalling in plants. **The Biochemical Journal**, London, v. 421, p. 145-156, 2009.

ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C.; OLD, K.; COUTO, M.M.F.; GRAÇA, R.N.; MAFFIA, L.A. Myrtaceae species resistance to rust caused by *Puccinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, Calyton, v. 39, p. 406-411, 2010.

ZHANG, G.; LI, Y.M.; SUN, Y.F.; WANG, J.M.; LIU, B.; ZHAO, J.; GUO, J.; HUANG, L.L.; CHEN, X.M.; KANG, Z.S. Molecular characterization of a gene induced during wheat hypersensitive reaction to stripe rust. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 55, n. 4, p. 696-702, 2011.

ZHENG, J.; ZOU, X.; MAO, Z.; XIE, B. A Novel Pepper (*Capsicum annuum* L.) WRKY Gene, CaWRKY30, Is Involved in Pathogen Stress Responses. **Journal of Plant Biology**, Seoul v. 54, n. 5, p. 329-337, 2011.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 20, p. 417-417, 2002.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J.D.; BOLLER, T.; FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP 0045F-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**, Cambridge, v. 125, n. 4, p. 749-760, 2000.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância do patógeno *P. psidii* Winter para a cultura do eucalipto cresce com a disseminação da doença ao redor do mundo. A recente chegada do patógeno na Austrália, centro de origem de centenas de plantas da família *Myrtaceae*, incluindo o gênero *Eucalyptus*, reforça a necessidade da compreensão do mecanismo molecular da interação entre o patógeno e o hospedeiro, e a identificação de genes envolvidos no processo de resistência.

Inicialmente, no capítulo 2, realizou-se a o isolamento do patógeno e a seleção criteriosa do material vegetal que serviu de modelo para o desenvolvimento das demais etapas do presente trabalho.

O objetivo da análise realizada no capítulo 3 foi estudar a anatomia da interação entre o isolado **MF1** e os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** para compreender a resposta desses genótipos à presença do patógeno, e com base na resposta individual de cada um estabelecer os intervalos de interesse para as análises moleculares. Apesar de permitir uma boa compreensão da resposta do hospedeiro susceptível ao patógeno, limitações da técnica de preparo da amostra permitiram que o fungo fosse detectado a partir do intervalo 36 h.a.i. e somente no genótipo **Susceptível 04**. Assim as etapas iniciais do processo de infecção e o estudo do desenvolvimento do patógeno no genótipo **Resistente 03** não foram identificados, fazendo-se necessário o estabelecimento de um método de preparo de amostra, que permitisse atingir esses objetivos.

O capítulo 4 descreve passo a passo o desenvolvimento desse método de preparo do material biológico que permitiu, por meio de microscopia de epifluorescência, superar as dificuldades descritas no capítulo 3. Além disso, o método desenvolvido mostrou-se aplicável também para análises de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura, abrindo perspectivas para a aplicação da técnica no entendimento de maiores detalhes do processo de interação entre *P. psidii* e *Eucalyptus spp.*

A aplicação desse método no estudo da interação entre o isolado **MF1** e os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04**, descrita no capítulo 5, permitiu a identificação de todas as etapas do desenvolvimento do fungo no genótipo Susceptível, bem como identificar o intervalo em que o desenvolvimento do patógeno é bloqueado no genótipo Resistente.

Esses estudos preliminares, somados à liberação dos primeiros *Drafts* do genoma do eucalipto e a disponibilidade de técnicas de *high-throughput sequencing* trouxeram a luz uma oportunidade ímpar para a compreensão da interação molecular entre *E. grandis* e *P. psidii*.

Dessa forma, o capítulo 6 mostrou o estudo da interação entre o isolado **MF1** e os genótipos **Resistente 03** e **Susceptível 04** ao nível do transcrito. Diferenças marcantes no

perfil de expressão gênica entre os dois genótipos após a inoculação com o patógeno revelaram que o processo de defesa de *E. grandis* à *P. psidii* é complexo e envolve a ativação de diferentes vias de sinalização, diferentes famílias de fatores de transcrição, a ação de vias de degradação proteica e a participação de Proteínas R e outras como PMEI e a Proteína Induzida por Injúria.

O presente trabalho conclui-se não somente com a proposta de um modelo para explicar o mecanismo de resistência de *E. grandis* à *P. psidii*, permitindo uma melhor compreensão do mecanismo de defesa, mas também fornece um patossistema modelo, criteriosamente estudado, que poderá ser utilizado em inúmeras outras aplicações, tanto em estudos que envolvem um detalhamento maior da expressão de genes envolvidos nos processos de defesa, bem como em estudos de proteoma e metaboloma.