

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

Estudo molecular do desenvolvimento de *Puccinia psidii* Winter *in vitro* e no processo de infecção em *Eucalyptus grandis*

Andressa Peres Bini

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

**Piracicaba
2016**

Andressa Peres Bini
Licenciado em Ciências Biológicas

Estudo molecular do desenvolvimento de *Puccinia psidii* Winter *in vitro* e no processo de infecção em *Eucalyptus grandis*

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

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

**Piracicaba
2016**

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

Bini, Andressa Peres

Estudo molecular do desenvolvimento de *Puccinia psidii* Winter *in vitro* e no processo de infecção em *Eucalyptus grandis* / Andressa Peres Bini. - - Piracicaba, 2016.
145 p. : il.

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

1. Ferrugem do eucalipto 2. Interação planta-patógeno 3. Diagnose molecular
4. Ceras cuticulares 5. Germinação *in vitro* I. Título

CDD 634.9734
B613e

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

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Labate pela orientação e oportunidades de trabalho;

À CAPES, CNPQ e FAPESP (Processo nº 2013/07596-6) pelo suporte financeiro;

À Professora Dra. Maria Carolina Quecine, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) pelas orientações, conselhos e sugestões para o desenvolvimento do presente trabalho;

Ao Professor Dr. Gabriel Rodrigues Alves Margarido (ESALQ/USP), ao Dr. Diego Maurício Riaño-Pachón (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CTBE) e a Livia Maria Franceschini (ESALQ/USP) pelas sugestões e auxílio nas análises de bioinformática;

À Especialista de Laboratório Dra. Thais Regiani Cataldi e a Dra. Ilara Gabriela Frasson Budzinski por todas as sugestões, discussões e orientações nas análises de metabolômica;

À Dra. Mônica Teresa Veneziano Labate e ao colega Dr. Felipe Garbelini Marques por toda a ajuda e conselhos oferecidos no laboratório;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética, ESALQ/USP pelo aprendizado e convivência;

À empresa Suzano Papel e Celulose e a Professora Dra. Luciana Duque Silva pela disponibilização de material biológico;

A todos os colegas do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas pela companhia e ajuda sempre que necessárias e também pelos conselhos, desabafos, risadas e boa convivência;

À Deus;

Aos meus pais, irmão e namorado por toda ajuda, compreensão e amor incondicional. Nada seria possível sem vocês.

EPÍGRAFE

"O jovem que quer ser cientista - e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor - tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente)."

Newton Freire Maia

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Produção florestal e o gênero <i>Eucalyptus</i>	15
2.2 A Ferrugem do eucalipto	16
2.2.1 Sintomas da doença.....	17
2.2.2 Processo de infecção e desenvolvimento no hospedeiro.....	18
2.3 Interação planta-patógeno.....	20
2.4 Ferramentas para estudo de patógenos biotróficos	24
2.4.1 Germinação e diferenciação estrutural <i>in vitro</i> e o papel das ceras cuticulares	24
2.4.2 Estudo da expressão gênica do estágio inicial de infecção de patógenos biotróficos.....	27
2.4.3 PCR em tempo real para diagnose de doenças em plantas	29
Referências	31
3 DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> E ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ESTRUTURAS INICIAIS DE INFECÇÃO DO FITOPATÓGENO <i>Puccinia psidii</i> Winter, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DO EUCALIPTO	41
Resumo.....	41
Abstract.....	41
3.1 Introdução	42
3.2 Materiais e Métodos	44
3.2.1 Material Biológico	44
3.2.2 Germinação e diferenciação <i>in vitro</i> do patógeno <i>P. psidii</i>	44
3.2.3 Experimento para o estudo dos transcritos de <i>P. psidii</i>	45
3.2.4 Isolamento do RNA total, construção das bibliotecas e sequenciamento	46
3.2.5 Pré-processamento das sequências e montagem <i>de novo</i> dos transcritos de <i>P. psidii</i>	47
3.2.6 Anotação dos transcritos de <i>P. psidii</i> provenientes da montagem <i>de novo</i> e categorização funcional.....	48
3.2.7 Estimativa da abundância dos transcritos e análise da expressão diferencial	48
3.3 Resultados	49
3.3.1 Germinação e diferenciação <i>in vitro</i> do patógeno <i>P. psidii</i>	49
3.3.2 Extração do RNA total.....	52
3.3.3 Sumário dos dados de sequenciamento e da montagem <i>de novo</i> dos transcritos de <i>P. psidii</i>	53
3.3.4 Anotação dos transcritos de <i>P. psidii</i> provenientes da montagem <i>de novo</i> e caracterização funcional.....	55
3.3.5 Análise de transcritos diferencialmente expressos.....	56
3.4 Discussão.....	61
Referências	67
4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA CERA CUTICULAR DE FOLHAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> RESISTENTES E SUSCETÍVEIS À FERRUGEM	77
Resumo.....	77
4.1 Introdução	78
4.2 Materiais e métodos	80

4.2.1 Material Biológico.....	80
4.2.2 Extrato clorofórmico da cera cuticular de <i>E. grandis</i> e do azeite de oliva	80
4.2.3 Análise por MALDI-TOF/TOF, processamento dos dados e análise estatística	81
4.2.4 Análise por GC-MS, processamento dos dados e análise estatística.....	82
4.3 Resultados.....	84
4.3.1 Análise dos metabólitos por MALDI-TOF/TOF	84
4.3.2 Análise dos metabólitos por GC-MS	89
4.4 Discussão	93
Referências.....	96
5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>Puccinia psidii</i> Winter EM FOLHAS DE <i>Eucalyptus grandis</i>	101
Resumo	101
Abstract.....	101
5.1 Introdução.....	102
5.2 Materiais e métodos.....	104
5.2.1 Material biológico.....	104
5.2.2 Extração de DNA	104
5.2.3 Desenvolvimento dos <i>primers</i> espécie-específicos	105
5.2.4 Especificidade e sensibilidade dos <i>primers</i> desenvolvidos.....	106
5.2.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	107
5.2.6 Detecção e análise temporal de <i>P. psidii</i> em folhas de eucalipto sob condições controladas	108
5.2.7 Detecção de <i>P. psidii</i> em campo.....	109
5.2.8 Análise dos dados.....	109
5.3 Resultados.....	110
5.3.1 Especificidade e sensibilidade dos <i>primers</i> por cPCR.....	110
5.3.2 Ensaio de qPCR	112
5.3.3 Detecção e monitoramento de <i>P. psidii</i> em folhas de eucalipto em experimento controlado	113
5.3.4 Detecção da ferrugem do eucalipto em campo	114
5.4 Discussão	116
Referências.....	119
6 CONCLUSÕES.....	125
ANEXOS.....	127

RESUMO

Estudo molecular do desenvolvimento de *Puccinia psidii* Winter *in vitro* e no processo de infecção em *Eucalyptus grandis*

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de *Eucalyptus* spp., mas a produção dessa cultura tem sido comprometida por perdas causadas pelo fungo *Puccinia psidii* Winter, agente causal da ferrugem do eucalipto. Compreender os mecanismos moleculares da patogenicidade desse fungo, conhecer a composição química de variedades de *Eucalyptus* spp. resistentes e suscetíveis ao fitopatógeno e ter em mãos uma ferramenta de diagnóstico precoce da doença são conhecimentos de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de controle do fitopatógeno. Uma das principais barreiras que limitam o estudo molecular de *P. psidii* é o fato dessa espécie ser biotrófica obrigatória, tendo seu desenvolvimento *in vitro* limitado. Estudos de investigação a respeito de fungos biotróficos obrigatórios são realizados principalmente *in planta* e em estágios tardios da doença, deixando grande parte do conhecimento dos processos iniciais de infecção desconhecidos. Informações a respeito dos estágios iniciais da infecção, nos quais diversas estruturas típicas são formadas e podem indicar importantes características sobre fungos biotróficos, são de difícil acesso em estudos *in planta* em função da grande quantidade de material vegetal em relação à quantidade de material do fitopatógeno, que não é passível de ser removido completamente das amostras analisadas. Dessa forma, o presente projeto de pesquisa foi realizado com os objetivos de desenvolver um protocolo para induzir a germinação e a morfogênese estrutural *in vitro* de *P. psidii*, identificar genes candidatos relacionados à diferenciação das estruturas de infecção e de fatores de virulência, caracterizar os metabólitos presentes nas ceras cuticulares de folhas de *Eucalyptus grandis* resistentes e suscetíveis à ferrugem do eucalipto e desenvolver uma metodologia sensível e eficaz para detectar, quantificar e monitorar a presença de *P. psidii* em folhas de *Eucalyptus grandis* assintomáticas. Os dados obtidos no presente trabalho podem auxiliar a compreensão da interação planta-patógeno durante os estágios iniciais de infecção da ferrugem e colaboram para o entendimento da biologia do fitopatógeno para que no futuro sejam desenvolvidas melhores estratégias de controle de *P. psidii* em plantios de eucalipto.

Palavras-chave: Ferrugem do eucalipto; Interação planta-patógeno; Diagnose molecular; Ceras cuticulares; Germinação *in vitro*

ABSTRACT

Molecular study of the development of *Puccinia psidii* Winter *in vitro* and during its infection in *Eucalyptus grandis*

Brazilian production of *Eucalyptus* spp. is one of the greatest in the world but it has been affected by *Puccinia psidii* Winter, the causal agent of eucalyptus rust. The comprehension of molecular mechanisms of pathogenicity and chemical composition of resistant and susceptible eucalyptus plants as well as having a molecular tool for early detection of the disease in field can be used for the development of improved control strategies against this phytopathogen. Molecular studies of *P. psidii* is limited because it is an obligate biotrophic fungus with limited *in vitro* development. Biotrophic fungi investigations are made mainly *in planta* at late developmental stages of the disease. This way, most information of early stages of infection as the development of specialized structures of biotrophic fungi are little understood. The study of early stages of the infection process of biotrophic fungi in *planta* is hampered by the high amount of plant material in relation to fungi material which is difficult to be obtained in an isolated form for analysis. In this work we developed a protocol to increase *in vitro* germination and structural differentiation of *P. psidii* and used this protocol to obtain isolated fungi material for the identification of candidate genes related with virulence factors and initial structural morphogenesis. Moreover, we analyzed the composition of metabolites present in the cuticular wax of leaves from resistant and susceptible *E. grandis* plants and developed a methodology for the detection of *P. psidii* in asymptomatic leaves of *Eucalyptus grandis*. Data obtained in this work help the comprehension of *E. grandis*-*P. psidii* interaction at early stages of the infection process and can be used for the development of improved control strategies of eucalyptus rust.

Keywords: Eucalyptus rust; Plant-pathogen interaction; Molecular diagnosis; Cuticular wax; *In vitro* germination

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália e foi introduzido no Brasil por volta de 1886 nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (MORA; GARCIA, 2000). A cultura do eucalipto é o principal protagonista do setor florestal e possui alto valor comercial no Brasil, sendo seu cultivo correspondente a aproximados 5,56 milhões de hectares, o que equivale a 71,9% da área total de florestas plantadas no país (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ, 2015). A ferrugem do eucalipto, doença causada pelo fungo basidiomiceto *Puccinia psidii* Winter, é um grande problema enfrentado nos países tropicais. Aparentemente, o fungo originou-se nas mirtáceas da América do Sul e é muito severo com algumas espécies economicamente importantes de *Eucalyptus* spp. (COUTINHO et al., 1998).

Várias estratégias têm sido utilizadas para o controle da doença no campo. Entre elas estão a aplicação de fungicidas, corte de árvores para rebrota em épocas desfavoráveis à ocorrência da ferrugem e utilização de plantas resistentes ao fitopatógeno. O uso de plantas resistentes é a estratégia de manejo mais aconselhável devido ao baixo custo, praticidade e menor impacto ambiental em função da redução do uso de fungicidas. A seleção de progênies ou clones de eucalipto resistentes à ferrugem tem sido realizada por programas de melhoramento em campos onde a doença é severa ou em condições controladas por meio de infecções artificiais (DE CARVALHO et al., 1998).

A atual impossibilidade do cultivo de *P. psidii* em meio de cultura dificulta responder questões sobre a biologia desse fungo como, entre outras, a respeito dos mecanismos utilizados durante os estágios iniciais de infecção (FIGUEIREDO; PASSADOR, 2008). Na tentativa de elucidar o processo de infecção do fitopatógeno, no presente projeto foram investigados os possíveis genes envolvidos no processo inicial de infecção e os sinais oriundos da planta, principalmente metabólitos presentes nas ceras da cutícula foliar, que provavelmente permitem o patógeno reconhecer o hospedeiro, iniciar sua germinação e, conseqüentemente, seu processo de infecção. Dessa forma, inicialmente foi otimizada a germinação e diferenciação das estruturas típicas de infecção do patógeno *in vitro* pela ação sinérgica de sinais químicos e físicos. Com a otimização da morfogênese do patógeno *in vitro*, foi realizado o estudo da expressão gênica do fungo *P. psidii* durante o estágio inicial de infecção por meio da técnica de RNA-seq de

uredósporos recém germinados e das estruturas típicas de infecção diferenciadas. Também foram caracterizados os sinais químicos que provavelmente influenciam a germinação dos uredósporos, principalmente metabólitos presentes na cera da cutícula foliar das plantas de *E. grandis*, por meio das técnicas de MALDI-TOF e GC-MS. Além disso, uma metodologia para diagnose molecular do fitopatogêno em folhas de *E. grandis* infectadas e assintomáticas foi desenvolvida no presente trabalho visando melhorar as estratégias para o controle e diminuição da dispersão desta grave doença.

Referências

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

DE CARVALHO, A.D.O.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; DO CARMO, M.G.F. Resistance of *Eucalyptus* species, progenies and provenances to *Puccinia psidii* Winter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 139-147, 1998.

FIGUEIREDO, M.B.; PASSADOR, M.M. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, p. 117-134, 2008.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **IBÁ 2015**, Brasília, 2015. 80 p.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **Eucalypt cultivation in Brazil**. São Paulo: Brazilian Society of Silviculture, 2000. 112 p.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção florestal e o gênero *Eucalyptus*

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

No Brasil, a área de árvores plantadas para fins industriais totalizou 7,74 milhões de hectares (0,9% do território nacional) em 2014 e o setor florestal gerou cerca de 4,23 milhões de empregos diretos e indiretos. O setor brasileiro de árvores plantadas foi responsável por 91% de toda a madeira produzida para fins industriais no país e por 1,1% do PIB de 2014, o que corresponde a 60,62 bilhões de reais (IBÁ, 2015). O principal protagonista do setor florestal é o eucalipto, Myrtaceae exótica proveniente da Austrália que se adaptou com grande sucesso às terras brasileiras, sendo que seu plantio ocupa 5,56 milhões de hectares da área de árvores plantadas no país, o que representa 71,9% do total (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ, 2015).

Entre as vantagens do eucalipto sobre as demais espécies estão o rápido crescimento em ciclo de curta rotação e a alta produtividade florestal (MOON et al., 2007), fatores que fomentam o interesse de indústrias, principalmente do segmento de papel e celulose, as quais expandem e direcionam novos investimentos a essa cultura (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2010). Os principais produtos gerados pela atividade florestal no Brasil são celulose, papel, painéis de madeira reconstituída, pisos laminados, painéis compensados, móveis, demais produtos sólidos de madeira, carvão vegetal e outras biomassas para fins energéticos (IBÁ, 2015).

Esses números impressionam e mostram o enorme potencial de crescimento do setor florestal brasileiro para os próximos anos, fato que exigirá, além do aumento da área plantada, um forte crescimento da produtividade das florestas, para manter a vantagem competitiva em relação aos principais produtores mundiais (ABRAF,

2010). Entretanto, esse aumento do plantio favorece o surgimento de várias doenças que causam sérios prejuízos à produção de mudas em jardins clonais e áreas reflorestadas, uma delas é a ferrugem causada por *P. psidii* Winter, uma das doenças mais importantes dessa cultura (COUTINHO et al., 1998).

2.2 A Ferrugem do eucalipto

O patógeno *Puccinia psidii* Winter é um fungo basidiomiceto pertencente à ordem Pucciniales e foi primeiramente descrito por Winter (1884), em goiaba (*Psidium guajava*) no Brasil. *Puccinia psidii* foi reportada pela primeira vez em espécies do gênero *Eucalyptus* por Joffily (1944) e o primeiro surto da doença ocorreu no Espírito Santo em 1973, causando grandes perdas em viveiros e plantios de *E. grandis* com menos de 18 meses de idade (FERREIRA, 1981;1983).

Puccinia psidii é uma ferrugem atípica, pois é capaz de infectar uma grande gama de gêneros (32) e espécies (129) da família Myrtaceae (MORIN et al., 2012). O patógeno já foi registrado em quatro dos cinco continentes, estando em vários países das Américas, Japão, Austrália, China, Nova Caledônia, África do Sul e Indonésia (Tabela 2.1). *Puccinia psidii* é a única ferrugem capaz de infectar *Eucalyptus* spp. e sua ocorrência em *Eucalyptus* spp. foi consequência da inesperada exposição do hospedeiro não nativo (COUTINHO et al., 1998). A ferrugem do eucalipto raramente mata seu hospedeiro, entretanto ataques em viveiros podem causar danos severos, diminuindo o crescimento de plantas jovens em até 60% (DIANESE et al., 1984).

Tabela 2.1 - Continentes e países com detecção da presença do patógeno *Puccinia psidii*

Continente	País	Referência
América		
América do Sul	Argentina	DI FONZO, 1946; ACUÑA; GARRAN, 2004
	Brasil	WINTER, 1884; JOFFLY, 1944
	Colômbia	MAYOR, 1913; CHARDÓN; TORO, 1930
	Equador	STEVENSON, 1926
	Paraguai	SPEGAZZINI, 1884; SPEGAZZINI, 1922
	Uruguai	SPEGAZZINI, 1889; TELECHEA et al., 2003; KOCH DE BROTOS; BOASSO, 1955
	Venezuela	CHARDÓN; TORO, 1934; MENON, 1950
América Central e Ilhas do aribe	Cuba	SEEVER; CHARDÓN, 1926
	Costa Rica	DI STÉFANO et al., 1998
	Dominica	BAKER; DALE, 1948
	República Dominicana	KERN et al., 1933
	El Salvador	CMI, 1987
	Guatemala	SCHIEBER; SÁNCHEZ, 1968
	Jamaica	MACLACHLAN, 1936
	Porto Rico	MACLACHLAN, 1938
Trinidad and Tobago	BAKER; DALE, 1951	
América do Norte e Ilhas do Pacífico	México	LEÓN-GALLEGOS; CUMMINS, 1981; MARLATT; KIMBROUGH, 1979
	Estados Unidos	RAYACHHETRY et al., 2001
	Haváí	UCHIDA et al., 2006
África	África do Sul	ROUX et al., 2013
Ásia	Japão	KAWANISHI, 2009
	Taiwan	WANG, 1992
	China	ZHUANG; WEI, 2011
	Indonésia	MCTAGGART et al., 2016
Oceania	Austrália	CARNEGIE et al., 2010; CARNEGIE et al., 2015
	Nova Caledônia	GIBLIN, 2013

Modificado de Leite (2012).

2.2.1 Sintomas da doença

Em eucaliptos suscetíveis com até dois anos de idade, a doença é caracterizada pelo ataque de folhas jovens em expansão e nas brotações (XAVIER et al., 2001). Os sintomas da doença (Figura 2.1) são lesões que vão do marrom ao

cinza com massas amarelo alaranjadas de uredósporos chamadas de pústulas (GLEN et al., 2007).

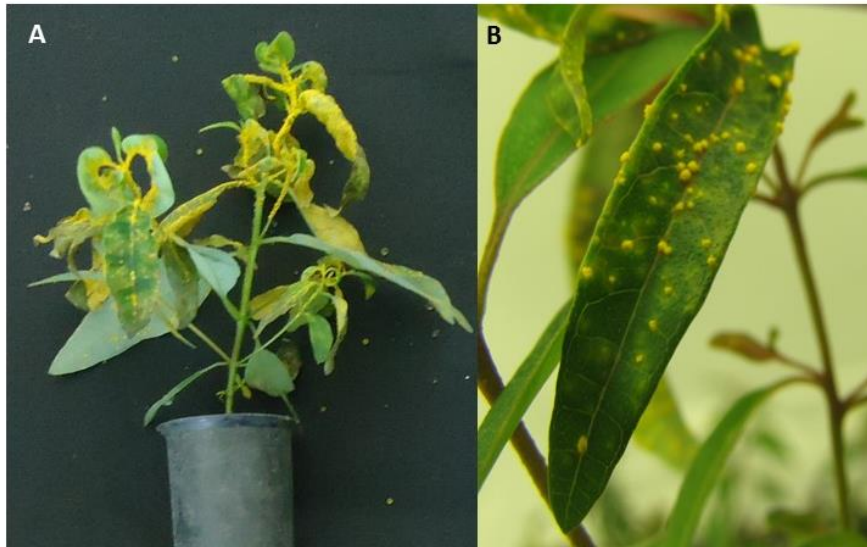


Figura 2.1 - Sintomas da Ferrugem do eucalipto. **A** – Massa de uredósporos nas folhas e brotações. **B** – Pústulas com uredósporos

O progresso e severidade da doença variam de acordo com as condições ambientais, sendo que a infecção por *P. psidii* de árvores mais jovens de genótipos suscetíveis normalmente resulta em lesão foliar, pericimto, distorção de brotos e folhas (TOMMERUP et al., 2003), e ainda pode ocorrer a morte das gemas apicais da planta causando a perda de dominância desses ramos e conferindo aparência de arbusto para o eucalipto (GLEN et al., 2007). Em hospedeiros resistentes, após a infecção, uma reação de hipersensibilidade é induzida e ocorre a formação de lesões necróticas sem esporulação, entretanto, dependendo do nível de resistência da planta, pústulas podem ser formadas ao longo dessas lesões (FERREIRA, 1983; GLEN et al., 2007).

2.2.2 Processo de infecção e desenvolvimento no hospedeiro

O primeiro passo em qualquer interação típica planta-patógeno envolve o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno (FERREIRA et al., 2006). Os principais sinais fornecidos pelo hospedeiro e utilizados no reconhecimento são hidrofobicidade, rigidez, componentes químicos e as propriedades topográficas da superfície da planta (MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996). Ou seja, logo após o

contato dos uredósporos com a superfície do hospedeiro os agentes patogênicos utilizam esses sinais específicos das plantas para induzir sua diferenciação celular (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003).

A partir deste reconhecimento então, o tubo germinativo é formado e uma série de estruturas específicas dos patógenos biotróficos são desenvolvidas (Figura 2.2): (1) apressório utilizado pelo patógeno para gerar pressão e romper a cutícula, uma das barreiras físicas da planta. (2) hifa de penetração que permite a entrada do patógeno no tecido do hospedeiro e o coloca em contato com o ambiente interno da planta. A partir do apressório são formadas, (3) vesícula subestomática, (4) hifas de infecção, (5) células-mãe do haustório e (6) haustório, região de contato íntimo com a célula hospedeira de onde o fungo capta os nutrientes das plantas para se nutrir e multiplicar (FERREIRA et al., 2006).

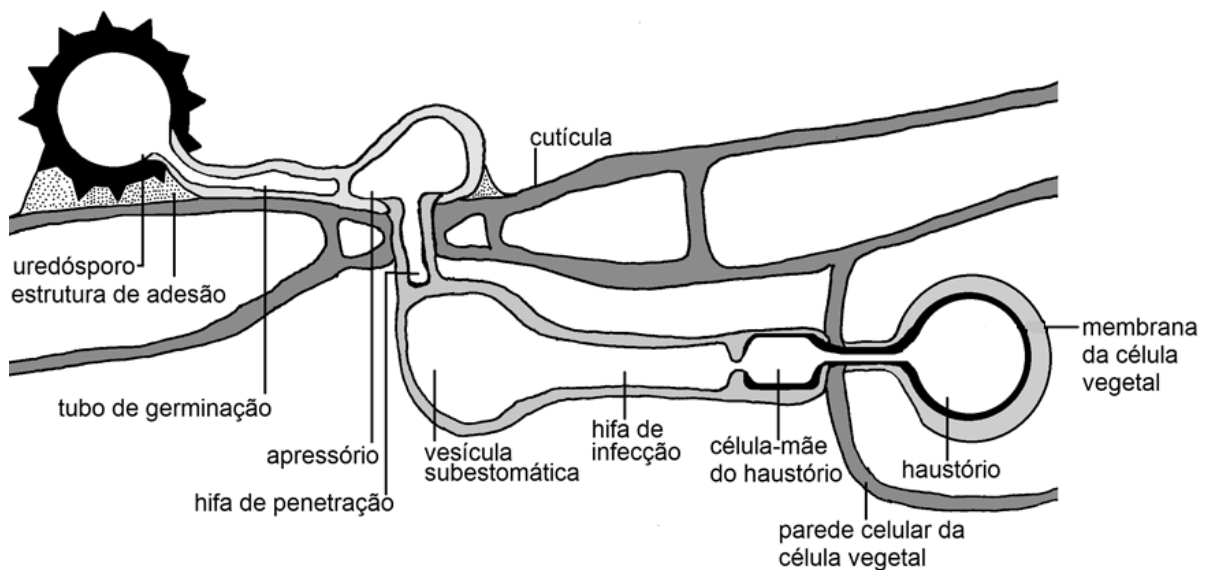


Figura 2.2 - Estruturas de infecção formadas e utilizadas por patógenos biotróficos para infectar o hospedeiro. Figura modificada de Ferreira et al (2006)

Puccinia psidii é um fungo biotrófico e a invasão de suas hifas no tecido do hospedeiro não causa lise direta e morte celular, mas o contato com o plasma celular ocorre, permitindo a transferência de nutrientes da planta para o fungo. Devido a este estilo de vida, o crescimento *in vitro* de *P. psidii* é limitado, e, portanto, sua manutenção em laboratório é feita por meio de inoculação de esporos diretamente na planta hospedeira (FIGUEIREDO; PASSADOR, 2008). Sendo que, em condições controladas a germinação e infecção por urediniosporos acontecem

em maiores taxas em folhas úmidas, no escuro e com temperaturas entre 15 e 25° C (RUIZ et al., 1989).

O desenvolvimento do fungo *P. psidii* em folhas de *Eucalyptus grandis* foi descrito por Xavier et al. (2001) e por Leite (2012) em estudos histopatológicos. Os autores não observaram diferença entre os genótipos susceptíveis e resistentes de *E. grandis* durante o processo de germinação de uredósporos (3-6 horas após inoculação), formação de apressório (6-18 horas após a inoculação) e penetração que se inicia 12 horas após o contato do patógeno com o hospedeiro. Os autores também observaram que a penetração via estômato foi baixa, 7% e 2% em genótipos resistentes e susceptíveis, respectivamente. Os sintomas da doença começaram a aparecer 3 a 5 dias após a inoculação e os uredósporos e as pústulas em 9 a 12 dias após inoculação. Também nos estudos de Xavier et al. (2001) e Leite (2012), não foi observado o avanço da colonização de *P. psidii* nas folhas de *E. grandis* resistentes. E 48 horas após a inoculação, foi possível observar sinais de reação de hipersensibilidade (morte celular) nos genótipos resistentes.

2.3 Interação planta-patógeno

Atualmente muitas das pesquisas moleculares desenvolvidas dentro da fitopatologia têm como objetivo compreender o sistema imune da planta e as ferramentas utilizadas pelos patógenos para subverter o sistema de defesa do hospedeiro (COOK; MESARICH; THOMMA, 2015). As plantas constituem um excelente ecossistema para os microrganismos devido à sua grande diversidade de habitats incluindo a filosfera, rizosfera e endosfera (MONTESINOS et al., 2002; MONTESINOS, 2003).

Dentro dos eucariotos, os fungos compreendem um dos grupos mais importantes de patógenos de plantas (FERREIRA et al., 2006) e exibem 3 estilos de vida principais: (1) Biotróficos, que crescem e se reproduzem em tecidos de plantas vivas, como *P. psidii*; (2) Necrotróficos, que se alimentam de células vegetais mortas; E, (3) Hemibiotróficos, que inicialmente estabelecem uma relação biotrófica com o seu hospedeiro, mas subsequentemente, as células hospedeiras morrem devido ao avanço da infecção (AGRIOS, 2005).

As plantas estão continuamente expostas a uma vasta gama de potenciais agentes patogênicos. No entanto, a condição normal de uma planta é ser saudável e

o desenvolvimento de uma doença exige a ocorrência simultânea de um hospedeiro suscetível, de um patógeno virulento e de um ambiente favorável ao desenvolvimento do patógeno. Ou seja, nenhum patógeno é capaz de infectar todas as plantas, e uma única planta não é susceptível a todos os patógenos. Apenas uma pequena quantidade de patógenos é capaz de invadir a planta hospedeira com sucesso e causar doença, sendo o desenvolvimento das mesmas uma exceção e não uma regra (FERREIRA et al., 2006).

O sistema de defesa das plantas é não circulativo, ou seja, as plantas não possuem células móveis de defesa. Portanto, elas contam com uma imunidade inata de cada célula e com um sistema de sinalização que se inicia nos locais infectados (JONES; DANGL, 2006), também sendo capazes de estabelecer respostas altamente específicas gerando uma memória duradoura contra os patógenos (SPOEL; DONG, 2012).

O patógeno deve superar uma série de obstáculos antes de conseguir causar a doença em seu hospedeiro. A primeira barreira que o patógeno enfrenta em uma interação planta-patógeno é o sistema de defesa pré-formado da planta que é composto por barreiras físicas/estruturais, como mecanismos de escape (estômatos tricomas e ceras cuticulares), parede celular e filamentos de actina do citoesqueleto (MYSORE; RYU, 2004; SPOEL; DONG, 2012), e por barreiras químicas como metabólitos secundários que são produzidos de maneira constitutiva e que podem agir como anti-microbianos e outros metabólitos secundários presentes nas superfícies foliares, ou simplesmente a falta de sítios moleculares para a entrada do agente patogênico (FERREIRA et al., 2006; MARQUES, 2016; MYSORE; RYU, 2004; NÜRNBERGER; LIPKA, 2005). Ou seja, os fatores bioquímicos pré-formados das plantas são provenientes de substâncias presentes nos tecidos saudáveis da planta, incluindo compostos fenólicos, saponinas, glicosídeos cianogênicos, glicosídeos sulfurados, ácidos hidroxicarboxílicos, proteínas, peptídeos antimicrobianos e as fototoxinas (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI, 2011).

Para que o processo de infecção ocorra, a entrada na célula hospedeira ou a penetração através da cutícula e da parede celular da planta representa um passo crítico e crucial para a patogênese da maioria dos fitopatógenos (FERREIRA et al., 2006). Para tanto, os principais sinais utilizados pelos patógenos neste reconhecimento são hidrofobicidade, rigidez, componentes químicos e as

propriedades topográficas da superfície da planta (MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996).

Se um microrganismo patogênico não consegue exceder essa primeira barreira imposta pela planta, isso significa que provavelmente essa planta não é seu hospedeiro e, portanto, ela é resistente a este patógeno. Já que, as relações de virulência de um patógeno a uma planta são bastante específicas (FERREIRA et al., 2006).

A segunda barreira que um patógeno deve ser capaz de ultrapassar na planta são os chamados mecanismos de defesa induzidos. Para explicar esse sistema de defesa, o modelo *zig-zag* (JONES; DANGL, 2006) é amplamente difundido dentro da Fitopatologia. O modelo *zig-zag* prediz uma coevolução contínua entre a planta e o patógeno. Sendo que para cada inovação defensiva estabelecida no hospedeiro, novas maneiras de contornar o sistema imune da planta evoluem no patógeno (FERREIRA et al., 2006).

O modelo *zig-zag* é composto por quatro fases (BENT; MACKEY, 2007; DE LORENZO et al., 2011; JONES; DANGL, 2006). Resumidamente, na fase 1 ocorre a detecção de elicitores (sinais genéricos que indicam a presença do patógeno) que podem ser estruturas ou moléculas provenientes dos próprios microrganismos (*Microbe-Associated Molecular Patterns* – MAMPs ou *Pathogen-Associated Molecular Patterns* – PAMPs) ou compostos derivados do próprio hospedeiro (*Microbe-Induced Molecular Patterns* – MIMPs – ou *Damage-Associated Molecular Patterns* – DAMPs). Estes elicitores são reconhecidos pelos receptores reconhecedores de padrões (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs) das plantas que disparam uma resposta de defesa conhecida como MTI ou PTI (*MAMP-Triggered Immunity* ou *PAMP-Triggered Immunity*), que pode impedir o progresso do patógeno.

Os receptores PRRs são compostos por proteínas transmembranas que possuem um domínio LRR (*Leucine-Rich Repeat*) extracelular e um domínio serina/treonina quinase intracelular. Esta imunidade (PTI ou MTI) é desencadeada pela ativação de vias de sinalização, as cascatas de MAP (*Mitogen-Activated Protein*) quinase, que regulam a atividade de vários substratos, incluindo fatores de transcrição envolvidos na transcrição de genes relacionados à resistência, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), deposição de calose e fechamento de estômatos (HOU et al., 2013).

Na fase 2, patógenos adaptados liberam fatores de virulência, conhecidos como efetores, e interferem na resposta MTI/PTI resultando na supressão da defesa da planta, chamada de ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*). Por vez, essas moléculas efectoras podem ser reconhecidas pela planta de forma direta ou indireta resultando na terceira fase do modelo, conhecida como ETI (*Effector-Triggered Immunity*), uma forma amplificada de PTI, que resulta em resistência à doença por indução de genes ou provoca resposta de hipersensibilidade (HR).

Na fase três os efetores liberados pelo patógeno são reconhecidos pelo hospedeiro através de proteínas *NBS-LRR* (domínio *LRR* somado a um sítio de ligação de nucleotídeo *NBS*) (HOU et al., 2013). E, a HR está associada à morte celular das células hospedeiras infectadas, com o intuito de isolar a região atacada pelo patógeno e impedir o avanço do mesmo (SPOEL; DONG, 2012).

Na fase quatro a pressão de seleção direciona o patógeno a contornar a ETI com novos efetores, permitindo que o patógeno escape da detecção do sistema imune ou suprima as defesas geradas pelo hospedeiro, resultando em uma nova fase ETS (JONES; DANGL, 2006; BENT; MACKEY, 2007; COOK; MESARICH; THOMMA, 2015). Por seleção natural, plantas com capacidade de reconhecer os novos efetores produzidos pelos patógenos são favorecidas, impedindo a ação e desenvolvimento dos mesmos e reestabelecendo a ETI.

Sendo assim, fica claro que essencialmente, existem dois ramos dentro do sistema imunológico induzido das plantas. Um usa receptores reconhecedores de padrões (PRRs) que respondem à evolução lenta microbiana, ou seja, os padrões moleculares associados a agentes patogênicos (MAMPs ou PAMPs), tais como a flagelina de bactérias. E o outro atua em grande parte no interior da célula, utilizando proteínas NB-LRR polimórficas, codificadas por genes R. Efeitores de patógenos, provenientes de diferentes reinos, são reconhecidos por proteínas do tipo NB-LRR e ativam respostas de defesa similares nas plantas. A resistência a doença mediada por proteínas NB-LRR é eficaz contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos (GLAZEBROOK, 2005; JONES; DANGL, 2006).

2.4 Ferramentas para estudo de patógenos biotróficos

2.4.1 Germinação e diferenciação estrutural *in vitro* e o papel das ceras cuticulares

As funções principais da cutícula vegetal são de evitar a perda de água da planta e protegê-la contra infecções e traumas mecânicos. Logo abaixo da cutícula, estão as células vegetais que estão externamente revestidas pela parede celular. Desta forma, a cutícula e a parede celular são as primeiras regiões de contato dos patógenos biotróficos com os seus hospedeiros e representam grandes barreiras estruturais da planta. Enquanto fungos necrotróficos objetivam destruir essas barreiras por meio da ação combinada de enzimas, fungos biotróficos empregam uma degradação mais controlada e localizada a fim de manter as células hospedeiras vivas e absorver seus nutrientes (BELLINCAMPI; CERVONE; LIONETTI, 2014).

Fungos biotróficos adquirem nutrientes das células hospedeiras sem causar a morte delas. Esses patógenos superam a superfície externa da planta por pressão mecânica através do apressório, além de utilizar oxidases, esterases, cutinases, lipases e enzimas degradantes de parede celular (CWDEs), tornando essa estrutura da célula mais frouxa (BELLINCAMPI; CERVONE; LIONETTI, 2014). Ou seja, logo após o contato dos uredósporos com a superfície do hospedeiro os fungos biotróficos utilizam sinais específicos da superfície da planta para induzir sua diferenciação celular e expressar genes de patogenicidade essenciais para o processo de infecção no hospedeiro (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003).

Os uredósporos representam a forma mais comum de esporo observada em diversos tipos de patógenos basidiomicetos causadores de ferrugem, como por exemplo, a ferrugem do trigo causada por *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* (ZHANG et al., 2008). Aparentemente, uma série sofisticada de estruturas de infecção (tubo germinativo, apressório, hifa de penetração, vesícula subestomática, hifas de infecção, células-mãe do haustório e haustório) são pré-requisitos necessários para que fungos biotróficos obrigatórios causadores de ferrugem penetrem, colonizem e obtenham nutrientes a partir do tecido vivo com um mínimo de perturbação da célula hospedeira (WIETHOLTER et al., 2003). Devido a essa relação íntima com as células do hospedeiro, o crescimento *in vitro* desse tipo de patógeno é muito

dispendioso, e, portanto, pouco se sabe sobre os genes envolvidos no estágio inicial de infecção e nos estágios de crescimento de patógenos biotróficos (CHEN et al., 1993; VILLARÉAL et al., 2002; ZHANG et al., 2008).

Para transpor a barreira de crescimento *in vitro* imposta pelos patógenos biotróficos, vários estudos foram realizados e mostraram que os uredósporos de ferrugens em geral, germinam rapidamente na presença de água líquida, produzindo um tubo germinativo fortemente aderido a qualquer superfície hidrofóbica, que simule a cutícula foliar. Além disso, a diferenciação das estruturas de infecção pode ser induzida *in vitro*, quando os sinais físicos e/ou químicos apropriados, são fornecidos ao patógeno (DICKINSON, 1969; HEATH; PERUMALLA, 1988; HOCH; STAPLES, 1987; MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996; WIETHOLTER et al., 2003; WILLIAMS et al, 1967).

Vários sinais físicos e químicos, tais como choque térmico suave (DUNKLE; ALLEN, 1971; EMGE, 1958; MAHESHA; ALLEN; HILDEBRA, 1967), compostos orgânicos (MACKO; RENWICK; RISSLER, 1978), ceras da cutícula do hospedeiro (GRAMBOW, 1977; GRAMBOW; RIEDEL, 1977; TESSMANN; DIANESE, 2002) ou voláteis foliares (COLLINS; MOERSCHBACHER; READ, 2001; GRAMBOW, 1977; GRAMBOW; RIEDEL, 1977; WIETHOLTER et al., 2003) têm sido relatados como compostos que estimulam a germinação e desencadeiam a diferenciação sequencial *in vitro* de patógenos biotróficos.

Estudos recentes mostram que a combinação de sulcos superficiais de tamanhos e espaçamentos apropriados em lâminas, que imitam a superfície foliar, com o álcool volátil trans-2-hexen-1-ol presente em folhas atua de maneira sinérgica para induzir a formação das estruturas de infecção *em P. graminis* f. sp. *tritici* (COLLINS; MOERSCHBACHER; READ, 2001). Além disso, a combinação desses dois estímulos junto a um choque térmico suave levou também a diferenciação da célula mãe do haustório deste mesmo patógeno (WIETHOLTER et al., 2003).

Outros indutores químicos oriundos da planta também têm sido testados para melhor entendimento do desenvolvimento das estruturas de infecção das ferrugens em ambiente úmido, principalmente compostos das cutículas foliares (WIETHOLTER et al., 2003). A superfície das plantas é coberta pela membrana cuticular composta por uma matriz de polímero (cutina) associada a lipídeos, conhecidos por cutícula ou ceras cuticulares (JETTER; SCHÄVER; RIEDERER, 2000). Quando os uredósporos

se instalam sobre as plantas, se deparam primeiramente com essa camada de cera sobre a superfície foliar, conhecida como epicutícula (KOLATTUKUDY et al., 1995).

A quantidade e composição das ceras cuticulares podem variar entre espécies, cultivares e até mesmo dentro da mesma população de uma espécie, bem como devido as condições climáticas as quais a planta está exposta. A cera epicuticular é uma mistura de vários compostos, incluindo os alcanos, aldeídos, ácidos graxos de cadeias longas, álcoois primários e secundários, cetonas, ésteres, triterpenoides e flavonoides (EGLINTON; HAMILTON, 1967; JETTER; SCHÄVER; RIEDERER, 2000; KUNST; SAMUELS, 2013).

A cutícula fornece para a planta proteção mecânica contra a invasão do patógeno, mas, por outro lado, alguns recursos presentes nesta, podem ter efeitos sobre o reconhecimento e a adesão do patógeno ao hospedeiro, permitindo a interação planta-patógeno (HANTÃO et al., 2013; MÜLLER; RIEDERER, 2005; RINGELMANN et al., 2009; ROSTÁS et al., 2008).

A função específica da superfície das plantas em fornecer sinais que influenciam a germinação e o desenvolvimento de patógenos biotróficos tais como oídios, tem sido sugerida por vários autores. Especificamente, os eventos iniciais do processo de infecção, tais como germinação e diferenciação das estruturas típicas de infecção do fungo, parecem ser desencadeados por propriedades específicas da superfície da planta (CARVER et al., 1990; FERREIRA et al., 2006; GNIWOTTA et al., 2005; IWAMOTO et al., 2002; RINGELMANN et al., 2009; TSUBA et al., 2002; ZABKA et al., 2008).

A composição química da cera epicuticular vem se mostrando como um parâmetro importante em diversos estudos que possuem como objetivo avaliar essa estrutura das plantas em relação a perturbações bióticas e abióticas. E para tanto, análises por espectrometria massa (MS), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectroscopia de fluorescência estão sendo utilizadas com objetivo de identificar, quantificar e compreender a relação estrutural e funcional desses componentes presentes nas cutículas foliares dentro dos sistemas biológicos (WENK, 2010).

Dentro deste contexto vários estudos têm sido realizados, e em um deles Tessmann e Dianese (2002) identificaram um hidrocarboneto de cadeia longa, não ramificada ($C_{31}H_{64}$) denominado hentriacontano, proveniente do extrato orgânico da cera cuticular de folhas de jambeiros (*Syzygium jambos*), que funciona como um sinalizador para a germinação *in vitro* de *P. psidii*. Esse composto aumentou a

germinação de uredósporos de *P. psidi* em 88% quando comparados com uredósporos germinados apenas em óleo mineral.

2.4.2 Estudo da expressão gênica do estágio inicial de infecção de patógenos biotróficos

O conhecimento e entendimento dos genes envolvidos no processo inicial de infecção e nos estágios de crescimento de fitopatógenos biotróficos é de fundamental importância para compreensão dos mecanismos de infecção e da interação desses fungos com seus hospedeiros. Além disso, esses conhecimentos podem contribuir para o aprimoramento de estratégias de controle desses organismos por meio, por exemplo, do desenvolvimento de resistência de seus hospedeiros utilizando-se recursos de engenharia genética (TREMBLAY et al., 2011; ZHANG et al., 2008).

Diversas abordagens genômicas, tais como etiquetas de sequências expressas (ESTs) (ADAMS et al., 1995) e análise serial da expressão gênica (SAGE) (VELCULESCU et al., 1995), foram amplamente empregadas no estudo de expressão gênica de diversos organismos. A análise de ESTs foi o primeiro método usado para a identificação rápida de genes expressos (ADAMS et al., 1995) e tem sido utilizada para identificar genes expressos em vários tecidos, tipos celulares ou estádios de desenvolvimento em diferentes organismos (BROEKER; BERNARD; MOERSCHBACHER, 2006; OGIHARA et al., 2003).

Análises por ESTs foram realizadas para alguns fungos causadores de ferrugem. Por exemplo, para analisar a expressão gênica durante a infecção de feijão-fava por *Uromyces fabae*, Hahn e Mendgen (1997) sequenciaram ESTs de haustórios purificados e observaram uma grande mudança na expressão gênica entre a fase de infecção inicial dos uredósporos e o estágio de crescimento biotrófico deste patógeno (JAKUPOVIĆ et al., 2006).

Para *P. triticina*, agente causal da ferrugem da folha do trigo, um total de 25.558 ESTs foram gerados a partir de 13 bibliotecas de cDNA representando várias fases do desenvolvimento desse patógeno (incluindo uredósporos não germinados, germinados ou apressório e haustório) durante a infecção de plantas suscetíveis e resistentes de trigo. As taxas de anotação dos ESTs no estudo foram baixas (4% para uredósporos germinados e 2% para apressórios), mas, mesmo assim, os

autores conseguiram observar a expressão de genes distintos nos diversos estágios de germinação do patógeno, sugerindo uma reprogramação drástica do transcriptoma desse fungo durante os principais processos de diferenciação do patógeno (HU et al., 2007).

No estudo de Zhang et al. (2008), foi gerada uma biblioteca de cDNA a partir de esporos de *P. striiformis* f. sp. *tritici* germinados *in vitro* (esporos coletados após 10 h de incubação com tubos germinativos formados). Um total de 4.798 ESTs sequenciados produziram 1.118 sequências únicas. A maioria dos ESTs (>60%) não tinham homólogos significativos no GenBank, com a indicação de que muitos deles podem representar genes únicos para *P. striiformis* f. sp. *tritici*. Vários destes ESTs partilharam homologia significativa com fatores conhecidos de patogenicidade e virulência de fungos, tais como o HESP767 da ferrugem do linho e PMK1 da brusone do arroz. O nível de transcrição elevado de seis genes selecionados dos uredósporos recém-germinados foi confirmado por qPCR, sugerindo que alguns destes genes altamente expressos em uredósporos recém germinados, *in vitro*, podem ser importantes para os processos iniciais de infecção em *P. striiformis* f. sp. *tritici*.

Com o aparecimento das tecnologias de sequenciamento de última geração, os estudos de expressão gênica passaram a ser conduzidos recentemente pela técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq) (METZKER et al., 2010; ROTHBERG et al., 2008). Trabalhos recentes relatam o uso de RNA-Seq (Illumina ou pirosequenciamento) para obter informações sobre os transcriptomas de associações planta-microrganismo. Usando o genoma do próprio organismo ou de organismos filogeneticamente relacionados como referência, os autores foram capazes de discriminar os transcritos microbianos e os transcritos do hospedeiro (FERNANDEZ et al., 2012; KEMEN et al., 2011; TISSERANT et al., 2011).

Para patógenos biotróficos o uso dessas tecnologias ainda é incipiente, porém vários estudos já revelam resultados interessantes. Tremblay et al. (2011) utilizaram essa técnica para estudo da expressão gênica de *Phakopsora pachyrhizi* no estágio tardio da interação ferrugem-soja. A análise do RNA-seq realizado com a plataforma Illumina foi feita para identificação de genes expressos por *P. pachyrhizi* durante a interação deste fungo biotrófico com plantas de soja 10 dias após a inoculação. Aproximadamente 32.940 *contigs* que representavam potenciais genes de *P. pachyrhizi* foram mapeados contra bancos de dados de ESTs, proteínas e

domínio conservados. Cerca de 7.500 *contigs* representaram sequências recém-descobertas de *P. pachyrhizi*. Destes, 527 apresentaram similaridade para genes de fungos que codificam para proteínas envolvidas em diferentes vias metabólicas tais como metabolismo do glicogênio e da galactose, glicólise, ciclo do ácido cítrico, metabolismo de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos, proteólise, síntese de proteínas, divisão do ciclo celular e mitose e biogênese da parede celular. Os autores concluíram que essas informações podem ser úteis para o desenvolvimento de novos métodos de ampliação de resistência da soja à *P. pachyrhizi*, incluindo o silenciamento de genes importantes para a sobrevivência de *P. pachyrhizi* e também para compreender a base dos mecanismos moleculares da interação soja-*P. pachyrhizi*.

Petre et al. (2012) utilizaram o pirossequenciamento para analisar o transcriptoma dos estágios iniciais de colonização da folha de *Populus trichocarpa* pelo fungo *Melampsora larici-populina*, causador da ferrugem. O estudo teve como finalidade identificar os efetores expressos no início do processo de infecção pelo patógeno e os genes que modulam precocemente as funções do hospedeiro, fatores considerados atualmente elementos-chave para compreensão da base molecular da biotrofia (HOK et al., 2010; PANSTRUGA et al., 2009). Entre os 841.301 *reads* considerados para análise, 616.879 foram mapeados consistentemente com sequências do genoma de *Populus trichocarpa* e 649 *reads* com sequências de *Melampsora larici-populina*. Os resultados mostraram que o uso do RNA-seq para estudo do estágio inicial de infecção do patógeno *in planta* não foi apropriado para analisar o acúmulo de transcritos do agente patogênico, visto que os transcritos do fungo foram mascarados pelos transcritos das células vegetais que se apresentavam em maior abundância. Sendo assim, apenas 19 transcritos do patógeno codificando para pequenas proteínas secretoras foram identificados, representando efetores candidatos de interesse para estudos futuros (PETRE et al., 2012).

2.4.3 PCR em tempo real para diagnose de doenças em plantas

Avanços na biologia molecular em particular, a Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), tem oferecido novas oportunidades para detecção, quantificação, identificação e monitoramento de patógenos no interior de

seus hospedeiros, auxiliando no diagnóstico de doenças em plantas (YAN et al., 2008; SANZANI et al., 2014; ARIF et al., 2014).

O elevado nível de sensibilidade desta técnica permite a quantificação da infecção em níveis muito baixos, que podem corresponder à quantidade de patógeno presente no início da infecção ou durante as infecções latentes, não sintomáticas. Como consequência, o qPCR permite a quantificação do patógeno acumulado ao longo de todo o ciclo da doença e permite um exame detalhado de todos os estádios da infecção no material vegetal (DEMONTIS et al., 2007; COVARELLI et al., 2012; SANZANI et al., 2014).

Devido a utilização de fluorescência, a técnica de qPCR se mostra até 100 vezes mais sensível que o PCR convencional e tem resolução suficiente para detectar um único esporo fúngico (ARIF et al., 2014), como já relatado em *Glomus intraradices* (ALKAN et al., 2004). Alaei et al (2009) desenvolveram pares de primers específicos para a região ITS e detectaram o patógeno *P. horiana* no tecido do hospedeiro imediatamente após sua inoculação. A região ITS também foi utilizada para detectar *P. horiana* após 3 dias de infecção, sendo que o PCR em tempo real foi 100 vezes mais sensível do que o PCR convencional (PEDLEY, 2009).

Vários trabalhos têm descrito a utilização do qPCR para auxiliar no diagnóstico precoce de doenças causadas por fungos em plantas, como: *Melampsora* spp. em *Populus* (BOYLE et al., 2005); *Cladosporium fulvum* em tomateiro (YAN et al., 2008); *Puccinia polysora* e *Puccinia sorghi* em milho (CROUCH; SZABO, 2011); *Puccinia pelargonii-zonalis* em gerânio (SCOCCO et al., 2013); *Phymatotrichopsis omnivora* em algodão (ARIF et al., 2014) e *Phytophthora colocasiae* em inhame-coco (NATH et al. 2014).

A detecção precoce e quantificação do patógeno propiciam um diagnóstico mais rápido e preciso da doença na cultura, que é fundamental para auxiliar na implementação de tomadas de decisão durante o manejo de diversas doenças (SANZANI et al., 2014), reduzindo assim as perdas na produção (LANGRELL; GLEN; ALFENAS, 2008). Além disso a detecção precoce de patógenos pode ser utilizada para fins fitossanitários, como por exemplo, a certificação de materiais vegetais livres da doença (SANZANI et al., 2014; YAN et al., 2008).

Referências

- ADAMS, M.; KERLAVAGE, A.R.; FLEISCHMANN, R.D.; FULDNER, R.A.; BULT, C.J.; LEE, N.H.; KIRKNESS, E.F.; WEINSTOCK, K.G.; GOCAYNE, J.D.; WHITE, O. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, London, v. 377, n. 6547, p. 3-174, 1995.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. V. 5.
- ALAEI, H.; BAEVEN, S.; MAES, M.; HOFTE, M.; HEUNGENS, K. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 136-145, 2009.
- ALKAN, N.; GADKAR, V.; COBURN, J.; YARDEN, O.; KAPULNIK, Y. Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain reaction. **New Phytologist**, Oxford, v. 161, n. 3, p. 877-885, 2004.
- ARIF, M.; DOBHAL, S.; GARRIDO, P.A.; ORQUERA, G.K.; ESPÍNDOLA, A.S.; YOUNG, C.A.; OCHOA-CORONA, F.M.; MAREK, S.M.; GARZÓN, C.D. Highly sensitive end-point PCR and SYBR Green qPCR detection of *Phymatotrichopsis omnivora*, causal fungus of cotton root rot. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 9, p. 1205-1212, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS-ABRAF. **Anuário estatístico**. Brasília, 2010. 136 p.
- BELLINCAMPI, D.; CERVONE, F.; LIONETTI, V. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1-8, 2014.
- BENT, A.F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 399-436, 2007.
- BOYLE, B.; HAMELIN, R. C.; SÉGUIN, A. *In vivo* monitoring of obligate biotrophic pathogen growth by kinetic PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1546-1552, 2005.
- BROEKER, K.; BERNARD, F.; MOERSCHBACHER, B.M. An EST library from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* reveals genes potentially involved in fungal differentiation. **FEMS Microbiology Letters**, Hoboken, v. 256, n. 2, p. 273-281, 2006.
- CARVER, T.L.W.; INGERSON-MORRIS, S.M.; THOMAS, B.J. Early interactions during powdery mildew infection. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 632-639, 1995.

CHEN, X.; LINE, R.F.; LEUNG, H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1489-1496, 1993.

COLLINS, T.J.; MOERSCHBACHER, B.M.; READ, N.D. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, n. 6, p. 259-266, 2001.

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

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

COVARELLI, L.; BECCARI, G.; STEED, A.; NICHOLSON, P. Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. **Plant Pathology**, Hoboken, v. 61, n. 6, p. 1121-1129, 2012.

CROUCH, J. A.; SZABO, L.J. Real-time PCR detection and discrimination of the southern and common corn rust pathogens *Puccinia polysora* and *Puccinia sorghi*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 6, p. 624-632, 2011.

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

DEMONTIS, M.A.; CACCIOLA, S.O.; ORRU, M.; BALMAS, V.; CHESSA, V.; MASERTI, B.E.; MASCIA, L.; RAUDINO, F.; DI SAN LIO, G.M.; MIGHELI, Q. Development of real-time PCR systems based on SYBR[®] Green I and TaqMan[®] technologies for specific quantitative detection of *Phoma tracheiphila* in infected Citrus. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, n. 4, p. 339-351, 2008.

DIANESE, J.C.; MORAES, T.S.A.; 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.

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 66, n. 1, p. 38-49, 1969.

DUNKLE, L.D.; ALLEN, P.J. Infection structure differentiation by wheat stem rust uredospores in suspension. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 649-652, 1971.

EGLINTON, G.; HAMILTON, R.J. Leaf epicuticular waxes. **Science**, Washington, v. 156, n. 3780, p. 1322-1335, 1967.

EMGE, R.G. The influence of light and temperature on the formation of infection-type structures of *Puccinia graminis* var. *tritici* on artificial substrates. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 48, n. 12, p. 649-652, 1958.

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

FERNANDEZ, D.; TISSERANT, E.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.; VIEIRA, A.; PETITOT, A-S.; LOUREIRO, A.; POULAIN, J.; SILVA, C.; SILVA, M.C.; DUPLESSIS, S. Pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals *in planta*-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions reveals in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 1, p. 17-37, 2012.

FERREIRA, F.A. Eucalyptus rust - occurrence, temperature for the germination of urediniospores, the production of teliospores, alternative hosts and resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 603-604, 1981.

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

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A.R. Fungal pathogens: the battle for plant infection. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 25, n. 6, p. 505-524, 2006.

FIGUEIREDO, M.B.; PASSADOR, M.M. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, p. 117-134, 2008

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

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

GNIWOTTA, F.; VOGG, G.; GARTMANN, V.; CARVER, T.L.W.; RIEDERER, M.; JETTER, R. What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. **Plant Physiology**, Washington, v. 139, n. 1, p. 519-531, 2005.

GRAMBOW, H.J. The influence of volatile leaf constituents on the *in vitro* differentiation and growth of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 85, n. 4, p. 361-372, 1977.

GRAMBOW, H.J.; RIEDEL, S. The effect of morphogenically active factors from host and nonhost plants on the *in vitro* differentiation of infection structures of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 213-224, 1977.

HAHN, M.; MENDGEN, K. Characterization of in planta-induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, n. 4, p. 427-437, 1997.

HANTÃO, L.W.; TOLEDO, B.R.; DE LIMA RIBEIRO, F.A.; PIZETTA, M.; PIEROZZI, C.G.; FURTADO, E.L.; AUGUSTO, F. Comprehensive two-dimensional gas chromatography combined to multivariate data analysis for detection of disease-resistant clones of Eucalyptus. **Talanta**, Amsterdam, v. 116, p. 1079-1084, 2013.

HEATH, M.C.; PERUMALLA, C.J. Haustorial mother cell development by *Uromyces vignae* on collodion membranes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, n. 4, p. 736-741, 1988.

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

HOCH, H.C.; STAPLES, R.C. Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 231-247, 1987.

HOK, S.; ATTARD, A.; KELLER, H. Getting the most from the host: How pathogens force plants to cooperate in disease. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, n. 10, p. 1253-1259, 2010.

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

HU, G.G.; LINNING, R.; MCCALLUM, B.; BANKS, T.; CLOUTIER, S.; BUTTERFIELD, Y.; LIU, J.; KIRKPATRICK, R.; STOTT, J.; YANG, G.; SMAILUS, D.; JONES, S.; MARRA, M.; SCHEIN, J.; BAKKEREN, G. Generation of a wheat leaf rust, *Puccinia triticina*, EST database from stage-specific cDNA libraries. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 4, p. 451-467, 2007.

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

_____. **IBÁ 2015**, Brasília, 2015. 80 p.

IWAMOTO, M.; TAKEUCHI, Y.; TAKADA, Y.; YAMAOKA, N. Coleoptile surface cuticle of barley is involved in survival and penetration of *Blumeria graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 1, p. 31-38, 2002.

JAKUPOVIĆ, M.; HEINTZ, M.; REICHMANN, P.; MENDGEN, K.; HAHN, M. Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, n. 1, p. 8-19, 2006.

JETTER, R.; SCHÄVER, S.; RIEDERER, M. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 619-628, 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.

KEMEN, E.; GARDINER, A.; SCHULTZ-LARSEN, T.; KEMEN, A.C.; BALMUTH, A.L.; ROBERT-SEILANIANTZ, A.; BAILEY, K.; HOLUB, E.; STUDHOLME, D.J.; MACLEAN, D.; JONES, J.D.G. Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of *Arabidopsis thaliana*. **Plos Biology**, San Francisco, v.9, n. 7, p. e1001094, 2011.

KOLATTUKUDY, P.E.; ROGERS, L.M.; LI, D.; HWANG, C.S; FLAISHMAN, M.A. Surface signaling in pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 10, p. 4080-4087, 1995.

KUNST, L.; SAMUELS, A.L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 51-80, 2003.

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

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

MACKO, V.; RENWICK, J.A.A.; RISSLER, J.F. Acrolein induces differentiation of infection structures in the wheat stem rust fungus. **Science**, Washington, v. 199, N. 4327, p. 442-443, 1978.

MAHESHWAR, R.; ALLEN, P.J.; HILDEBRA, A.C. Physical and chemical factors controlling the development of infection structures from urediospore germ tubes of rust fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 8, p. 855-862, 1967.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n.1, p. 367-386, 1996.

MARQUES, F.G. **Análise de metabólitos e proteínas totais em folhas de *Eucalyptus grandis* durante a infecção por *Puccinia psidii***. 2016. 120p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

METZKER, M.L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

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

MORIN, L.; AVEYARD, R.; LIDBETTER, J.R.; WILSON, P.G. Investigating the host-range of the rust fungus *Puccinia psidii* sensu lato across tribes of the family myrtaceae present in Australia. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e35434, 2012.

MÜLLER, C.; RIEDERER, M. Plant surface properties in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 11, p. 2621-2651, 2005.

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

NATH, V.S.; HEGDE, V.M.; JEEVA, M.L.; MISRA, R.S.; VEENA, S.S.; RAJ, M.; UNNIKRISHNAN, S.K.; DARVEEKARAN, S.S. Rapid and sensitive detection of *Phytophthora colocasiae* responsible for the taro leaf blight using conventional and real-time PCR assay. **FEMS Microbiology Letters**, Hoboken, v. 352, n. 2, p. 174-183, 2014.

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

OGIHARA, Y.; MOCHIDA, K.; NEMOTO, Y.; MURAI, K.; YAMAZAKI, Y.; SHIN-I, T.; KOHARA, Y. Correlated clustering and virtual display of gene expression patterns in the wheat life cycle by large-scale statistical analyses of expressed sequence tags. **The Plant Journal**, Malden, v. 33, p. 1001-1011, 2003.

PANSTRUGA, R.; DODDS, P.N. Terrific protein traffic: The mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. **Science**, Washington, v. 324, n. 5928, p. 748-750, 2009.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1, cap. 35, p. 593-636.

PEDLEY, K.F. PCR-based assays for the detection of *Puccinia horiana* on *Chrysanthemums*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 12, p. 1252-1258, 2009.

PETRE, B.; MORIN, E.; TISSERANT, E.; HACQUARD, S.; DA SILVA, C.; POULAIN, J.; DELARUELLE, C.; MARTIN, F.; ROUHIER, N.; KOHLER, A.; DUPLESSIS, S. RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* Uncovers PtSultr3; 5, a fungal-induced host sulfate transporter. **Plos One**, San Francisco, v.7, n. 8, p. e44408, 2012.

RINGELMANN, A.; RIEDEL, M.; RIEDERER, M.; HILDEBRANDT, U. Two sides of a leaf blade: *Blumeria graminis* needs chemical cues in cuticular waxes of *Lolium perenne* for germination and differentiation. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 1, p. 95-105, 2009.

ROSTÁS, M.; RUF, D.; ZABKA, V.; HILDEBRANDT, U. Plant surface wax affects parasitoid's response to host footprints. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 95, n. 10, p. 997-1002, 2008.

ROTHBERG, J.M.; LEAMON, J.H. The development and impact of 454 sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 10, p. 1117-1124, 2008.

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

SANZANI, S.M.; LI DESTRI NICOSIA, M.G.; FAEDDA, R.; CACCIOLA, S.O.; SCHENA, L. Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and oomycetes in environmental samples. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 162, n. 1, p. 1-13, 2014.

SCOCCO, E.A.; WALCOTT, R.R.; JEFFERS, S.N.; BUCK, J.W. Detection of *Puccinia pelargonii-zonalis*-infected geranium tissues and urediniospores. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 161, n. 5, p. 341-347, 2013.

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

TESSMANN, D.J.; DIANESE, J.C. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 538-542, 2002.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 4, p. 351-357, 2003.

TISSERANT, E.; KOHLER, A.; DOZOLME-SEDDAS, P.; BALESTRINI, R.; BENABDELLAH, K.; COLARD, A.; CROLL, D.; DA SILVA, C.; GOMEZ, S.K.; KOUL, R.; FERROL, N.; FIORILLI, V.; FORMEY, D.; FRANKEN, PH.; HELBER, N.; HIJRI, M.; LANFRANCO, L.; LINDQUIST, E.; LIU, Y.; MALBREIL, M.; MORIN, E.; POULAIN, J.; SHAPIRO, H.; VAN TUINEN, D.; WASCHKE, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BÉCARD, G.; BONFANTE, P.; HARRISON, M.J.; KÜSTER, H.; LAMMERS, P.; PASZKOWSKI, U.; REQUENA, N.; RENSING, S.A.; ROUX, C.; SANDERS, I.R.; SHACHAR-HILL, Y.; TUSKAN, G.; YOUNG, J.P.W.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARTIN, F. The transcriptome of the arbustular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligat symbiont. **New Phytologist**, Cambridge, v. 193, n. 3, p. 755-769, 2011.

TOMMERUP, I.C.; ALFENAS, A.C.; OLD, K.M. Guava rust in Brazil - a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, v. 33, n. 3, p. 420-428, 2003.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; LI, S.; ALKHAROUF, N.W.; MATTHEWS, B.F. Identification of genes expressed by *Phakopsora pachyrhizi*, the pathogen causing soybean rust, at a late stage of infection of susceptible soybean leaves. **Plant Pathology**, Malden, v. 61, n. 4, p. 773-786, 2011.

TSUBA, M.; KATAGIRI, C.; TAKEUCHI, Y.; TAKADA, Y.; YAMAOKA, N. Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 2, p. 51-57, 2002.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, n. 5235, p. 484, 1995.

VILLARÉAL, L.M.M.A.; LANNOU, C.; DE VALLAVIEILLE-POPE, C.; NEEMA, C. Genetic variability in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* populations sampled on a local scale during natural epidemics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6138-6145, 2002.

WENK, M.R. Lipidomics: new tools and applications. **Cell**, Cambridge, v. 143, n. 6, p. 888-895, 2010.

WIETHOLTER, N.; HORN, S.; REISIGE, K.; BEIKE, U.; MOERSCHBACHER, B.M. *In vitro* differentiation of haustorial mother cells of the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, triggered by the synergistic action of chemical and physical signals. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 3, p. 320-326, 2003.

WILLIAMS, P.G.; SCOTT, K.J.; KUHL, J.L.; MACLEAN, D.J. Sporulation and pathogenicity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* grown on an artificial medium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 3, p. 326-327, 1967.

WINTER, G. Repertorium. Rabenhorstii fungi europaei et extraeuraopaei. Centuria XXXI et XXXII. **Hedwigia**, v. 23, p.164-175, 1884.

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

YAN, L.; ZHANG, C.; DING, L.; MA, Z. Development of a real-time PCR assay for the detection of *Cladosporium fulvum* in tomato leaves. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 5, p. 1417-1424, 2008.

ZABKA, V.; STANGL, M.; BRINGMANN, G.; RIEDERER, M.; VOGG, G.; HILDEBRANDT, U. Host surface properties affect pre-penetration processes in the barley powdery mildew fungus. **New Phytologist**, Cambridge, v. 177, n. 1, p. 251-263, 2008.

ZHANG, Y.; QU, Z.; ZHENG, W.; LIU, B.; WANG, X.; XUE, X.; XU, L.; HUANG, L.; HAN, Q.; ZHAO, J.; KANG, Z. Stage-specific gene expression during urediniospore germination in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **BMC Genomics**, London, v. 9:203, 2008.

3 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* E ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ESTRUTURAS INICIAIS DE INFECÇÃO DO FITOPATÓGENO *Puccinia psidii* Winter, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DO EUCALIPTO

Resumo

Fungos causadores da ferrugem são patógenos biotróficos obrigatórios intimamente associados ao hospedeiro. *Puccinia psidii* Winter é o agente causal da ferrugem do eucalipto e é responsável por significativas perdas econômicas dessa cultura no Brasil e no mundo. Devido ao seu estilo de vida biotrófico, várias estratégias vêm sendo adotadas para aprimorar o processo de germinação e diferenciação *in vitro* dos seus uredósporos, visando facilitar estudos moleculares. Assim, os objetivos do presente estudo, foram desenvolver uma metodologia eficiente para induzir a germinação e diferenciação *in vitro* das estruturas iniciais de infecção de *P. psidii*, por meio da exposição de uredósporos do patógeno a diferentes estímulos químicos e físicos que simulem a planta hospedeira. E, posteriormente investigar os possíveis genes de *P. psidii* que estão envolvidos no processo de desenvolvimento deste patógeno e nos estágios iniciais da infecção, utilizando a técnica de RNA-seq. A combinação do meio ágar-água acrescido de azeite de oliva permitiu altas taxas de germinação dos uredósporos do patógeno (~87%). E, juntamente com uma membrana de diálise foi possível formar duas estruturas iniciais do processo de infecção: apressório e hifa de penetração. A análise dos transcritos diferencialmente expressos durante o processo de germinação e diferenciação *in vitro* dos uredósporos revelou que alguns transcritos codificam para proteínas de fungos patogênicos como efetores, proteases, proteassomos, quitinases e lipases. Essas proteínas são descritas na literatura como fatores de virulência e enzimas envolvidas na degradação da parede celular do hospedeiro e no crescimento do patógeno. E, portanto, estão diretamente relacionadas com a ativação do mecanismo de reconhecimento, germinação e processo inicial de interação do patógeno com a planta. A metodologia de diferenciação *in vitro* desenvolvida e a análise diferencial dos transcritos de *P. psidii* representam um grande avanço para o entendimento da biologia desse patógeno e do processo inicial de infecção no qual ele está envolvido, colaborando para um melhor entendimento da interação planta-patógeno.

Palavras-chave: Germinação; Apressório; Hifa de penetração; RNA-seq; Análise de transcritos; Fatores de virulência

Abstract

Significant losses in production are observed when *Puccinia psidii*, the causal agent of eucalyptus rust, infects eucalyptus plantations. This fungus has an obligate biotrophic lifestyle with limited *in vitro* germination and cell differentiation. Molecular approaches can be useful for the understanding of the biology of *P. psidii* however, techniques for *in vitro* cultivation of this fungi are required. We tested different chemical and physical signs to induce *in vitro* germination and cell differentiation of *P. psidii* to obtain pathogen cells free from its host for RNA-seq. An agar-water medium containing olive oil and a dialysis membrane resulted in the germination of *P. psidii*

uredospores (~87%) and the formation of aplerium and penetration hyphae after 24 hours of incubation. RNA-seq analysis of *P. psidii* cultivated *in vitro* revealed some differentially expressed transcripts and the putative involvement of transcripts that code for effectors, proteases, proteasomes, chitinases and lipases during the initial steps of infection of *P. psidii*. Some of the proteins coded by these transcripts are known to be involved in pathogenesis of a variety of fungi as factors for host recognition, uredospores germination, pathogen virulence, host cell wall lysis, and pathogen growth during the initial steps of host colonization. The method for *in vitro* cultivation and the analysis of the transcripts of *P. psidii* presented in this work contribute for a better understanding of a part of the biology of this important pathogen.

Keywords: Germination; Aplerium; Penetration hyphae; RNA-seq; Transcripts analysis; Pathogen virulence

3.1 Introdução

A cultura do eucalipto possui alto valor comercial no Brasil e seu cultivo corresponde atualmente a aproximadamente 5,56 milhões de hectares, o equivalente a 71,9% da área total de florestas plantadas (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ, 2015). A ferrugem, doença causada pelo fungo basidiomiceto *Puccinia psidii* Winter, é um grande problema nos países tropicais. Aparentemente, o fungo originou-se nas mirtáceas da América do Sul e é muito agressivo em algumas espécies economicamente importantes de *Eucalyptus* spp. (COUTINHO et al., 1998). *Puccinia psidii* afeta *Eucalyptus* spp. em diferentes graus de severidade, sendo os clones de *Eucalyptus grandis* um dos mais suscetíveis (DIANESE et al., 1984).

Durante um bom período, a maior parte dos estudos envolvendo *P. psidii* haviam sido focados sobre a identificação de raças fisiológicas, variação de virulência e ultra-estrutural e também exames histológicos (GLEN et al., 2007; LEITE et al., 2013; XAVIER et al., 2001). Ao contrário de outras ferrugens, como *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, o estágio sexual de *P. psidii* é raro de ser encontrado na natureza, sendo os uredósporos a forma de esporos mais comum observada (GLEN et al., 2007). Os uredósporos do patógeno são estritamente dependentes das células vivas do hospedeiro para germinar, crescer e se multiplicar. Estas características biológicas tornam estudos moleculares e genéticos de *P. psidii* mais difíceis. Embora muito avanços foram alcançados em pesquisas sobre a diversidade genética, estrutura da população de *P. psidii* e interação com o hospedeiro (GLEN et

al., 2007; QUECINE et al., 2014; QUECINE et al., 2016; MARQUES, 2016; SANDHU, et al., 2016), conhecimentos sobre a biologia das ferrugens e os genes envolvidos no processo inicial de infecção e crescimento destes patógenos ainda são limitados (CHEN et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 2008; LORYS et al., 2002; ZHANG et al., 2008).

Estruturas sofisticadas de infecção, como tubo germinativo, apressório, hifa de penetração, vesícula subestomática, hifas de infecção, células-mãe do haustório e haustório, são necessárias para que fungos biotróficos causadores de ferrugem penetrem, colonizem e obtenham nutrientes a partir do tecido vivo, causando o mínimo de perturbação da célula hospedeira (WIETHOLTER et al., 2003). Para transpor a barreira de crescimento *in vitro* imposta pelos patógenos biotróficos, vários estudos foram realizados e mostraram que os uredósporos de ferrugens em geral, germinam rapidamente na presença de água líquida, produzindo um tubo germinativo fortemente aderido a qualquer superfície hidrofóbica, que simule a cutícula foliar. Além disso, a diferenciação das estruturas de infecção pode ser induzida *in vitro*, quando sinais físicos e/ou químicos apropriados são fornecidos ao patógeno (DICKINSON, 1969; HEATH; PERUMALLA, 1988; HOCH; STAPLES, 1987; MENDGEN; HAHN; DEISING., 1996; WIETHOLTER et al., 2003; WILLIAMS et al., 1967).

Várias abordagens genômicas, tais como etiquetas de sequências expressas (ESTs) (ADAMS et al., 1995) e análise serial da expressão gênica (SAGE) (VELCULESCU et al., 1995), foram amplamente empregadas no estudo de expressão gênica de diversos organismos, incluindo as ferrugens *Uromyces fabae* (JAKUPOVIC et al., 2006), *Puccinia triticina* (HU et al., 2007) e *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (ZHANG ET AL., 2008). Com o aparecimento das tecnologias de sequenciamento de última geração, os estudos de expressão gênica passaram a ser conduzidos recentemente pela técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq) (METZKER et al., 2010; ROTHBERG; LEAMON., 2008). Trabalhos recentes relatam o uso do RNA-Seq (Illumina ou pirosequenciamento) para obter informações sobre os transcriptomas de associações planta-microrganismo (FERNANDEZ et al., 2012; KEMEN et al., 2011; TISSERANT et al., 2011) e de estruturas de patógenos de plantas diferenciadas *in vitro* (O'CONNELL et al., 2012).

Na tentativa de compreender os mecanismos de germinação e infecção inicial de *P. psidii*, o presente estudo visou investigar os possíveis genes de *P. psidii* que

estão envolvidos nos estágios iniciais do desenvolvimento *in vitro* deste patógeno. Dessa forma, foi desenvolvida uma metodologia eficiente para a germinação e diferenciação de algumas estruturas típicas de infecção do patógeno *in vitro* pela ação sinérgica de sinais químicos e físicos e logo após, foram realizadas a extração, sequenciamento do RNA e a análise dos transcritos relacionados ao desenvolvimento *in vitro* de *P. psidii*.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Material Biológico

No presente trabalho foram utilizados uredósporos de *P. psidii* do isolado monopustular MF-1 (LEITE et al., 2013) pertencente ao Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. Plântulas de *E. grandis* progênie D901, altamente susceptíveis ao patógeno *P. psidii* (QUECINE et al., 2014), foram utilizadas para a manutenção e a multiplicação do isolado MF-1 como descrito por Leite et al. (2013).

3.2.2 Germinação e diferenciação *in vitro* do patógeno *P. psidii*

Para o experimento de germinação *in vitro*, foram utilizados os meios ágar-água (8 g/L) (FURTADO et al., 2003) e ágar-água (8 g/L) incrementado com 0.5% de diversas fontes lipídicas comerciais: óleo mineral (Sigma-Aldrich) (FURTADO et al., 2003), azeite de oliva (Galo extravirgem, lote 30170A097), óleo de soja (Liza, lote 06 P), óleo de canola (Liza, lote 05 C), óleo de milho (Liza, L01 C) e óleo de linhaça (Pazze, lote 39299 4).

Para o experimento de diferenciação das estruturas iniciais de infecção *in vitro*, sobre o meio foram dispostos dois tipos de membranas porosas: papel celofane (KAPETANAKOU et al., 2011; RAMOS; MAGAN; SANCHIS, 1999) e membrana de diálise (celulose, MWCO 12000 Da, Sigma).

Tanto para o experimento de germinação quanto para o de diferenciação das estruturas de infecção, aproximadamente três miligramas de uredósporos foram espalhados, com a ajuda de um pincel, em placas de Petri (10 cm de diâmetro)

contendo aproximadamente 20 mL de meio, que foram incubadas a 20°C no escuro por 24 e 48 horas (WIETHOLTER et al., 2003). Após incubação, as placas foram analisadas em fotomicroscópio *Axiophot* com câmara digital acoplada (Zeiss).

Os experimentos foram realizados utilizando-se 5 placas de Petri para cada tratamento. Cada placa foi considerada como uma repetição biológica independente, sendo que para cada placa foram contados aproximadamente 150 uredósporos totalizando em média 750 uredósporos por tratamento. Os uredósporos germinados e que apresentaram algum tipo de diferenciação estrutural foram contados com a ajuda do software Image tool (Versão 3.0). Para análise de significância dos resultados, foram realizados ANOVA e teste de Tukey ($p < 0.05$), no programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS-versão 8.0) (Figura 3.1).

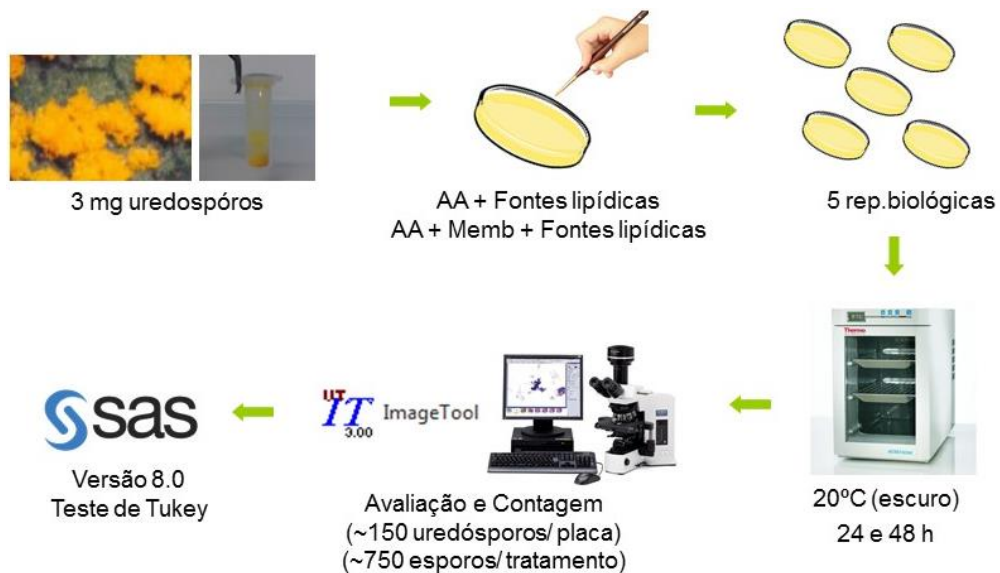


Figura 3.1 - Representação geral dos experimentos *in vitro* de germinação e diferenciação estrutural de *P. psidii*. AA = meio ágar-água, Memb.= membrana de diálise

3.2.3 Experimento para o estudo dos transcritos de *P. psidii*

Em uma placa de Petri contendo meio de cultura ágar-água suplementado com azeite de oliva, foram dispostas três membranas de diálise e aproximadamente três miligramas de uredósporos foram espalhados com a ajuda de um pincel. O mesmo procedimento foi repetido para totalizar 24 placas de Petri.

Logo após os uredósporos serem espalhados, 8 placas de Petri tiveram suas membranas recolhidas e maceradas com nitrogênio líquido e 16 mg de sílica, em

almofariz com a ajuda de um pistilo, representando o tempo 0 horas após incubação (h.a.i), onde existiam apenas uredósporos não-germinados e indiferenciados.

Doze horas após a incubação (12 h.a.i), tempo onde pelo menos 70% dos uredósporos possuíam tubo germinativo formado, as membranas foram retiradas de outras 8 placas de Petri e maceradas com nitrogênio líquido e 16 mg de sílica.

Vinte e quatro horas após a incubação (24 h.a.i.), tempo onde pelo menos 70% das estruturas iniciais de infecção de *P. psidii* estavam formadas (apressório e hifa de penetração), as membranas foram retiradas de outras 8 placas de Petri e maceradas com nitrogênio líquido e 16 mg de sílica.

Cada 6 membranas de diálise, ou seja, duas placas de Petri contendo seis miligramas de uredósporos, foram maceradas conjuntamente formando uma repetição biológica. Cada tratamento (0, 12 e 24 h.a.i.) foi composto por 4 repetições biológicas. O material coletado e macerado foi imediatamente acondicionado em nitrogênio líquido e, posteriormente, foram realizadas as extrações de RNA total de cada amostra (Figura 3.2).

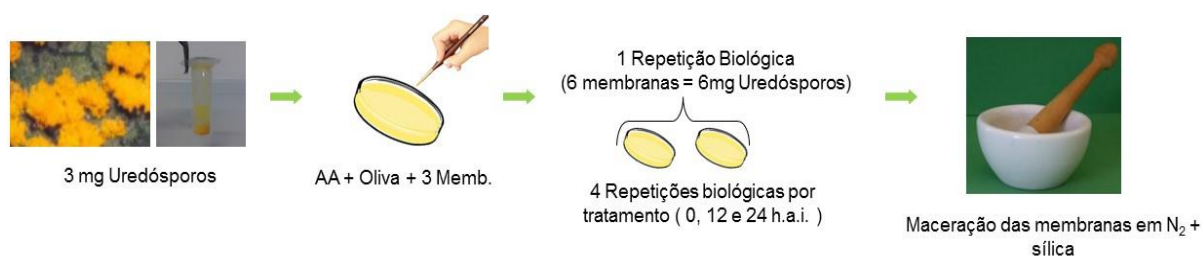


Figura 3.2 - Representação geral dos experimentos *in vitro* para extração do RNA total de *P. psidii*. AA = meio ágar-água, Memb.= membrana de diálise

3.2.4 Isolamento do RNA total, construção das bibliotecas e sequenciamento

A extração do RNA total das 12 amostras (4 repetições biológicas e três tratamentos) foi realizada com o *Rneasy Plant Kit* (QIAGEN) seguida por uma nova extração com Trizol (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes. A qualidade e concentração do RNA total extraído foram analisadas por gel de agarose (1,4%), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies). Um micrograma de RNA total extraído de cada amostra foi encaminhado para construção das bibliotecas e sequenciamento do RNA.

A preparação das bibliotecas e o sequenciamento do RNA (RNA-Seq) foram realizados no Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional

Aplicada à Agropecuária e Agroenergia. Para a preparação das bibliotecas das 12 amostras foi utilizado o kit *TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit* (ILLUMINA, SAN DIEGO, CA, USA), que enriquece a amostra para mRNA (transcritos com poly-A) e mantém a informação sobre a fita que é transcrita (*strand-specific*). As bibliotecas construídas apresentaram em torno de 300 pb (aproximadamente 200 pb do inserto + 120 pb dos adaptadores). Posteriormente, as bibliotecas foram quantificadas via qPCR com kit *KAPA*. Uma *lane* de uma célula de fluxo de sequenciamento foi clusterizada com o kit *TruSeq PE Cluster v3-cBot-HS* (ILLUMINA, SAN DIEGO, CA, USA) e sequenciadas utilizando um equipamento HiSeq 2500 (ILLUMINA, SAN DIEGO, CA, USA) com o *TruSeq SBS kit v3-HS* (200 ciclos), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento realizado foi do tipo *paired-end sequencing* e o tamanho dos *reads* sequenciadas foi de 100 pb.

3.2.5 Pré-processamento das sequências e montagem *de novo* dos transcritos de *P. psidii*

A demultiplexação das amostras e conversão dos arquivos BCL gerados pelos sistemas de seqüenciamento Illumina para formatos de arquivo FASTQ (formato padrão para os próximos passos das análises) foram realizadas pelo Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional aplicada à Agropecuária e Agroenergia utilizando os programas RTA (versão 1.18.54) e bcl2fastq Conversion (versão 2.17) (ILLUMINA, SAN DIEGO, CA, USA). Para cada amostra foram gerados dois arquivos *.fastq um para o *paired-end* 1 (R1) e um para o *paired-end* 2 (R2).

O programa Trimmomatic (versão 0.32) foi utilizado para remover a sequência de adaptadores remanescentes e trimar os *reads* por qualidade utilizando uma *Sliding window* de 4 pb e um *Q value* de 22, e *Minlen* de 60 para descartar *reads* com comprimento inferior a 60 pb (BOLGER; LOHSE, USADEL; 2014).

Para verificar a qualidade das sequências após o sequenciamento e após a remoção de adaptadores e trimagem dos *reads* por qualidade foi utilizado o programa FastQC (versão 0.11.2).

Após o pré-processamento dos *reads*, a montagem *de novo* dos transcritos/*contigs* de *P. psidii* foi realizada com o programa Trinity (versão 2.1.1), no modo *strand-specific*, sendo mantidos os transcritos com tamanho de pelo menos

300 pb (HAAS et al., 2013; GRABHERR et al., 2014). A integridade da montagem *de novo* gerada pelo Trinity foi avaliada pelo programa BUSCO (SIMÃO et al., 2015).

3.2.6 Anotação dos transcritos de *P. psidii* provenientes da montagem *de novo* e categorização funcional

Para a etapa de anotação e categorização funcional dos transcritos/*contigs* de *P. psidii* foi utilizada a ferramenta Blast2GO (versão 2.8.0) (CONESA et al., 2005). Sendo que a anotação dos *contigs* foi realizada ao nível de gene, ou seja, foram anotadas sempre a isoforma maior de cada transcrito/contig gerado na montagem *de novo* pelo Trinity.

Para os transcritos obtidos ao nível de genes, foram realizadas as etapas de *Blast* (blastx), *Mapping*, *Annotation*, *InterProScan*, *Enzyme code and KEGG* e *ANNEX*, todas executadas com os parâmetros *default*. O *GO-slim* realizado foi o genérico. Tais transcritos, foram então, categorizados em função dos processos biológicos (*multi-level pie chart* com *term filter value* igual a 1).

3.2.7 Estimativa da abundância dos transcritos e análise da expressão diferencial

A estimativa da abundância dos transcritos, ou seja, a contagem dos *reads* alinhados de volta contra a referência de transcritos montada pelo Trinity, foi realizada pelo programa eXpress (ROBERTS; PACHTER, 2012). As contagens dos *reads* foram sumarizadas ao nível de gene, tal como definido pelo Trinity.

Para a análise da expressão diferencial foi utilizado o pacote *edgeR* do programa *R* (versão 3.2.1), utilizando como entrada o arquivo de contagem dos *reads* apenas dos *contigs* que foram anotados no Blast2GO como pertencentes a fungos patogênicos, principalmente ferrugens (*Puccinia* e *Melampsora*). As contagens, ao nível de gene, por amostra foram normalizadas utilizando o método TMM (*Trimmed Mean of M-values method*) (ROBINSON; OSHLACK, 2010), conforme implementado no *edgeR*, a fim de levar em consideração a variação da população de RNA entre as amostras. Apenas os transcritos que alcançaram uma contagem por milhão em pelo menos três amostras, foram considerados como expressos e retidos para os próximos passos das análises no *edgeR*. Foram

considerados diferencialmente expressos os transcritos com FDR (*False Discovery Ratio*) menor que 0.05 e $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$ ou ≤ -2 (tratamento/control). A estratégia utilizada no presente trabalho para o estudo da expressão gênica foi uma análise ao longo do processo de diferenciação estrutural *in vitro* do patógeno. Para tanto, duas comparações foram realizadas: (i) uredóporos germinados (12 h.a.i – “tratamento”) *versus* uredóporos não germinados (0 h.a.i – “controle”), chamada de comparação 12h-0h. E, (ii) estruturas de infecção formadas (24 h.a.i – “tratamento”) *versus* uredóporos germinados (12 h.a.i – “controle”), chamada de comparação 24h-12h. Os *scripts* do R utilizados para a análise de expressão diferencial estão detalhados no ANEXO A.

3.3 Resultados

3.3.1 Germinação e diferenciação *in vitro* do patógeno *P. psidii*

A germinação dos uredóporos de *P. psidii* (MF-1) foi obtida em meio ágar-água (8 g/L), porém com baixa porcentagem de uredóporos germinados. Partindo das informações, que o óleo mineral induz a germinação de *P. psidii* (FURTADO et al., 2003) e que no genoma do isolado MF-1 de *P. psidii* foram encontrados muitos genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (QUECINE et al., 2012), também foram testados meios ágar-água incrementados com 0.5% de diferentes óleos: óleo mineral, azeite de oliva, óleo de soja, óleo de canola, óleo de milho e óleo de linhaça.

Nos tempos analisados, foi possível observar a germinação dos uredóporos e crescimento de seus tubos germinativos nos meios: ágar-água, ágar-água acrescido de 0.5 % de óleo mineral e ágar-água acrescido de 0.5% de azeite de oliva. Dentre estes três meios, a germinação dos uredóporos no meio ágar-água acrescido de azeite de oliva foi muito superior quando comparada aos outros dois meios testados (Figura 3.3).

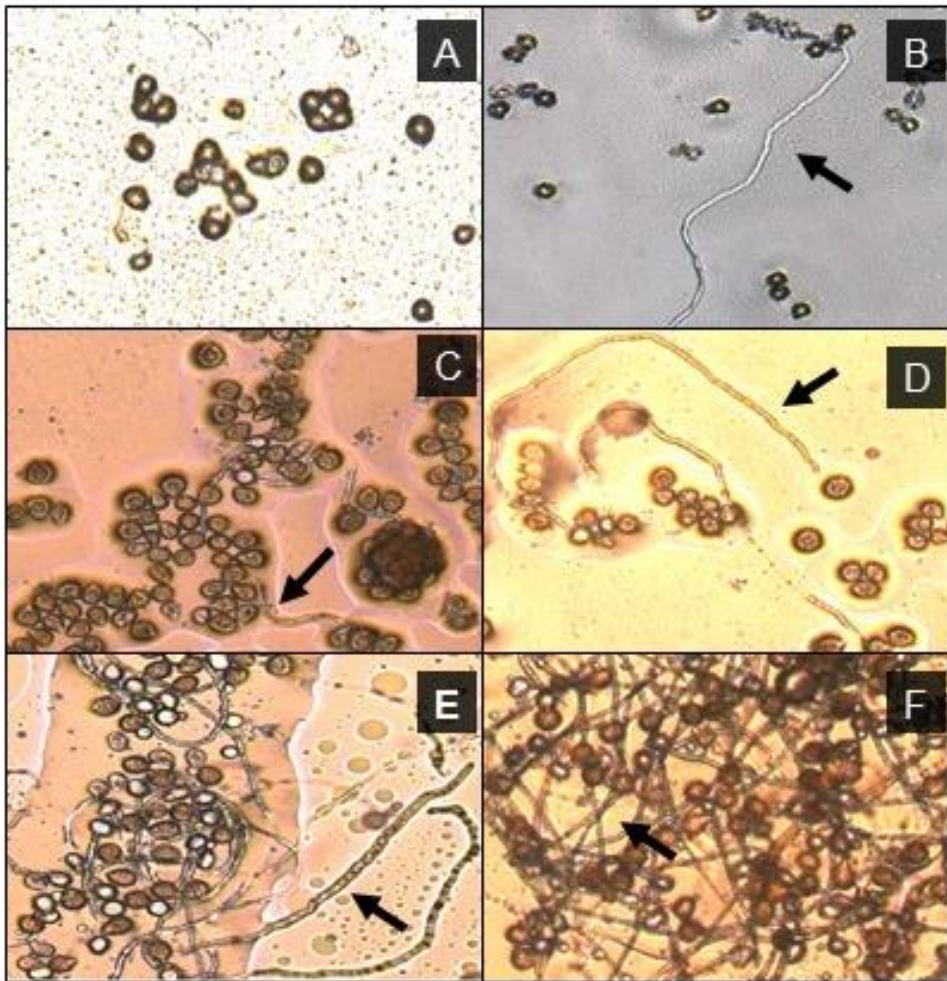


Figura 3.3 - Germinação dos uredósporos de *P. psidii* nos meios: ágar-água após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação; ágar-água acrescido de 0.5% de óleo mineral após 24 h (C) e 48 h (D) de incubação; ágar-água acrescido de 0.5% de azeite de oliva após 24 h (E) e 48 h (F) de incubação. As setas pretas indicam tubos germinativos

Após 48 horas de incubação, no meio ágar-água, acrescido de azeite de oliva a taxa de germinação de *P. psidii* foi de aproximadamente 54,8% enquanto que no meio acrescido com óleo mineral essa taxa foi de aproximadamente 14,5%. Sendo assim, o meio contendo azeite de oliva elevou a taxa de germinação *in vitro* dos uredósporos de *P. psidii* em aproximadamente 40% quando comparado com o meio contendo óleo mineral.

Na tentativa de obter *in vitro* as estruturas iniciais de infecção do patógeno *P. psidii* e, também, possibilitar uma melhor recuperação desse material para as etapas de extração do RNA total, esses uredósporos foram germinados sobre membranas.

Sobre o papel celofane não ocorreu a germinação dos uredósporos nos meios ágar-água, ágar-água acrescido de 0.5% de óleo mineral e ágar-água acrescido de

0.5% de azeite de oliva em nenhum dos tempos analisados (24 e 48 horas de incubação). Já, sobre as membranas de diálise, foi obtida a germinação e diferenciação estrutural (formação de apressório e hifa de penetração) de *P. psidii*, após 24 e 48 horas de incubação, apenas no meio ágar-água acrescido de 0.5 % de azeite de oliva (Figura 3.4). No entanto, no tempo 48 h.a.i., foi possível observar sinais de rompimento e extravasamento do citoplasma de algumas células indicando o processo de morte celular.

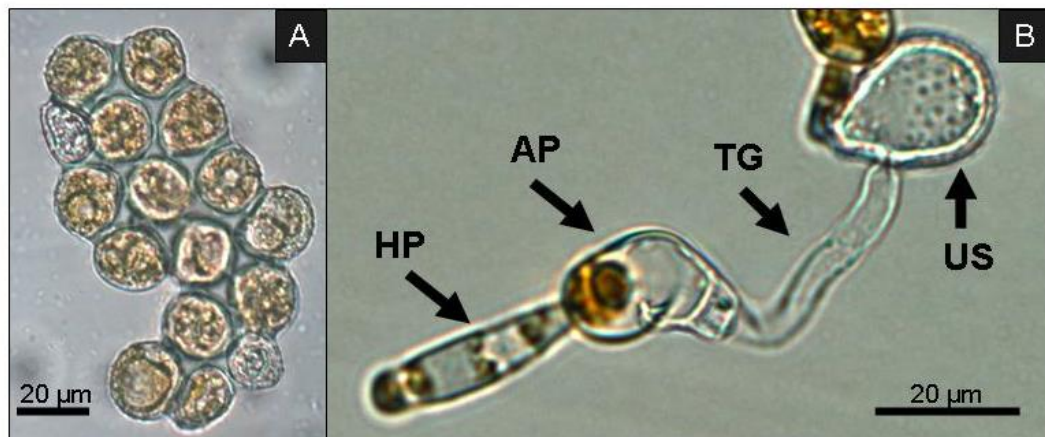


Figura 3.4 - Uredósporos observados em microscopia de luz 0 horas **(A)** e após 24 horas **(B)** de incubação em membrana de diálise, sobre meio agár-água acrescido de azeite de oliva (0.5%). Em **(A)** é possível observar os uredósporos não germinados e em **(B)** é possível observar a formação das estruturas iniciais de infecção a partir de um uredósporo. Onde: US: uredósporos, TG: tubo germinativo, AP: apressório e HP: hifa de penetração. Destacando o citoplasma do uredósporo, em amarelo, sendo transferido do AP para HP, e a presença de septos em HP que permite a observação de um padrão de listras amarelas, conforme ocorre a passagem do citoplasma ao longo dos septos

A análise dos resultados dos tempos 24 e 48 horas de incubação, comprovaram que a utilização do meio ágar-água acrescido de azeite de oliva (0.5%) foi significativamente melhor para a germinação dos uredósporos do que o uso de ágar-água ou ágar-água acrescido de óleo mineral (Tabela 3.1). Para todos os parâmetros avaliados, o uso da membrana de diálise junto ao ágar-água acrescido de azeite de oliva foi significativamente maior do que a ausência da membrana (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Processo de diferenciação de uredósporos de *P. psidii*

Tratamentos ¹	Taxa de germinação dos uredósporos (%) ²		% de apressórios em relação ao número de uredósporos germinados ³		% apressórios em relação ao número total de uredósporos ⁴	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Ágar-água	0 c	2.5 c	0 b	0 b	0 b	0 b
Ágar-água Membrana	0 c	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
Mineral	2.0 c	14.5 c	0 b	0 b	0 b	0 b
Mineral Membrana	0 c	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
Oliva	62.8 b	54.8 b	0 b	0 b	0 b	0 b
Oliva Membrana	87.1 a	80.2 a	86.9 a	90 a	76.9 a	73.4 a

¹ Todos os parâmetros foram avaliados após 24 e 48 horas de incubação dos uredósporos, por contagem em microscopia de luz. Foram utilizadas diferentes condições de cultivo: ágar-água (8g/L), Ágar-água (8g/L) + membrana de diálise, ágar-água (8g/L) acrescido de 0.5% de óleo mineral, ágar-água (8g/L) acrescido de 0.5% de óleo mineral + membrana de diálise, ágar-água (8g/L) acrescido de 0.5% de azeite de oliva e ágar-água (8g/L) de 0.5% de azeite de oliva + membrana de diálise.

² Uredósporos que apresentaram tubo germinativo passível de serem observados em microscopia de luz mensurados nos diferentes tratamentos.

³ Apressórios formados mensurados em microscopia de luz nos diferentes tratamentos e analisados em relação ao número de uredósporos germinados ⁽²⁾

⁴ Apressórios formados mensurados em microscopia de luz nos diferentes tratamentos e analisados em relação ao número total de uredósporos observados

*Para todos os dados apresentados, foram avaliadas cinco repetições biológicas (5 placas de Petri) totalizando aproximadamente 750 uredósporos contados por tratamento, sendo que os dados com a mesma letra e na mesma coluna não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

3.3.2 Extração do RNA total

A partir dos resultados acima apresentados, foi possível observar que a combinação de uma membrana de diálise com o azeite de oliva levou à diferenciação *in vitro* de algumas estruturas de infecção do patógeno *P. psidii* (apressório e hifa de penetração). Dessa forma, a extração de RNA total das amostras foi realizada em 3 horários: 0 h.a.i, 12 h.a.i. e 24 h.a.i. Sendo que no tempo 0 horas os RNAs extraídos foram atribuídos aos esporos não germinados, no tempo 12 horas aos esporos germinados (presença de tubo germinativo) e 24 horas a estruturas diferenciadas *in vitro* (presença de apressório e hifa de penetração).

Uma vez que, em 48 h.a.i., foram observados indícios de morte celular, esse tempo foi descartado para o estudo da expressão gênica.

Para o RNA total extraído de cada amostra, o valor médio observado para a razão A260nm/A280nm foi de 2,19 e para a razão A260nm/A230nm foi de 2,30. Nenhuma amostra apresentou rastros de degradação do RNA total, indicando que todas possuíam boa qualidade (Figura 3.5).

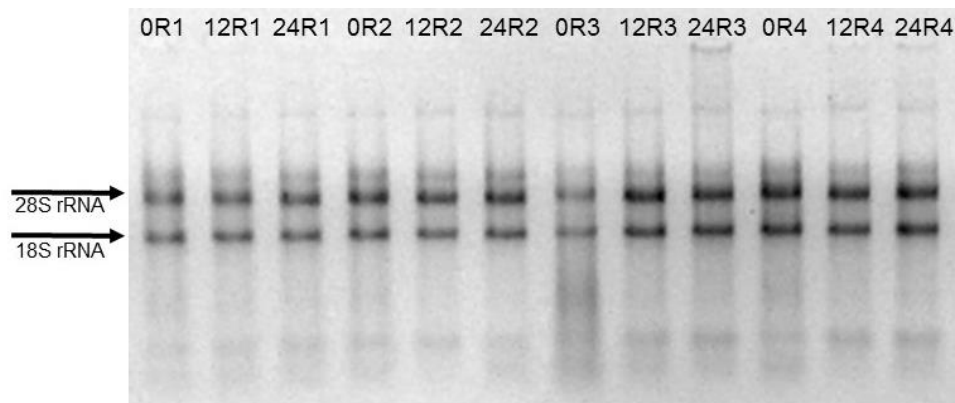


Figura 3.5 - Gel do RNA total extraído. Gel referente as 4 repetições biológicas (R1, R2, R3 e R4) dos três tratamentos: zero, 12 e 24 horas após incubação (h.a.i.), totalizando 12 amostras. As setas indicam as duas subunidades ribossomais típicas de eucariotos (28S e 18S rRNA)

Ainda, pela análise da integridade do RNA total verificada pelo *Agilent 2100 Bioanalyzer*, as amostras apresentaram um RIN ≥ 7 . O número de integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA integrity number*) considera todo o traço eletroforético. O algoritmo do programa RIN permite a classificação do RNA total eucariótico baseado em um sistema de numeração que varia de 1 a 10, sendo 1 o perfil mais degradado e 10 o perfil mais intacto (MUELLER; LIGHTFOOT; SCHROEDER, 2004).

3.3.3 Sumário dos dados de sequenciamento e da montagem *de novo* dos transcripts de *P. psidii*

Um total de aproximadamente 191,58 milhões de *paired-end reads* foram obtidos a partir de uma *lane* do equipamento Illumina HiSeq 2500. O número médio de *paired-end reads* por amostra foi de 15,97 milhões. Após o pré-processamento dos dados (retirada das sequências de adaptadores remanescentes e trimagem dos *reads* por qualidade) o número médio de *paired-end reads* por amostra foi 14,17

milhões, totalizando 170 milhões de *paired-end reads* obtidos com boa qualidade (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Sumário do sequenciamento e pré-processamento das amostras

Tratamento	Amostra ⁽¹⁾	Paired-end	Nº reads brutos ⁽²⁾	Tamanho read (pb)	Nº reads após pré-processamento ⁽³⁾	Tamanho reads após CQ (pb)
0 h.a.i.	0R1	1	16.519.091	101	14.653.759	60-100
		2	16.519.091	101	14.653.759	60-100
0 h.a.i.	0R2	1	16.506.111	101	14.567.013	60-100
		2	16.506.111	101	14.567.013	60-100
0 h.a.i.	0R3	1	17.476.653	101	15.443.391	60-100
		2	17.476.653	101	15.443.391	60-100
0 h.a.i.	0R4	1	13.432.663	101	11.938.802	60-100
		2	13.432.663	101	11.938.802	60-100
12 h.a.i.	12R1	1	13.991.816	101	12.553.418	60-100
		2	13.991.816	101	12.553.418	60-100
12 h.a.i.	12R2	1	19.340.514	101	17.104.601	60-100
		2	19.340.514	101	17.104.601	60-100
12 h.a.i.	12R3	1	16.295.268	101	14.480.975	60-100
		2	16.295.268	101	14.480.975	60-100
12 h.a.i.	12R4	1	15.230.139	101	13.486.695	60-100
		2	15.230.139	101	13.486.695	60-100
24 h.a.i.	24R1	1	15.051.719	101	13.350.766	60-100
		2	15.051.719	101	13.350.766	60-100
24 h.a.i.	24R2	1	13.826.453	101	12.283.302	60-100
		2	13.826.453	101	12.283.302	60-100
24 h.a.i.	24R3	1	16.241.854	101	14.445.277	60-100
		2	16.241.854	101	14.445.277	60-100
24 h.a.i.	24R4	1	17.669.445	101	15.707.130	60-100
		2	17.669.445	101	15.707.130	60-100

⁽¹⁾ Nome dado para cada amostra sequenciada. Indica os tratamentos (0,12 ou 24 h.a.i.) e as quatro repetições biológicas para cada tratamento (R1, R2, R3 e R4).

⁽²⁾ Número total de *reads* provenientes do sequenciamento expresso em milhões.

⁽³⁾ Número de *reads* após o controle de qualidade (remoção de adaptadores e trimagem por qualidade das bases) expresso em milhões.

Após o pré-processamento, os 170 milhões de *paired-end reads* foram utilizados para a montagem *de novo* dos transcriptos de *P. psidii* pelo programa Trinity, como já descrito nos materiais e métodos do presente trabalho.

Pelo Trinity foram gerados 61.343 transcritos ou *contigs*. Sendo que, 98,65% dos *reads* gerados no sequenciamento mapearam contra a montagem *de novo*. Os 61.343 transcritos/*contigs* puderam ser agrupados em 31.393 genes putativos e o conteúdo GC foi igual a 40.51%, valor semelhante ao conteúdo GC de ESTs em *Puccinia striiformis* f. sp *tritici* (45,08%) (ZHANG et al., 2008). Considerando os dados ao nível de genes (31.393 *contigs*), o tamanho médio dos *contigs* gerados foi de 1.060 pb e 17.534 transcritos/*contigs* (55%) provavelmente codificam para proteínas.

3.3.4 Anotação dos transcriptos de *P. psidii* provenientes da montagem *de novo* e caracterização funcional

Considerando os dados ao nível de genes, os 31.393 *contigs* gerados a partir da montagem *de novo* pelo Trinity foram anotados e caracterizados utilizando a ferramenta Blast2GO.

Dos 31.393 *contigs* obtidos, apenas 18.593 (59,23%) tiveram a função anotada após ser realizada uma busca por similaridade das sequências contra o banco de dados de proteínas não redundante (nr) do NCBI.

Dos 18.593 *contigs* anotados, 13.781 (74,12%) foram relacionados com proteínas de fungos patogênicos, principalmente ferrugens (*Puccinia* e *Melampsora*). Os outros 4.856 *contigs* (25,88%) foram relacionados a proteínas de uma grande variedade de organismos, incluindo plantas, insetos e aracnídeos. Os 12.800 *contigs* que não tiveram a função anotada e os 4.812 *contigs* relacionados a outros organismos foram excluídos das análises.

Com base nos resultados de anotação e categorização do Blast2GO, os 13.781 transcritos/*contigs*, cujas sequências foram relacionadas com proteínas de fungos, foram classificados de acordo com os processos biológicos em que estavam envolvidos. Vários GO-termos relacionados aos processos biológicos são bons indicativos dos transcritos que podem estar envolvidos no crescimento *in vitro* do patógeno e também relacionados ao processo inicial da interação planta-patógeno, como por exemplo: processo metabólico de lipídeos (GO:0006629), divisão celular (GO:0051301), organização da parede celular ou biogênese (GO:0071554), crescimento (GO:0040007), morfogênese celular (GO:0000902) e diferenciação celular (GO:0030154) (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - GO-termos dos processos biológicos representativos dos transcritos de *P. psidii* provenientes de urediniósporos germinados e diferenciados *in vitro*

GO-termo*	GO-ID	Transcritos relacionados ao GO	
		Número	%
Processo de modificação de proteínas	GO:0006464	784	7,15
Resposta ao estresse	GO:0006950	661	6,03
Organização do cromossomo	GO:0051276	616	5,62
Processo metabólico de aminoácidos	GO:0006520	558	5,09
Biogênese do ribossomo	GO:0042254	534	4,87
Processo metabólico do DNA	GO:0006259	490	4,47
Processo metabólico de carboidratos	GO:0005975	424	3,87
Processo metabólico de lipídeos	GO:0006629	419	3,82
Tradução	GO:0006412	398	3,63
Transporte mediado por vesícula	GO:0016192	390	3,56
Complexo de montagem proteica	GO:0006461	350	3,19
Transdução do sinal	GO:0007165	336	3,06
Processamento de mRNA	GO:0006397	291	2,65
Geração de metabólitos precursores e energia	GO:0006091	289	2,64
Reprodução	GO:0000003	286	2,61
Divisão celular	GO:0051301	284	2,59
Processo metabólico de cofatores	GO:0051186	274	2,5
Marcação de proteínas	GO:0006605	261	2,38
Complexo de montagem de ribonucleoproteínas	GO:0022618	242	2,21
Organização mitocondrial	GO:0007005	241	2,2
Organização do citoesqueleto	GO:0007010	235	2,14
Segregação do cromossomo	GO:0007059	233	2,12
Processo homeostático	GO:0042592	232	2,12
Mitose	GO:0007067	227	2,07
Transporte nucleocitoplasmático	GO:0006913	201	1,83
Processo metabólico de tRNA	GO:0006399	199	1,81
Processo catabólico de compostos contendo nucleobases	GO:0034655	198	1,81
Transporte vacuolar	GO:0007034	177	1,61
Processo metabólico de compostos sulfurados	GO:0006790	165	1,5
Organização da parede celular ou biogênese	GO:0071554	138	1,26
Dobramento da proteína	GO:0006457	136	1,24
Transporte transmembrana	GO:0055085	112	1,02
Autofagia	GO:0006914	111	1,01
Crescimento	GO:0040007	82	0,75
Morfogênese Celular	GO:0000902	74	0,67
Maturação de proteínas	GO:0051604	68	0,62
Morte celular	GO:0008219	46	0,42
Envelhecimento	GO:0007568	36	0,33
Diferenciação celular	GO:0030154	35	0,32
Processo metabólico secundário	GO:0019748	31	0,28
Organização da membrana plasmática	GO:0007009	27	0,25
Transporte intracelular citoesqueleto-dependentes	GO:0030705	25	0,23
Motilidade celular	GO:0048870	13	0,12
Formação da estrutura anatômica envolvida na morfogênese	GO:0048646	12	0,10
Processo metabólico de compostos nitrogenados	GO:0071941	12	0,10
Transposição	GO:0032196	10	0,09
Adesão celular	GO:0007155	4	0,04

*Os GO-termos foram dispostos em ordem decrescente do processo mais representativo para o processo menos representativo.

3.3.5 Análise de transcritos diferencialmente expressos

Na comparação 12h-0h, quando se inicia a germinação de *P. psidii* um total de 420 transcritos foram diferencialmente expressos ($FDR \leq 0,05$ e $\text{Log}_2\text{FoldChange}$

≥ 2 ou ≤ -2). No entanto, 287 (68,33%) transcritos tiveram similaridade significativa com proteínas classificadas como hipotéticas, não sendo possível definir suas funções. Entre os 133 (31,67%) transcritos anotados e diferencialmente expressos, 27 foram mais expressos (*overexpressed*) e 106 foram menos expressos (*supressed*) no tempo 12 h.a.i (ANEXO B).

Na comparação 24h-12h, quando ocorre a formação do apressório e hifa de penetração um total de 57 transcritos foram diferencialmente expressos ($FDR \leq 0,05$ e $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$ ou ≤ -2). Sendo que, 44 (78,95%) transcritos tiveram similaridade significativa com proteínas classificadas como hipotéticas, não sendo possível definir suas funções. Entre os 12 (21,05%) transcritos anotados e diferencialmente expressos, 6 foram mais expressos (*overexpressed*) e 7 foram menos expressos (*supressed*) no tempo 24 h.a.i. (ANEXO C). Um sumário da análise de expressão gênica das comparações 12h-0h e 24h-12h é demonstrado na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Transcritos diferencialmente expressos durante a germinação (12h-0h) e diferenciação estrutural (24h-12h) de *P. psidii*

Comparação	Número de transcritos ⁽¹⁾		Total	Número de transcritos anotados ⁽²⁾		Total
	(+)*	(-)*		(+)*	(-)*	
12h-0h	83	337	420	27	106	133
24h-0h	14	43	57	6	6	12

⁽¹⁾ Referente ao total de transcritos diferencialmente expressos.

⁽²⁾ Referente ao total de transcritos diferencialmente expressos e considerando apenas o número de transcritos anotados pela ferramenta Blast2GO.

* O sinal (+) ou (-) faz referência, respectivamente, a maior ou menor expressão de um determinado transcrito em relação ao primeiro termo ("tratamento") de cada comparação.

Os 145 transcritos diferencialmente expressos e anotados revelaram que ao logo do processo de germinação e diferenciação estrutural *in vitro*, o patógeno *P. psidii* têm perfis de expressão gênica distintos. Sendo que, estes transcritos estão relacionados a diferentes processos biológicos nas comparações 12h-0h e 24h-12h (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - GO-termos dos processos biológicos representativos dos transcritos diferencialmente expressos e anotados de *P. psidii* provenientes de urediniósporos germinados (12h-0h) e diferenciados *in vitro* (24h-12h)

GO-termo	GO-ID	Transcritos relacionados ao GO			
		12h-0h		24h-12h	
		Número	%	Número	%
Complexo de montagem de ribonucleoproteínas	GO:0022618	7	5,93	1	5,88
Divisão celular	GO:0051301	1	0,85	1	5,88
Geração de metabólitos precursores e energia	GO:0006091	5	4,24	1	5,88
Mitose	GO:0007067	2	1,69	1	5,88
Processamento de mRNA	GO:0006397	6	5,08	1	5,88
Processo de modificação de proteínas	GO:0006464	3	2,54	1	5,88
Processo metabólico de aminoácidos	GO:0006520	7	5,93	1	5,88
Processo metabólico de carboidratos	GO:0005975	6	5,08	1	5,88
Processo metabólico de lipídeos	GO:0006629	7	5,93	1	5,88
Processo metabólico de DNA	GO:0006259	8	6,78	1	5,88
Resposta ao estresse	GO:0006950	11	9,32	1	5,88
Biogênese do ribossomo	GO:0042254	6	5,08	0	0
Segregação cromossômica	GO:0007059	1	0,85	0	0
Complexo de montagem proteica	GO:0006461	5	4,24	0	0
Crescimento	GO:0040007	1	0,85	0	0
Dobramento da proteína	GO:0006457	1	0,85	0	0
Marcação de proteínas	GO:0006605	2	1,69	0	0
Maturação de proteínas	GO:0051604	1	0,85	0	0
Organização da membrana	GO:0061024	1	0,85	0	0
Organização da parede celular ou biogênese	GO:0071554	2	1,69	0	0
Organização do citoesqueleto	GO:0007010	2	1,69	0	0
Organização do cromossomo	GO:0051276	3	2,54	0	0
Organização mitocondrial	GO:0007005	1	0,85	0	0
Processo catabólico de compostos contendo nucleobases	GO:0034655	1	0,85	0	0
Processo homeostático	GO:0042592	1	0,85	0	0
Processo metabólico de compostos sulfurados	GO:0006790	4	3,39	0	0
Processo metabólico de cofatores	GO:0051186	6	5,08	0	0
Processo metabólico de tRNA	GO:0006399	2	1,69	0	0
Reprodução	GO:0000003	1	0,85	0	0
Tradução	GO:0006412	7	5,93	0	0
Transporte mediado por vesícula	GO:0016192	1	0,85	0	0
Transporte nucleocitoplasmático	GO:0006913	2	1,69	0	0
Transporte transmembrana	GO:0055085	3	2,54	0	0
Transporte vacuolar	GO:0007034	1	0,85	0	0
Morte Celular	GO:0008219	0	0	1	5,88
Processo biossintéticos	GO:0009058	0	0	2	11,76
Processos catabólicos	GO:0009056	0	0	1	5,88
Transporte	GO:0006810	0	0	1	5,88
Transdução do sinal	GO:0007165	0	0	1	5,88

Vários genes importantes e relacionados ao reconhecimento, germinação, diferenciação e patogenicidade de fungos vêm sendo identificados e descritos ultimamente na literatura (AHN et al., 2003; KIM et al., 2004; QUECINE et al., 2016; ZHANG et al., 2008). Além disso, o sequenciamento do genoma do isolado MF-1 de *P. psidii* apontou a presença de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (QUECINE et al., 2012), que podem estar relacionados as altas taxas de germinação obtidas em meio ágar-água acrescido de azeite de oliva.

Dentre os 145 transcritos diferencialmente expressos e anotados, aqueles que foram associados à transcritos já descritos na literatura para crescimento,

diferenciação estrutural, fatores de patogenicidade ou virulência, e também para metabolismo de lipídeos, foram, portanto, sugeridos como possíveis transcritos relacionados aos processos iniciais de reconhecimento, germinação e diferenciação *in vitro* de *P. psidii* e também podem estar relacionados ao processo inicial de infecção nas comparações 12h-0h e 24h-12h (Tabela 3.6).

Estes transcritos selecionados tiveram similaridade com sequências do banco de dados (Genbank/NCBI) que codificam para diversas proteínas de fungos patogênicos, dando destaque a possíveis efetores, uma quitina sintase e hidrolases como lipases, proteases e quitinases. A maioria destas sequências foram identificadas em fungos basideomicetos, principalmente ferrugens das espécies *Puccinia sorghi*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Melampsora larici-populina* e *Uromyces viciae-fabae* (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Transcritos de *Puccinia psidii* diferencialmente expressos durante a germinação (12h-0h) e diferenciação estrutural (24h-12h) do patógeno

C ⁽¹⁾	ID transcrito na Montagem de novo	Acesso / Organismo ⁽²⁾	Descrição/ Função putativa	Nível de expressão ⁽³⁾
12h-0h	TRINITY_DN15565_c0_g1	BAP68992.1 <i>Hyaloperonospora arabidopsis</i>	Efector candidate	-3,315
	TRINITY_DN20609_c0_g1	KNZ59147.1 <i>Puccinia sorghi</i>	Chitin synthase	-2,092
	TRINITY_DN18339_c1_g1	XP_007404738.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Family 18 glycoside hydrolase	-2,092
	TRINITY_DN13158_c0_g1	XP_007300174.1 <i>Stereum hirsutum</i>	Alpha beta-hydrolase	-2,09
	TRINITY_DN7912_c0_g1	XP_007411862.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Family 1 polysaccharide lyase	-4,854
	TRINITY_DN2483_c0_g1	XP_007408548.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Family 24 glycosyltransferase	-2,835
	TRINITY_DN17188_c1_g1	XP_007410834.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Family 76 glycoside hydrolase	-2,336
	TRINITY_DN18241_c2_g1	XP_007367465.1 <i>Dichomitus squalens</i>	Glycoside hydrolase	-2,304
	TRINITY_DN10425_c0_g1	XP_003322568.1 <i>Puccinia graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	26S protease subunit rpt4	-2,110
	TRINITY_DN14891_c0_g1	GAN04074.1 <i>Mucor ambiguus</i>	Ion protease	-2,554
	TRINITY_DN17269_c2_g1	XP_007417205.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Zinc metalloprotease	-2,392
	TRINITY_DN17939_c1_g2	XP_007413969.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Carboxypeptidase precursor	KEX1 -2,074
	TRINITY_DN10569_c0_g1	XP_007414777.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Carboxypeptidase S1	-2,083
	TRINITY_DN6524_c0_g1	KNZ49742.1 <i>Puccinia sorghi</i>	26S proteasome	2,080
	TRINITY_DN13700_c0_g1	CAI96535.1 <i>Uromyces viciae-fabae</i>	Rust transferred	2,169
	TRINITY_DN15737_c0_g1	XP_007415255.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Family 7 glycoside hydrolase	3,972
	TRINITY_DN13846_c0_g1	XP_007406449.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Lipase, class 3	4,865
	TRINITY_DN11277_c0_g2	XP_007409569.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Subtilisin protease	3,631
24h-12h	TRINITY_DN16636_c1_g1	XP_007412149.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Family 13 glycoside hydrolase	-2,105
	TRINITY_DN17437_c0_g1	XP_007417814.1 <i>Melampsora larici-populina</i>	Pleiotropic drug resistance ABC transporter	2,286

(1) Comparações realizadas

(2) Número de acesso da sequência de aminoácidos no banco de dados do NCBI (Genbank) e em qual organismo ela foi descrita no banco de dados

(3) Log₂ fold change, sempre relativo ao primeiro termo (“tratamento”) da comparação.

Dentre os transcritos diferencialmente expressos na comparação 12h-0h com regulação negativa, ou seja, estavam mais expressos no tempo 0 h.a.i. do que no tempo 12 h.a.i., podemos destacar transcritos que provavelmente codificam para uma molécula candidata a efetor, uma quitina sintase, hidrolases de carboidratos, proteases e peptidases. Já os transcritos que provavelmente codificam para um proteassomo, uma hidrolase da família 7 de glicosil hidrolases, um possível efetor (*rust transferred*), uma lipase e uma protease tiveram regulação positiva na mesma comparação, ou seja, estavam mais expressos no tempo 12 h.a.i. do que no tempo 0 h.a.i (tiveram a expressão aumentada ao longo desse período de tempo).

Na comparação 24h-12h uma proteína putativa da família 13 de glicosil hidrolases teve regulação negativa, ou seja, teve sua expressão diminuída ao longo desse período de tempo, estando mais abundante às 12 h.a.i. Já uma proteína putativa do tipo *ABC transporter* teve regulação positiva, ou seja, a abundância desse transcrito aumentou ao longo do tempo analisado, sendo mais expressa às 24 h.a.i. do que as 12 h.a.i.

3.4 Discussão

Com a finalidade de simular estímulos químicos e físicos presentes no hospedeiro, a utilização do azeite de oliva e da membrana de diálise para cultivo *in vitro* de *P. psidii* resultou em altas taxas de germinação de uredósporos e a diferenciação de algumas estruturas iniciais de infecção, fato nunca relatado anteriormente na literatura científica para este importante patógeno biotrófico.

Após 48 horas de incubação, foram observados indícios de morte celular, indicando que possivelmente apenas parte dos componentes do hospedeiro envolvidos no desenvolvimento do patógeno puderam ser simulados pela condição produzida *in vitro*. Outros estímulos provavelmente são necessários para que o patógeno possa continuar seu desenvolvimento *in vitro*.

É difícil identificar quais sinais *in planta* equivalem aos sinais presentes no azeite de oliva e na membrana de diálise que induziram a alta taxa de germinação e a diferenciação *in vitro* das estruturas iniciais de infecção de *P. psidii*. Provavelmente, o azeite possui componentes químicos similares às substâncias presentes nas ceras cuticulares do hospedeiro e a membrana de diálise simula o contato físico com a folha. Essa hipótese é baseada em resultados encontrados na

literatura que indicam que sinais como compostos orgânicos (MACKO et al., 1978), ceras da cutícula do hospedeiro (GRAMBOW; RIEDEL, 1977; GRAMBOW; GRAMBOW, 1978), voláteis foliares (GRAMBOW, 1977; GRAMBOW; RIEDEL, 1977; COLLINS; MOERSCHBACHER; READ, 2001; WIETHOLTER et al., 2003) e superfícies rígidas, hidrofóbicas e com sulcos superficiais que simulam a superfície foliar estimulam a germinação e desencadeiam a diferenciação estrutural *in vitro* de patógenos biotróficos (WIETHOLTER et al., 2003).

As análises de expressão gênica foram realizadas por meio de duas comparações. Na comparação 12h-0h, intervalo em que ocorrem o início do desenvolvimento do patógeno e germinação dos uredósporos, foi observada uma quantidade elevada de transcritos e uma grande quantidade de GO-terms relacionados a eles. Já na comparação 24h-12h, intervalo em que ocorre a diferenciação estrutural de *P. psidii*, foi observada uma diminuição acentuada de transcritos e, conseqüentemente, um número menor de GO-terms.

Essa diminuição de transcritos provavelmente ocorreu devido ao fato do patógeno estar em um meio de cultura que não forneceu todos os estímulos necessários para a continuidade do seu desenvolvimento, sendo inclusive observado o GO-termo relacionado com morte celular na comparação 24h-12h. Aparentemente, o patógeno inicia seu processo de morte celular em 24 h.a.i. e o processo de lise e extravasamento citoplasmático das células em microscopia de luz é observado em 48 h.a.i.

Na comparação 12h-0h, vários transcritos tiveram a regulação da transcrição negativa, ou seja, estavam mais abundantes no tempo 0 h.a.i. em relação ao tempo 12 h.a.i. Provavelmente, transcritos relacionados com o mecanismo de reconhecimento do hospedeiro, germinação e interação com a planta e que codificam para fatores de virulência/efetores, enzimas de degradação da parede celular do hospedeiro e crescimento do patógeno são utilizados no início do processo de infecção e têm suas quantidades reduzidas com o desenvolvimento do patógeno.

O transcrito TRINITY_DN15565_c0_g1 de *P. psidii* refere-se a uma proteína putativa do tipo *Efector candidate*. Efectores são fatores de virulência que suprimem a resposta do hospedeiro contra o patógeno (HOU et al., 2013). A proteína *Efector candidate* foi encontrada durante o processo inicial de infecção de *Arabidopsis thaliana* pelo patógeno biotrófico *Hyaloperonospora arabidopsidis* e caracterizada

como candidata a efetor do tipo RxRL (ASAI et al., 2014). Os efetores do tipo RxLR, são efetores citoplasmáticos que possuem um peptídeo sinal na extremidade N-terminal seguido por um motivo RxLR (R: arginina, x=qualquer aminoácido, L: leucina e R: arginina) que é responsável pela translocação dessa proteína para o interior da célula hospedeira e um domínio C-terminal relacionado com a sua atividade ou função (WHISSON et al., 2007). No oomiceto *Phytophthora infestans*, vários efetores RxLR são induzidos e secretados pelo patógeno no estágio inicial da germinação dos esporos (HASS et al, 2009; QUTOB; KAMOUN; GIJZEN, 2002). Em *P. psidii* a proteína identificada como *Efeitor candidate* também possui o peptídeo sinal em sua extremidade N-terminal, predito pelo InterPro no programa Blast2GO, e o transcrito é mais expresso (overexpressed) assim que os esporos são colocados em contato com o meio de cultura. Dessa forma, é possível que esse transcrito codifique um efetor de *P. psidii*.

Os transcritos TRINITY_DN20609_c0_g1 e TRINITY_DN18339_c1_g1 são, respectivamente, referentes a uma quitina sintase (*Chitin synthase*) e uma glicosil hidrolase da família 18 (*Family 18 glycoside hydrolase*) com possível atividade de quitinase (MURPHY et al., 2011). A quitina é um polissacarídeo essencial da parede celular de fungos e é necessária para a manutenção da integridade celular. As enzimas com atividade de quitina sintase e quitinase possuem, respectivamente, os papéis de formar e hidrolisar a quitina e são essenciais para a remodelação da parede celular dos fungos, sendo muito importantes nos processos de crescimento, diferenciação estrutural e multiplicação celular (RONCERO; SANCHEZ; VALDIVIESO, 2016). A identificação dessas enzimas em fungos fitopatogênicos como *P. psidii* podem auxiliar a caracterizar a regulação da síntese de quitinas deste fungo. A inibição dessas enzimas pode ser utilizada como uma estratégia para o desenvolvimento de substâncias antifúngicas (RONCERO; SANCHEZ; VALDIVIESO, 2016), que no presente trabalho poderiam inibir o processo de germinação de *P. psidii*.

Muitos fitopatógenos são capazes de alterar ou degradar a parede celular das plantas hospedeiras nos estágios iniciais do processo de infecção. Tais alterações são mediadas por enzimas que degradam polissacarídeos e facilitam a penetração das hifas do patógeno através da parede celular (SILVA et al., 2008). As famílias de glicosil hidrolases (GH) estão presentes no genoma de vários patógenos biotróficos como *Blumeria graminis*, *Ustilago maydis* e *P. graminis* sendo rapidamente

expressas e ativadas durante o estágio inicial da infecção em plantas e mostram que esses fungos estão equipados com várias enzimas relacionadas à degradação da parede celular importantes para a interação com o hospedeiro (GIBSON et al., 2011).

As glicosil hidrolases das famílias 7 (GH7) e 13 (GH13) encontradas no presente trabalho são caracterizadas em fungos como enzimas com atividade de endoglucanases, xilanases, celobiases e alfa-glicosidases (MURPHY et al., 2011). Essas enzimas podem estar diretamente relacionadas com a degradação da parede celular, hidrolisando celulose, hemicelulose e pectinas. No genoma de *P. graminis* foi observada uma grande quantidade de genes de GH7 (GIBSON et al., 2011) e, em *Alternaria alternata*, a expressão de glucanases está relacionada com a virulência deste fitopatógeno (REUVENI et al., 2007).

Conjuntamente com diversas GH, no presente trabalho foram encontrados transcritos de *P. psidii* que codificam para uma *26S protease subunit rpt4* e uma *carboxypeptidase S1* que provavelmente estão relacionadas ao processo inicial de infecção de *P. psidii*. Proteases e peptidases, como a *carboxypeptidase S1*, foram encontradas no secretoma de *Diplodia corticola* e se mostraram potencialmente envolvidas na patogênese deste fungo (FERNANDES et al., 2014). A proteômica de uredospóros da ferrugem do eucalipto também identificou proteases e peptidases, como a *26S protease subunit rpt4*, que foram relacionadas com a patogênese de *P. psidii* (QUECINE et al., 2016). As proteases muitas vezes não são claramente correlacionadas com a patogênese, mas, no entanto, é sabido que a secreção de proteases é aumentada quando fungos são colocados em contato com extratos de plantas (ESPINO et al., 2010; PHALIP et al., 2005; ZORN et al., 2005). Provavelmente, as proteases auxiliam outras enzimas na degradação da parede celular, indicando a importância dessas enzimas no processo inicial de infecção fúngica (FERNANDES et al., 2014).

Transcritos que codificam uma *substilin protease* foram observados sendo mais expressos no tempo 12 h.a.i em relação ao tempo 0 h.a.i., sugerindo que o gene foi induzido durante a formação dos tubos germinativos do patógeno *P. psidii*. Esta protease também foi encontrada em maior abundância em *Melampsora larici-populina* durante seu processo inicial de infecção em folhas de *Populus* (DUPLESSIS et al., 2011).

Os patógenos biotróficos rompem a superfície externa das plantas com o auxílio do apressório e de enzimas extracelulares. Além das GH e proteases, lipases podem estar envolvidas na degradação de componentes da cutícula foliar (BELLICAMPI; CERVONE; LIONETTI, 2014). As lipases são capazes de hidrolisar as ceras cuticulares e componentes da parede celular das plantas contribuindo substancialmente para a patogenicidade de diversos fungos (BRAVO; RUIZ; RONCERO, 2013; DI PIETRO; RONCERO; RUIZ-ROLDÁN, 2009). As lipases têm sido propostas como enzimas essenciais na interação planta-patógeno, estando associadas ao crescimento *in vitro* de patógenos e a adesão e penetração dos patógenos nas superfícies foliares (BRAVO; RUIZ; RONCERO, 2013; KLOSE; DE SÁ; KRONSTAD, 2004; VOIGT; SCHÄFER; SALOMON, 2005).

Em *Sporisorium scitamineum*, várias lipases foram encontradas sendo expressas durante o processo inicial de infecção do patógeno em cana de açúcar (TANIGUTI et al., 2016). Durante o processo de infecção de *P. psidii* em plantas de *E. grandis*, uma *lipase class 3* do patógeno foi altamente expressa durante as primeiras 12 horas de infecção (ALVES; BINI; QUECINE, 2015). Em *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersia* também foram identificadas proteínas *lipase class 3* sendo altamente induzidas entre 21 e 96 horas após a inoculação do patógeno em tomateiros (BRAVO; RUIZ; RONCERO; 2013). Voigt, Schafer e Salomon (2005) observaram que a atividade de uma lipase é altamente induzida em *Fusarium graminearum* quando este infecta plantas de trigo e os autores conseguiram aumentar a germinação *in vitro* do patógeno e induzir a produção dessa enzima ao adicionarem óleo de trigo ao meio de cultura.

No presente trabalho, o transcrito de uma *lipase class 3* foi mais expresso durante a formação dos tubos germinativos de *P. psidii* (12 h.a.i) e provavelmente possui papel importante na patogenicidade desta ferrugem. Essa enzima pode ter sido induzida pela adição do azeite de oliva ao meio de cultura assim como observado por Voigt, Schafer e Salomon (2005). Esses resultados corroboram a hipótese de que o patógeno utiliza para sua germinação *in vitro* alguma substância lipídica presente no azeite de oliva que é equivalente a algum estímulo químico da superfície foliar do hospedeiro durante seu processo inicial de infecção.

Os transcritos de *P. psidii* que codificam as proteínas *26S proteasome* e *rust transferred* também foram mais expressos no tempo 12 h.a.i em relação ao tempo 0

h.a.i., indicando que a transcrição dos genes dessas proteínas putativas foi induzida durante a formação dos tubos germinativos do patógeno.

A *26S proteasome* é uma protease que possui uma subunidade 20S com atividade catalítica e uma subunidade 19S com atividade regulatória (GRINYER et al., 2006). Kim et al (2004) identificaram em um estudo de proteoma de *Magnaporthe grisea* que a subunidade 20S do proteassomo é altamente abundante após 12 horas de incubação do patógeno e confirmaram a presença desta proteína durante a formação *in vitro* dos apressórios de *M. grisea*. Os autores sugerem que essa proteína está envolvida na remobilização de proteínas estocadas nos esporos que podem ajudar a formar o apressório. Dessa forma, os transcritos de *P. psidii* que codificam a *26S proteasome* mais expressos em 12h.a.i. podem estar relacionados com a formação do apressório, passo seguinte da diferenciação estrutural *in vitro* do patógeno.

A proteína *rust transferred* foi identificada por Kemen et al (2005) e recebeu esse nome pois foi encontrada em *Uromyces viciae-fabae*, fungo causador da ferrugem em feijão. Essa proteína foi encontrada em haustórios formados *in vitro* e também dentro do citoplasma de células do hospedeiro infectadas pelo patógeno durante o processo de infecção em planta, indicando que esta proteína foi transferida do patógeno para o hospedeiro. Essa proteína foi considerada um efetor que provavelmente possui papel de manter a compatibilidade do patógeno com seu hospedeiro, controlando o metabolismo da planta. Esse transcrito de *P. psidii* pode estar sendo mais expresso durante a formação do tubo germinativo do patógeno (12 h.a.i.) para que a proteína seja utilizada como um efetor no processo de interação planta-patógeno nos próximos estágios da infecção.

Um transcrito de *P. psidii* que codifica a proteína putativa *pleiotropic drug resistance ABC transporter* foi mais expresso 24 h.a.i. em relação a 12 h.a.i., indicando sua maior expressão durante a formação do apressório e hifas de penetração. Em *Magnaporthe grisea*, o gene *ABC transporter* codifica uma proteína similar a uma proteína encontrada em leveduras associada à resistência a compostos antifúngicos e, por isso, recebeu o nome *pleiotropic drug resistance ABC transporter* (URBAN; BHARGAVA; HAMER, 1999).

As proteínas do tipo *ABC transporters* são proteínas transmembranas que desempenham um papel importante como bombas de efluxo, fornecendo resistência a uma variedade de substâncias tóxicas aos fungos (SANGLARD et al., 1999). Urban,

Bhargava e Hamer (1999) observaram que o gene *pleiotropic drug resistance ABC transporter* é induzido em *M. grisea* quando o fungo é exposto a diversas substâncias antifúngicas, incluindo uma fitoalexina de arroz, e concluíram que o patógeno necessita dessas proteínas transportadoras para retirada de compostos de defesa da planta. Em *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, transcritos que codificam uma proteína *pleiotropic drug resistance ABC transporter* foram encontrados durante a germinação *in vitro* de esporos do patógeno, após 10 horas de incubação, sendo sugerido como um fator de defesa desta ferrugem à compostos da planta (ZHANG et al., 2008). Igualmente em *P. psidii*, os transcritos para *pleiotropic drug resistance ABC transporter* que foram encontrados durante a formação do apressório e das hifas de penetração podem estar relacionados aos mecanismos de defesa e desenvolvimento do patógeno.

Para fitopatógenos com pouca história de pesquisas moleculares, como é o caso de *P. psidii*, o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a germinação e diferenciação estrutural *in vitro* do patógeno e o sequenciamento em larga escala do RNA dessas estruturas representa um passo inovador para a definição de transcritos e obter informações sobre a regulação da expressão dos mesmos durante o processo inicial de infecção e crescimento do patógeno (OZSOLAK; MILOS, 2011; ZHANG et al., 2008).

A análise de expressão diferencial de transcritos de *P. psidii* gerados a partir da germinação e diferenciação de algumas estruturas de infecção *in vitro* foram associados a diversos processos biológicos das células. No entanto, alguns transcritos foram associados ao processo de reconhecimento do hospedeiro, germinação e infecção, incluindo alguns fatores de patogenicidade/virulência. Esses genes de *P. psidii* diferencialmente expressos *in vitro* são sugeridos como importantes fatores relacionados ao processo inicial de infecção de *P. psidii* e auxiliam uma melhor compreensão da interação planta-patógeno.

Referências

ADAMS, M.; KERLAVAGE, A.R.; FLEISCHMANN, R.D.; FULDNER, R.A.; BULT, C.J.; LEE, N.H.; KIRKNESS, E.F.; WEINSTOCK, K.G.; GOCAYNE, J.D.; WHITE, O. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, London, v. 377, n. 6547, p. 3-174, 1995.

AHN, N.; KIM, S.; CHOI, W.; IM, K. H.; LEE, Y. H. Extracellular matrix protein gene, EMP1, is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecules & Cells**, Singapore, v. 17, n. 1, p. 166-173, 2004.

ASAI, S.; RALLAPALLI, G.; PIQUEREZ, S. J. M.; CAILLAUD, M.; FURZER, O. J.; ISHAQUE, N.; WIRTHMUELLER, L.; FABRO, G.; SHIRASU, K.; JONES, J. D. G. Expression profiling during Arabidopsis/downy mildew interaction reveals a highly-expressed effector that attenuates responses to salicylic acid. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. e1004443, 2014.

ALVES, P.B.; BINI, A.P.; QUECINE, M.C. Expressão de lipases pelo fungo patogênico *Puccinia psidii* durante o processo de infecção de *Eucalyptus grandis*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA USP ,23., 2015, Piracicaba. **Anais...**: Piracicaba: EDUSP, 2015. p.1.

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

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, p. btu170, 2014.

BRAVO, G.R.; RUIZ, C.R.; RONCERO, M.I.G. Lipolytic System of the Tomato Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 26, n. 9, p. 1054-1067, 2013

CHEN, X.; LINE, R. F.; LEUNG, H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1489-1496, 1993.

COLLINS, T. J.; MOERSCHBACHER, B. M.; READ, N. D. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, n. 6, p. 259-266, 2001.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALON, 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.

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

DIANESE, J. C.; MORAES, T. S. A.; 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.

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 66, n. 1, p. 38-49, 1969.

- DI PIETRO, A.; RONCERO, M.I.G.; RUIZ-ROLDÁN M. C. From tools of survival to weapons of destruction: the role of cell wall-degrading enzymes in plant infection. In: ESSER, K., LEMKE PA. **Plant Relationships**. Berlin: Springer, 2009. p. 181-200.
- DUPLESSIS, S.; CUOMO, C.A.; LINC, Y.A.; AERTSD, A.; TISSERANTA, E.; FOURREYA, C.V.; JOLYE, D.L.; HACQUARDA, S.; AMSELEMF, J.; CANTARELG, B.L.; CHIUH, R.; COUTINHO, P.M.; FEAUE, N.; FIELDH, M.; FREYA, P.; GELHAYEA, E.; GOLDBERGB, J.; GRABHERRB, M.G.; KODIRAB, D.; KOHLERA, A.; KÜESI, U.; LINDQUISTD, E.A.; LUCASD, S.M.; MAGOJ, R.; MAUCELIB, E.; MORINA, E.; MURATA, C.; PANGILINAND, J.L.; PARKK, R.; PEARSONB, M.; QUESNEVILLEF, H.; ROUHIERA, N.; SAKTHIKUMARB, S.; SALAMOVD, A.A.; SCHMUTZD, J.; SELLESA, B.; HAPIROD, H.; TANGUAYE, P.; TUSKAND, L.G.A.; HENRISSATG, B.; VAN DE PEERC, I.; ROUZÉC, P.; ELLIS, J.G.; DODDS, P.N.; SCHEINH, J.E.; ZHONGM, J.; HAMELINE, R.C.; GRIGORIEVD, I.V.; SZABOM,N.L.J.; MARTINA, F. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 22, p. 9166-9171, 2011.
- ESPINO, J.J.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; BRITO, N.; SHAH, P.; ORLANDO, R.; GONZALEZ, C. The *Botrytis cinerea* early secretome. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 16, p. 3020-3034, 2010.
- FERNANDES, I.; ALVES, A.; CORREIA, A.; DEVREESE, B.; ESTEVES, A.C. Secretome analysis identifies potential virulence factors of *Diplodia corticola*, a fungal pathogen involved in cork oak (*Quercus suber*) decline. **Fungal biology**, Oxford, v. 118, n. 5, p. 516-523, 2014.
- FERNANDEZ, D.; TISSERANT, E.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.; VIEIRA, A.; PETITOT, A-S.; LOUREIRO, A.; POULAIN, J.; SILVA, C.; SILVA, M.C.; DUPLESSIS, S. Pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals *in planta*-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions reveals in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 1, p. 17-37, 2012.
- FIGUEIREDO, M. B.; PASSADOR, M. M. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, p. 117-134, 2008.
- FURTADO, G. Q.; FERRAZ FILHO, A. C.; CASTRO, H. A.; POZZA, E. A.; PFENNING, L. H. Germinação de urediniosporos de *Puccinia psidii* Winter em água e óleo mineral. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 29, n. 4, p. 309-312, 2003.
- GIBSON, D.M.; KING, B.C.; HAYES, M.L.; BERGSTROM, G.C. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. **Current opinion in microbiology**, London, v. 14, n. 3, p. 264-270, 2011
- GLEN, M.; ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 36, n. 1, p. 1-16, 2007.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.

GRAMBOW, H. J. The influence of volatile leaf constituents on the *in vitro* differentiation and growth of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 85, n. 4, p. 361-372, 1977.

GRAMBOW, H. J.; GRAMBOW, G. E. The involvement of epicuticular and cell wall phenols of the host plant in the *in vitro* development of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 90, n. 4, p. 1-9, 1978.

GRAMBOW, H. J.; RIEDEL, S. The effect of morphogenically active factors from host and nonhost plants on the *in vitro* differentiation of infection structures of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 213-224, 1977.

GRINYER, J.; KAUTTO, L.; TRAINI M.; WILLOWS, R.D.; TE'O, J.; BERGQUIST, P.; NEVALAINEN, H. Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. **Current genetics**, New York, v. 51, n. 2, p. 79-88, 2007.

HAAS, B. J.; KAMOUN, S.; ZODY, M. C.; JIANG, R. H. Y.; HANDSAKER, R. E.; CANO, L. M.; GRABHERR, M.; KODIRA, C. D.; RAFFAELE, S.; TORTO-ALALIBO, T.; BOZKURT, T. O.; AH-FONG, A. M. V.; ALVARADO L., ANDERSON V. L., ARMSTRONG M. R., AVROVA A.; BAXTER, L.; BEYNON, J.; BOEVINK, P. C.; BOLLMANN, S. R.; BOS, J. I. B.; BULONE, V.; CAI, G.; CAKIR, C.; CARRINGTON, J. C.; CHAWNER, M.; CONTI, L.; COSTANZO, S.; EWAN, R.; FAHLGREN, N.; FISCHBACH, M. A.; FUGELSTAD, J.; GILROY, E. M.; GNERRE, S.; GREEN, P. J.; GRENVILLE-BRIGGS, L. J.; GRIFFITH, J.; GRÜNWARD, N. J.; HORN, K.; HORNER, N. R.; HU, C.-H.; HUITEMA, E.; JEONG, D.-H.; JONES, A. M. E.; JONES, J. D. G.; JONES, R. W.; KARLSSON, E. K.; KUNJETI, S. G.; LAMOUR, K.; LIU, Z.; MA, L.; MACLEAN, D.; CHIBUCOS, M. C.; MCDONALD, H.; MCWALTERS, J.; MEIJER, H. J. G.; MORGAN, W.; MORRIS, P. F.; MUNRO, C. A.; O'NEILL, K.; OSPINA-GIRALDO, M.; PINZÓN, A.; PRITCHARD, L.; RAMSAHOYE, B.; REN, Q.; RESTREPO, S.; ROY, S.; SADANANDOM, A.; SAVIDOR, A.; SCHORNACK, S.; SCHWARTZ, D. C.; SCHUMANN, U. D.; SCHWESSINGER, B.; SEYER, L.; SHARPE, T.; SILVAR, C.; SONG, J.; STUDHOLME, D. J.; SYKES, S.; THINES, M.; VONDERVOORT, P. J. I. VAN DE; PHUNTUMART, V.; WAWRA, S.; WEIDE, R.; WIN, J.; YOUNG, C.; ZHOU, S.; FRY, W.; MEYERS, B. C.; WEST, P. VAN; RISTAINO, J.; GOVERS, F.; BIRCH, P. R. J.; WHISSON, S. C.; JUDELSON, H. S.; NUSBAUM, C. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, New York, v. 461, n. 7262, p. 393-398, 2009.

HAAS, B.J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P. D.; BOWDEN, J.; COUGER, M. B.; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER, M.; MACMANES, M. D.; OTT, M.; ORVIS, J.; POCHET, N.; STROZZI, F.; WEEKS, N.; WESTERMAN, R.; WILLIAM, T.; DEWEY, C. N.; HENSCHER, R.; LEDUC, R. D.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, Cambridge, v. 8, n. 8, p. 1494-1512, 2013.

HEATH, M. C.; PERUMALLA, C. J. Haustorial mother cell development by *Uromyces vignae* on collodion membranes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, n. 4, p. 736-741, 1988.

HOCH, H. C.; STAPLES, R. C. Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 231-247, 1987.

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

HU, G.G.; LINNING, R.; MCCALLUM, B.; BANKS, T.; CLOUTIER, S.; BUTTERFIELD, Y.; LIU, J.; KIRKPATRICK, R.; STOTT, J.; YANG, G.; SMAILUS, D.; JONES, S.; MARRA, M.; SCHEIN, J.; BAKKEREN, G. Generation of a wheat leaf rust, *Puccinia triticina*, EST database from stage-specific cDNA libraries. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 4, p. 451-467, 2007.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **IBÁ 2015**, Brasília, 2015. 80 p

JAKUPOVIĆ, M.; HEINTZ, M.; REICHMANN, P.; MENDGEN, K.; HAHN, M. Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, n. 1, p. 8-19, 2006

KAPETANAKOU, A.; AMPAVI, A.; YANNIOTIS, S.; DROSINOS, E. H.; SKANDAMIS, P. N. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* *in vitro* and evaluation in food matrices of different viscosity. **Food Microbiology**, London, v. 28, n. 4, p. 727-735, 2011.

KEMEN, E.; GARDINER, A.; SCHULTZ-LARSEN, T.; KEMEN, A.C.; BALMUTH, A.L.; ROBERT-SEILANIANTZ, A.; BAILEY, K.; HOLUB, E.; STUDHOLME, D.J.; MACLEAN, D.; JONES, J.D.G. Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of *Arabidopsis thaliana*. **Plos Biology**, San Francisco, v.9, n. 7, p. e1001094, 2011.

KEMEN, E.; KEMEN, A.C.; RAFIQI, M.; HEMPEL, U.; MENDGEN, K.; HAHN, M.; VOEGELE, R.T. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 11, p. 1130-1139, 2005.

KIM, S. T.; YU, S.; KIM, S. G.; KIM, H. J.; KANG, S. Y.; HWANG, D. H.; JANG, Y. S.; KANG, K. Y. Proteome analysis of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) proteome during appressorium formation. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 11, p. 3579-3587, 2004.

KLOSE, J.; DE SÁ, M.M.; KRONSTAD, J.W. Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. **Molecular microbiology**, v. 52, n. 3, p. 823-835, 2004.

LEITE, T.F.; MOON, D.H.; LIMA, A.C.M.; LABATE, C.A.; TANAKA, F.A.O. A simple protocol for whole leaf preparation to investigate the interaction between *Puccinia psidii* and *Eucalyptus grandis*. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 42, n. 1, p. 79-84, 2013.

LORYS, M. M. A.; VILLARÉAL, C. L.; CLAUDE DE VALLAVIEILLE-POPE, C. N. Genetic variability in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* populations sampled on a local scale during natural epidemics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6138-6145, 2002.

MARQUES, F.G. **Análise de metabólitos e proteínas totais em folhas de *Eucalyptus grandis* durante a infecção por *Puccinia psidii***. 2016. 120p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 367-386, 1996.

METZKER, M.L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MUELLER, O.; LIGHTFOOT, S.; SCHROEDER, A. **RNA Integrity Number (RIN) standardization of RNA quality control**. 2004. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-1165EN.pdf>>. Acesso em: 09 jun. 2015.

MURPHY, C.; POWLOWSKI, J.; WU, M.; BUTLER, G.; TSANG, A. Curation of characterized glycoside hydrolases of fungal origin. **Database**, Oxford, v. 2011, p. bar020, 2011.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; DAMM, U.; BUIATE, E. A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N.; ALTMÜLLER, J.; ALVARADO-BALDERRAMA, L.; BAUSER, C. A.; BECKER, C.; BIRREN, B. W.; CHEN, Z.; CHOI, J.; CROUCH, J. A.; DUVICK, J. P.; FARMAN, M. A.; GAN, P.; HEIMAN, D.; HENRISSAT, B.; HOWARD, R. J.; KABBAGE, M.; KOCH, C.; KRACHER, B.; KUBO, Y.; LAW, A. D.; LEBRUN, M.; LEE, Y.; MIYARA, I.; MOORE, N.; NEUMANN, U.; NORDSTRÖM, K.; PANACCIONE, D. G.; PANSTRUGA, R.; PLACE, M.; PROCTOR, R. H.; PRUSKY, D.; RECH, G.; REINHARDT, R.; ROLLINS, J. A.; ROUNSLEY, S.; SCHARDL, C. L.; SCHWARTZ, D. C.; SHENOY, N.; SHIRASU, K.; SIKHAKOLLI, U. R.; STÜBER, K.; SUKNO, S. A.; SWEIGARD, J. A.; TAKANO, Y.; TAKAHARA, H.; TRAIL, F.; VAN DER DOES, H. C.; VOLL, L. M.; WILL, I.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B.; SCHULZE-LEFERT, P.; VAN THEMAAT, E. V. L.; MA, L.; VAILLANCOURT, L.J. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, New York, v. 44, n. 9, p. 1060-1065, 2012.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews**, London, v. 12, n. 2, p. 87-98, 2011.

PHALIP, V.; DELALANDE, F.; CARAPITO, C.; GOUBET, F.; HATSCH, D.; LEISE-WAGNER, E.; DUPREE, P.; DORSSELAER, A.; JELTSCH, J. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. **Current genetics**, New York, v. 48, n. 6, p. 366-379, 2005.

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

QUECINE, M.C.; LEITE, T.F.; BINI, A.P.B.; REGIANI, T.; FRANCESCHINI, L.M.; BUDZINSKI, I.G.F.; MARQUES, F.G.; LABATE, M.T.V.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; MOON, D.H.; LABATE, C.A. Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of *Puccinia psidii* Uredospores Reveals Differences of Fungal Populations Infecting Eucalyptus and Guava. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0145343, 2016.

QUECINE, M. C.; MOON, D. H.; FRANCESCHINI, L. V.; BINI, A. P.; LEITE, T. F.; LABATE, C. A. *De novo* partial genome assembly of the biotrophic eucalyptus rust pathogen *Puccinia psidii*. In: International Congress on Molecular Plant-Microbe Interaction, XV, 2012, **Anais...**: Kioto: MPMI press, 2012, p. 45-45.

QUTOB, D.; KAMOUN, S.; GIJZEN, M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 361-373, 2002.

RAMOS, A. J.; MAGAN, N.; SANCHIS, V. Osmotic and matric potential effects on growth, sclerotia and partitioning of polyols and sugars in colonies and spores of *Aspergillus ochraceus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 2, p. 141-147, 1999.

ROBERTS, A.; PACHTER, L. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. **Nature Methods**, New York, v. 10, n. 1, p. 71-73, 2013.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, London, v. 11, n. 3, p. 1, 2010.

RONCERO, C.; SANCHEZ, A.D.; VALDIVIESO, M.H. Chitin Synthesis and Fungal Cell Morphogenesis. In: ESSER, K., LEMKE P.A. **The Mycota Biochemistry and Molecular Biology**. Springer International Publishing, 2016. p. 167-190.

ROTHBERG, J.M.; LEAMON, J.H. The development and impact of 454 sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 10, p. 1117-1124, 2008.

REUVENI, M.; SHEGLOV, N.; ESHEL, D.; PRUSKY, D.; BEN-ARIE, R. Virulence and the Production of Endo-1, 4- β -glucanase by Isolates of *Alternaria alternata* Involved in the Moldy-core Disease of Apples. **Journal of phytopathology**, Hoboken, v. 155, n. 1, p. 50-55, 2007.

SANDHU, K.S.; KARAOGLU, K.; ZHANG, P.; PARK, R.F. Simple sequence repeat markers support the presence of a single genotype of *Puccinia psidii* in Australia. **Plant Pathology**, Hoboken, v.1, p.1-11, 2016.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; MONOD, M.; BILLE, J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, lausanne v. 40, n. 10, p. 2300-2305, 1996.

SILVA, R. A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. **Embrapa Agrobiologia. Documentos**, 2008.

SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, Oxford, p. btv351, 2015.

TANIGUTI, L.M.; SCHAKER, P.D.C.; BENEVENUTO, J.; PETERS, L.P.; CARVALHO, G.; PALHARES, A.; QUECINE, M.C.; NUNES, F.R.S.; KMIT, M.C.P.; WAI, A.; HAUSNER, G.; AITKEN, K.S.; BERKMAN, P.J.; FRASER, J.A.; MOOLHUIJZEN, P.M.; COUTINHO, L.L.; CRESTE, S.; VIEIRA, M.L.C.; KITAJIMA, J.P.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. Complete genome sequence of *Sporisorium scitamineum* and biotrophic interaction transcriptome with sugarcane. **Plosone**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0129318, 2015.

TISSERANT, E.; KOHLER, A.; DOZOLME-SEDDAS, P.; BALESTRINI, R.; BENABDELLAH, K.; COLARD, A.; CROLL, D.; DA SILVA, C.; GOMEZ, S.K.; KOUL, R.; FERROL, N.; FIORILLI, V.; FORMEY, D.; FRANKEN, PH.; HELBER, N.; HIJRI, M.; LANFRANCO, L.; LINDQUIST, E.; LIU, Y.; MALBREIL, M.; MORIN, E.; POULAIN, J.; SHAPIRO, H.; VAN TUINEN, D.; WASCHKE, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BÉCARD, G.; BONFANTE, P.; HARRISON, M.J.; KÜSTER, H.; LAMMERS, P.; PASZKOWSKI, U.; REQUENA, N.; RENSING, S.A.; ROUX, C.; SANDERS, I.R.; SHACHAR-HILL, Y.; TUSKAN, G.; YOUNG, J.P.W.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARTIN, F. The transcriptome of the arbustular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligat symbiont. **New Phytologist**, Cambridge, v. 193, n. 3, p. 755-769, 2011.

WHISSON, S. C.; BOEVINK, P. C.; MOLELEKI, L.; AVROVA, A. O.; MORALES, J. G.; GILROY, E. M.; ARMSTRONG, M. R.; GROUFFAUD, S.; WEST, P. VAN; CHAPMAN, S.; HEIN, I.; TOTH, I. K.; PRITCHARD, L.; BIRCH, P. R. J. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. **Nature**, New York, v. 450, n. 7166, p. 115-118, 2007.

WIETHOLTER, N.; HORN, S.; REISIG, K.; BEIKE, U.; MOERSCHBACHER, B. M. *In vitro* differentiation of haustorial mother cells of the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, triggered by the synergistic action of chemical and physical signals. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 3, p. 320-326, 2003.

WILLIAMS, P. G.; SCOTT, K. J.; KUL, J. L.; MACLEAN, D. J. Sporulation and pathogenicity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* grown on an artificial medium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 3, p. 326-327, 1967.

URBAN, M.; BHARGAVA, T.; HAMER, J.E. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. **The EMBO Journal**, New York, v. 18, n. 3, p. 512-521, 1999.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, n. 5235, p. 484, 1995.

VOIGT, C.A.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S.A. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. **Plant Journal**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 364-375, 2005.

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

ZHANG, Y.; QU, Z.; ZHENG, W.; LIU, B.; WANG, X.; XUE, X.; XU, L.; HUANG, L.; HAN, Q.; ZHAO, J.; KANG, Z. Stage-specific gene expression during urediniospore germination in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **BMC Genomics**, Chichester, v. 9, n. 1, p. 203-213, 2008.

ZORN, H.; PETERS, T.; NIMTZ, M.; BERGER, R. The secretome of *Pleurotus sapidus*. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 18, p. 4832-4838, 2005.

4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA CERA CUTICULAR DE FOLHAS DE *Eucalyptus grandis* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS À FERRUGEM

Resumo

As superfícies das folhas das plantas são revestidas por uma cutícula composta por cutina associada a lipídeos. A cutícula é, portanto, a região de primeiro contato de diversos organismos com a planta. Quando os uredósporos de um patógeno biotrófico se instalam sobre as plantas, se deparam primeiramente com essa camada de cera sobre a superfície foliar que pode fornecer sinais importantes ao patógeno e influenciar sua germinação e desenvolvimento inicial. Estudos que visam estabelecer uma correlação entre a composição dessas cutículas e a resistência/suscetibilidade do hospedeiro ao patógeno podem auxiliar na investigação dessas interações. O presente trabalho teve como objetivos realizar uma análise *fingerprinting* da composição das ceras de *Eucalyptus grandis* resistente e susceptível à ferrugem, e sugerir possíveis classes químicas presentes nesses extratos cuticulares que se assemelham às substâncias presentes no azeite de oliva e que influenciaram a germinação *in vitro* dos uredósporos de *Puccinia psidii* Winter. Para tanto, no presente trabalho foi realizada a comparação dos perfis metabólicos obtidos para as ceras cuticulares de eucalipto com o perfil metabólico do azeite de oliva, por meio da espectrometria de massas. Por MALDI TOF/TOF e GC-MS, a análise de componentes principais (PCA) demonstrou uma nítida separação dos três grupos estudados. Os resultados sugerem que a composição das ceras cuticulares pode estar relacionada com a resistência de *E. grandis* à *P. psidii* visto que o *m/z* 751.0658 e os metabólitos *2-Hydroxytetradecanoic acid* e *Hesperetin* foram apontados como possíveis biomarcadores de resistência. Por GC-MS 18 metabólitos característicos das ceras cuticulares de plantas foram detectados nas plantas R03 e S04 e também no azeite de oliva. Estes metabólitos pertencentes as classes: alcanos, ácidos graxos, cetonas e flavonoides, foram apontados como moléculas candidatas a estarem envolvidas nos processos de germinação e desenvolvimento inicial de *P. psidii*. Alguns metabólitos presentes nos extratos das ceras cuticulares de folhas de *E. grandis* resistentes e susceptíveis e no azeite de oliva, podem exercer o papel de moléculas sinalizadoras para reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno *P. psidii* e influenciar sua germinação e desenvolvimento. Os resultados obtidos no presente trabalho fornecem alguns indícios para a compreensão dos processos iniciais envolvidos na interação *E. grandis* - *P. psidii*.

Palavras-chave: MALDI TOF/TOF; GC-MS; Ceras cuticulares; *Puccinia psidii*; Análise *fingerprinting*; Lipídeos

Abstract

Wax is the term used to describe lipid components of the cuticle which covers the outer surface of aerial plant tissues. The physical and chemical properties of cuticular wax determines its functions vital for plant life, and is believed to play important roles in plant-pathogens interactions. The cuticle is the first interface between pathogen and plant, and some compounds in this surface can influence on pathogen adhesion and recognition. Therefore, when uredospores from biotrophic pathogens get in contact with the plant, they encounter the cuticle that provides important signals to the pathogen. These signals trigger the early events of the infection process, such as fungal germination and differentiation. This study aimed to perform a fingerprinting analysis of cuticular waxes in *Eucalyptus grandis*, resistant and susceptible to *Puccinia psidii* Winter and suggest possible chemical signals present in cuticular waxes that might play important roles in recognition of host, germination and development of *P. psidii*. For that, lipid profiles obtained by mass spectrometry from eucalyptus cuticular waxes were compared with the lipid profile of olive oil which promotes *in vitro* germination of *P. psidii*. The m/z 751.0658 and the metabolites 2-Hydroxytetradecanoic acid and Hesperetin have been suggested as possible resistance biomarkers in *E. grandis*. By GC-MS some alkane, fatty acid, flavonoid and ketone metabolites were present in the three groups analyzed, suggesting their function in host recognition and germination of *P. psidii*. These results suggest that the composition of cuticular waxes might be related to *E. grandis* resistance to *P. psidii*. In addition, some metabolites present in the extracts of cuticular waxes of *E. grandis* leaves can play important roles in signaling for recognition, germination and development of *P. psidii* in their host. This work provides some evidences to a better understanding of processes involved in the early events of *E. grandis* - *P. psidii* interactions.

Keywords: MALDI TOF/TOF; GC-MS; Cuticular wax; *Puccinia psidii*; Fingerprinting analysis; Lipids

4.1 Introdução

Durante o processo inicial de infecção de patógenos biotróficos em seus hospedeiros, uma série sofisticada de estruturas de infecção (tubo germinativo, apressório, hifa de penetração, vesícula subestomática, hifas de infecção, células-mãe do haustório e haustório) são requisitos necessários para que o patógeno penetre, colonize e se multiplique a partir do tecido vivo com um mínimo de perturbação da célula hospedeira (WIETHOLTER et al., 2003).

O primeiro passo em qualquer interação típica planta-patógeno envolve o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno (FERREIRA et al., 2006). A superfície aérea das plantas revestidas por uma cutícula é o local inicial de contato de diversos patógenos com a planta, o que faz com que as características dessa superfície tenham papel fundamental na interação planta-patógeno (RINGELMAN et al., 2009).

A cutícula das plantas é composta por cutina associada a lipídeos, também designados ceras cuticulares (JETTER; SCHÄVER; RIEDERER, 2000).

Quando os uredósporos de um patógeno caem sobre seu hospedeiro, esses entram em contato com as ceras cuticulares da superfície foliar (KOLATTUKUDY et al., 1995). A cutícula das plantas é um mecanismo de defesa pré-formado e tem como uma de suas funções proporcionar proteção mecânica contra a invasão de patógenos. Por outro lado, algumas moléculas presentes nessa estrutura podem ter efeito no reconhecimento e adesão do patógeno ao hospedeiro, permitindo o início da interação planta-patógeno (MÜLLER; RIEDERER, 2005; RINGELMANN et al., 2009; ROSTÁS et al., 2008).

Os mecanismos de defesa físicos e químicos pré-formados da planta garantem resistência a quase todos os ataques de parasitas de uma forma amplamente eficaz e durável. Embora sejam objetos de poucas pesquisas, esses mecanismos pré-formados podem ser explorados para introduzir características de resistência e suscetibilidade em plantas comerciais (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003).

A utilização da superfície das plantas como sinal para germinação e o desenvolvimento de patógenos biotróficos tem sido sugerida por vários autores. Especificamente, os eventos iniciais do processo de infecção como germinação e diferenciação das estruturas iniciais de infecção do fungo (tubo germinativo, apressório e hifa de penetração) parecem ser desencadeados por propriedades específicas da superfície da planta (GNIWOTTA et al., 2005; IWAMOTO et al., 2002; RINGELMANN et al., 2009; TESSMANN; DIANESE, 2002; TSUBA et al., 2002; ZABKA et al., 2008). Os principais sinais do hospedeiro utilizados no reconhecimento por patógenos são hidrofobicidade, rigidez, composição química e as propriedades topográficas da superfície da planta (MENDGEN; HAHN; DEISING, 1996).

Tessmann e Dianese (2002) evidenciaram a sinalização dada pela cera cuticular de plantas de jamba ao isolar o composto hentriacontano, um alcano de cadeia linear (C₃₁H₆₄), capaz de aumentar a germinação de uredósporos de *Puccinia psidii* Winter em 88%. Por outro lado, os metabólitos extraídos das ceras cuticulares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e analisados por GC-MS não indicaram diferenças nítidas entre as cultivares suscetível e resistente à ferrugem alaranjada da cana, causada por *Puccinia kuehnii* (SILVA, 2014).

Para auxiliar a compreensão dos processos iniciais envolvidos na interação *Eucalyptus grandis* - *P. psidii*, o presente estudo teve como objetivos: (i) realizar uma análise *fingerprinting* entre os genótipos de *E. grandis* resistente e susceptível à ferrugem e (ii) identificar possíveis sinais químicos presentes no extrato clorofórmico das ceras cuticulares de folhas de *E. grandis* que influenciam a germinação dos uredósporos.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Material Biológico

Os materiais vegetais utilizados foram plântulas de *E. grandis* clone S04 suscetíveis e clone R03 resistentes ao patógeno *P. psidii* selecionadas a partir da progênie de meio-irmãos do clone Brasuz (LEITE, 2012).

4.2.2 Extrato clorofórmico da cera cuticular de *E. grandis* e do azeite de oliva

Para extração das ceras cuticulares das folhas, foram utilizadas folhas jovens de mudas de eucalipto dos genótipos resistente (R03) e suscetível (S04) de *E. grandis* para as análises por MALDI-TOF/TOF (três folhas por planta) e GC-MS (15 folhas por planta). Uma planta foi considerada uma repetição biológica e foram realizadas 5 repetições biológicas para cada tratamento (R03, S04). A extração das ceras cuticulares foi realizada com clorofórmio (solvente apolar) de acordo com o protocolo de Viana et al. (2010). As folhas foram destacadas das plantas e imediatamente imersas (lavadas) em 5 mL de clorofórmio (clorofórmio PA, Sigma-Aldrich) durante 30 segundos sob leve agitação. Após remoção das folhas, o extrato clorofórmico foi seco em concentrador a vácuo (*SpeedVac*-Eppendorf) por 20 minutos. Para o preparo do extrato clorofórmico do azeite de oliva (substância promotora da germinação *in vitro* de *P. psidii*) foram misturados 1 mL de azeite de oliva comercial (Galo extravirgem, lote 30170A097) e 1 mL de clorofórmio. Essa mistura foi homogeneizada e seca da mesma forma que o extrato obtido para as folhas de *E. grandis*. As massas dos extratos secos foram obtidas em balança analítica para posterior normalização dos dados.

4.2.3 Análise por MALDI-TOF/TOF, processamento dos dados e análise estatística

Os extratos secos das ceras cuticulares das folhas e o extrato do azeite de oliva foram diluídos em 40 μL de solução de clorofórmio:metanol 1:1 (v/v) e 1 μL de cada amostra foi aplicado 2 vezes sobre a placa de MALDI. Após a evaporação dos solventes, 1 μL de ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHB) ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi depositado sobre cada amostra. Foram feitas 3 repetições técnicas para cada repetição biológica de cada amostra.

Os perfis metabólicos do extrato das ceras cuticulares das plantas e do extrato do azeite de oliva foram gerados por meio da análise de MALDI-TOF/TOF 5800 (Absciex), no modo positivo e laser de 6000 Hz, calibrado com peptídeos comerciais (Absciex) com relação massa carga (m/z) dentro da faixa dinâmica de aquisição. Os espectros foram adquiridos na faixa de m/z 700-1200, característica para moléculas lipídicas (KHALIL et al., 2010).

Os valores de m/z gerados pela análise de MALDI-TOF/TOF foram transferidos para uma planilha Excel e as intensidades dos íons foram normalizadas pelo peso do extrato obtido para cada amostra. Os íons que apresentaram valor de intensidade igual a zero em mais de 50% das amostras de cada grupo foram removidos.

Os valores de intensidade dos íons foram filtrados por “intervalo interquartil” (*Interquartile Range* - IQR) e normalizados por transformação em log (*log transformation*) e escalonados por Pareto (*Pareto scaling*) para a realização das análises de componentes principais (PCA) e de Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) utilizando o programa *MetaboAnalyst* (XIA et al., 2011).

A PCA não leva em consideração os grupos analisados (teste estatístico não supervisionado), mas sim as características de cada indivíduo e cada componente principal (CP), o qual é constituído a partir da combinação linear das variáveis originais. Ela permite a observação da tendência de separação/formação de grupos nas amostras analisadas e permite também que amostras discrepantes (*outliers*) sejam identificadas (SENGUPTA et al., 2011).

A PLS-DA é um dos principais métodos multivariados utilizados na análise estatística e interpretação dos dados gerados nos experimentos de metabolômica. A

PLS-DA é um método de regressão linear supervisionado que permite a classificação ou agrupamento (*clustering*) das amostras e é utilizada para determinar quais são as variáveis responsáveis por predizerem as classes (grupos formados), explicando assim a variabilidade entre os dados (RUBINGH et al., 2006). Na PLS-DA foram observados os valores de R^2 , que indica a variação descrita pelo modelo e Q^2 , que indica a acurácia e habilidade preditiva do modelo (SZYMAŃSKA et al., 2012).

Os metabólitos diferencialmente abundantes foram determinados por meio do Índice de Importância da Variável (*variable importance in projection* – VIP), o qual utiliza a soma ponderada dos quadrados dos *loadings* da PLS para estabelecer quais variáveis mais contribuíram para a formação dos grupos. Os valores de massa/carga (m/z) que apresentaram diferença estatística entre os grupos S04, R03 e azeite de oliva foram selecionados como possíveis biomarcadores e foram identificados pelo banco de dados LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) considerando erro máximo de 0,5 Da com relação a exatidão de massa e aductos $[M-H]^+$, $[M-Na]^+$ e $[M-K]^+$. Considerando-se as massas dos íons diferentemente expressos de interesse, a análise do perfil de fragmentação foi realizada pelo experimento de MS/MS individualmente para elucidação estrutural da subclasse de cada íon analisado. As estruturas das moléculas identificadas no LIPID MAPS foram importadas e fragmentadas teoricamente pelo programa ACD/MS Structure ID suite (ACD/Labs, Toronto, Canadá). Os fragmentos propostos pelo programa foram comparados aos fragmentos gerados pela técnica de MS/MS e a identificação dos mesmos foi aceita ou rejeitada de acordo com suas similaridades.

4.2.4 Análise por GC-MS, processamento dos dados e análise estatística

Para as análises por GC-MS, foram utilizados 1mg de cada extrato das ceras cuticulares e 3 mg do extrato do azeite de oliva. A essas amostras foram adicionados os compostos isotopicamente marcados: ácido succínico (D4, 98% - DLM 584-5), ácido mirístico (1, 2, 3 – $^{13}C_3$, 99% - CLM 3665- 0.5) e ácido palmítico (1, 2, 3, 4 – $^{13}C_4$), preparados na concentração de 1 mg.mL^{-1} e utilizados como padrões externos. Para derivatizar as amostras, foram adicionados $30 \mu\text{L}$ de metoxiamina (15 mg.mL^{-1}) em piridina e as amostras foram agitadas por 10 min. Em seguida, as amostras foram mantidas em repouso por 16 h à temperatura ambiente. A siliilação foi realizada com a adição de $30 \mu\text{L}$ de MSTFA (*N*-metil-trimetilsilil-

trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) e as amostras foram mantidas em repouso por 1 h. Posteriormente, foram adicionados 30 μL de heptano. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) de acordo com Gullberg et al. (2004), com algumas modificações. Foram utilizadas amostras controles (brancos) e uma série de alcanos (C_{12} - C_{40}) como referência para o cálculo dos índices de retenção (SCHAUER et al., 2005).

As amostras derivatizadas foram automaticamente injetadas (1 μL) no modo *splitless* em cromatógrafo gasoso (7890A *Agilent Technologie*) equipado com duas colunas de sílica fundida, sendo a coluna da primeira dimensão (DBE) de 20 m comprimento x 0,18 mm diâmetro interno x 0,18 μm de filme e a coluna da segunda dimensão RTX-17 (Restek) de 0,69 m x 0,10 mm diâmetro interno x 0,10 μm de filme (*Agilent J&W Scientific*). A temperatura de injeção foi 280°C, com fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, iniciado após 300 s do início da aquisição dos dados. A temperatura inicial da primeira coluna foi de 80°C, mantida por 2 minutos e aumentada 10°C/minuto até atingir 305°C que foram mantidos por 10 minutos. Para a segunda coluna, a temperatura inicial foi de 85°C, mantida por 2 minutos e aumentada 10°C/minuto até atingir 310°C que foram mantidos por 10 minutos. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do equipamento GC x GC-MS (Pegasus 4D, Leco, St. Joseph, USA). Foram utilizados os seguintes parâmetros: temperatura da fonte de íons igual a 250°C, feixe de elétrons igual a 70-eV, corrente de ionização de 2.0 mA e 20 espectros. s^{-1} e a voltagem do detector igual a 1500 V. Foram registrados valores na faixa de m/z 40-800.

O processamento dos dados de GC-MS foi realizado em duas etapas. Inicialmente os cromatogramas gerados foram exportados para o programa *ChromaTOF* (versão 4.32), no qual foi realizada a correção da linha de base e conversão dos dados para arquivos netCDF. Em seguida, realizaram-se as etapas de deconvolução, obtenção do índice de retenção (RI), correção do tempo de retenção (RT) e alinhamento de picos e identificação dos metabólitos com o auxílio do pacote *TargetSearch* (CUADROS-INOSTROZA, 2009) no ambiente R (<http://www.R-project.org>). Para identificação dos metabólitos, foi utilizada a biblioteca GMD (*The Golm Metabolome Database*, disponível em <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>). Como parâmetro para identificação dos metabólitos foi utilizado o desvio do RI de ± 2 segundos. Foram considerados metabólitos válidos apenas

aqueles com três ou mais massas características no espectro de fragmentação e score igual ou maior a 600.

Para normalização dos dados, a intensidade de cada metabólito foi dividida pelo peso do extrato clorofórmico seco obtido das plantas (1 mg) e do azeite de oliva (3 mg) e pela contagem iônica total (*TIC*) de cada amostra. Os metabólitos que apresentaram valor de intensidade zero em mais de 50% das amostras de cada grupo foram removidos. A matriz de dados resultantes foi analisada estatisticamente utilizando o programa *MetaboAnalyst* (XIA et al., 2011), no qual os valores foram filtrados por “intervalo interquantil” (*Interquantile Range - IQR*), normalizados pela mediana, transformados em log (*log transformation*) e escalonados por Pareto (*Pareto scaling*). Os dados gerados foram analisados por PCA para identificar a tendência de separação dos grupos. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para identificar os metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos ($p < 0,05$) e foi seguida do teste *pos-hoc* de Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$).

4.3 Resultados

4.3.1 Análise dos metabólitos por MALDI-TOF/TOF

Os espectros de *m/z* gerados para as 5 repetições biológicas foram muito similares entre todas as amostras de cada tratamento (R03, S04 e azeite de oliva). Para verificar a reprodutibilidade da técnica de MALDI-TOF/TOF, três repetições técnicas foram feitas para cada uma das 5 repetições biológicas de cada grupo amostrado (R03, S04 e azeite de oliva). Para todas as amostras testadas, as três repetições técnicas apresentaram perfis de espectros muito similares, indicando a reprodutibilidade da técnica de MALDI-TOF/TOF para a caracterização do perfil metabólico do extrato de ceras cuticulares de folhas de *E. grandis* e do extrato do azeite de oliva.

Após o processamento dos dados, 1065 prováveis metabólitos (*m/z*) distribuídos nos tratamentos foram considerados para a realização das análises. A distribuição dos prováveis metabólitos nos tratamentos pode ser observada no diagrama de Venn (Figura 4.1).

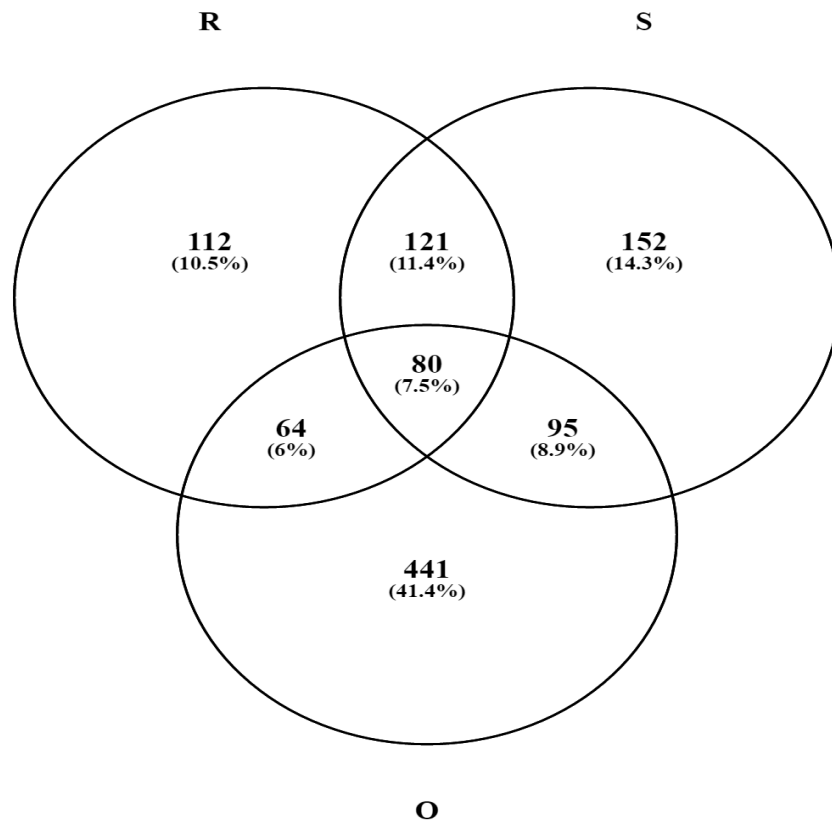


Figura 4.1 - Diagrama de Venn representando os 1065 prováveis metabólitos (m/z) obtidos por MALDI-TOF/TOF e como estes m/z estão distribuídos nos diferentes tratamentos. **R**- Plantas R03, **S**- Plantas S04 e **O**- Azeite de Oliva. Os prováveis metabólitos (m/z) comuns entre os tratamentos encontram-se nas intersecções dos balões

As primeiras análises realizadas a partir dos espectros obtidos foi a PCA e o *heatmap* (Figura 4.2). Estes foram construídos por meio da comparação dos conjuntos de dados dos três tratamentos (Plantas S04 *versus* R03 *versus* azeite de oliva) sendo possível observar uma tendência de separação entre os três grupos de estudo e também uma aproximação de dois grupos: plantas suscetíveis e azeite de oliva (Figura 4.2-B).

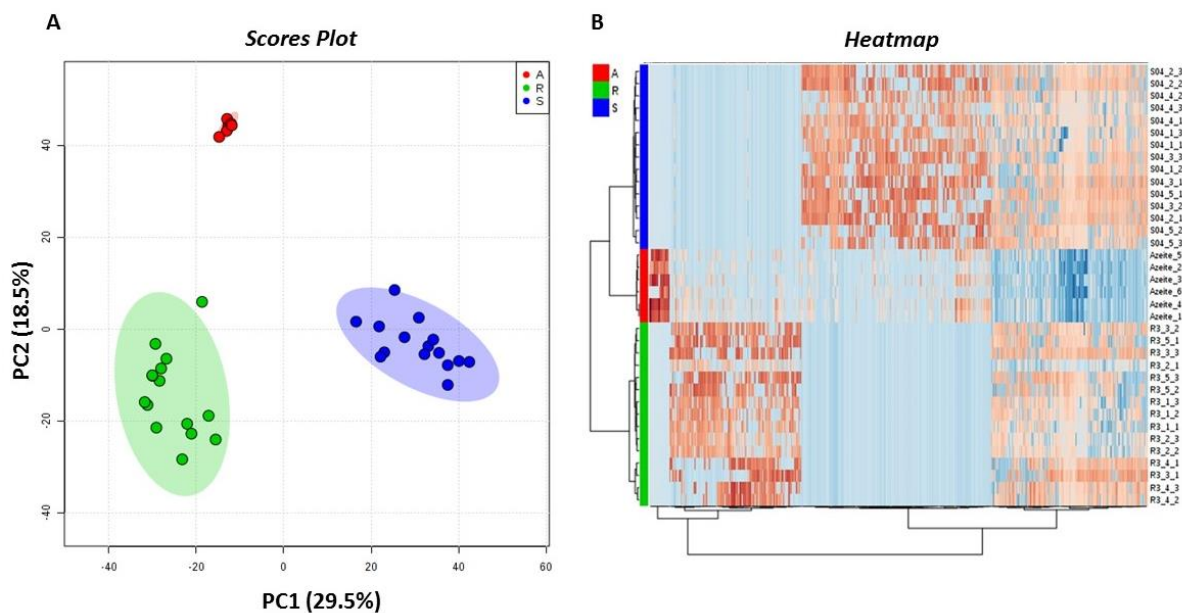


Figura 4.2 - PCA 2D *Scores Plot* (A) e *Heatmap* (B) da comparação entre os 3 grupos de estudo (Plantas S04 versus R03 versus azeite de oliva). Em (A) e (B) o conjunto de dados obtidos para as repetições biológicas e técnicas das Plantas S04 (S) é representado pela cor azul, o das Plantas R03 (R) pela cor verde e o do azeite de oliva (A) pela cor vermelha

A soma dos três primeiros componentes principais da PCA explica 53,7 % da variância dos dados do modelo.

Em seguida, foi realizada a análise PLS-DA que confirmou a separação dos 3 grupos de estudo, evidenciando que existem diferenças entre os tratamentos em termos de metabólitos com m/z característicos de lipídeos (Figura 4.3).

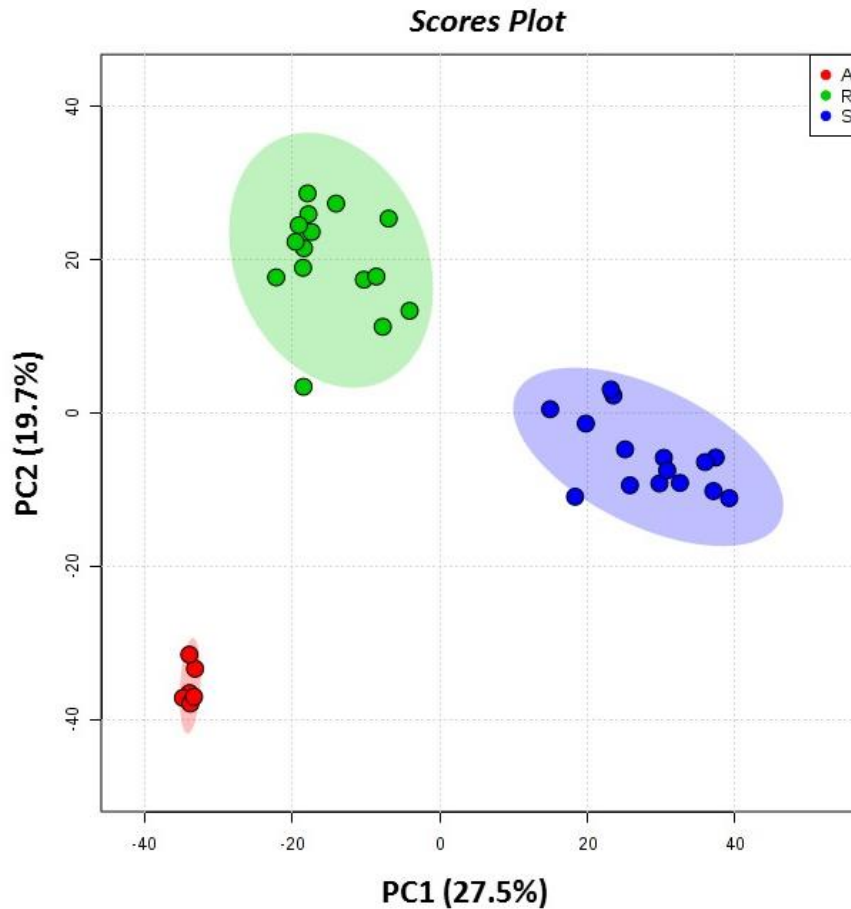


Figura 4.3 - PLS-DA 2D Scores Plot da comparação entre os 3 tratamentos (Plantas S04 versus R03 versus azeite de oliva). O conjunto de dados obtidos para as repetições biológicas e técnicas das Plantas S04 (S) é representado pela cor azul, o das Plantas R03 (R) pela cor verde e o do azeite de oliva (A) pela cor vermelha

Na validação cruzada realizada pelo modelo de PLS-DA foram observados que os três primeiros componentes explicam 52.6% da variância observada entre os tratamentos e apresentaram valores de $R^2 = 0.98856$ e $Q^2 = 0.95646$. Valores de R^2 e Q^2 acima de 0.7 indicam, respectivamente, boa variação descrita pelo modelo e a precisão ou habilidade preditiva do modelo para os componentes analisados (SZYMAŃSKA et al., 2012).

A partir do modelo PLS-DA, a importância da variável na projeção (VIP), confirmada por ANOVA, foi utilizada para identificar os 15 m/z (prováveis lipídeos) que tiveram maior efeito discriminatório entre os grupos para os dois primeiros componentes principais. A análise VIP indicou diferenças entre as intensidades dos m/z encontrados nos extratos das plantas R03 e S04 e do azeite de oliva. Dentre esses 15 possíveis lipídeos (m/z), nove foram detectados em maiores intensidades

tanto nas plantas S04 quanto nas plantas R03 em relação ao azeite de oliva (m/z 711.2394, 715.1174, 835.2324, 851.2176, 751.0658, 701.1108, 853.2342, 831.2094 e 729.2316), o que já era esperado visto que são plantas da mesma espécie e meio-irmãs. Dentre esses, destaca-se o metabólito de m/z 751.0658 que foi detectado em maior intensidade no grupo de plantas resistentes em relação às plantas suscetíveis. Os demais possíveis lipídeos (m/z) foram detectados em maiores intensidades nas plantas suscetíveis (m/z 787.2004, 861.215, 1035.2497, 865.2166, 713.9153) ou nas plantas suscetíveis e no azeite de oliva (m/z 943.439) em relação às plantas resistentes (Figura 4.4).

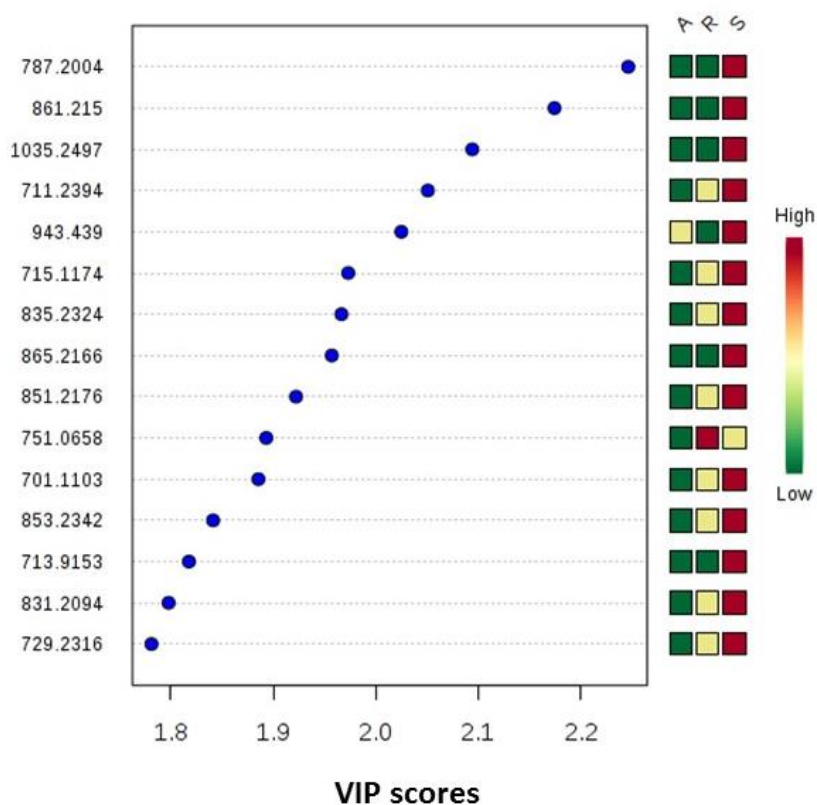


Figura 4.4 - Indicação dos 15 íons que mais contribuíram para a separação dos tratamentos. As setas destacam os íons (m/z) escolhidos para a técnica de fragmentação e possível identificação. A cor vermelha indica maior intensidade relativa no respectivo grupo, enquanto a cor verde indica menor intensidade relativa no grupo. Os três tratamentos estão identificados pelas letras: **A**- Azeite de Oliva, **R**- Plantas resistentes R03 e **S**- Plantas suscetíveis S04

Os 15 m/z foram selecionados para o experimento de MS/MS. Após a fragmentação, os m/z dos íons precursores foram buscados no banco de dados LIPID MAPS. As estruturas que se encaixaram dentro dos requisitos (erro de até 0.5 Da e aductos $[M-H]^+$, $[M-Na]^+$ ou $[M-K]^+$), foram importadas e fragmentadas

teoricamente pelo programa ACD/MS Structure ID suite (ACD/Labs, Toronto, Canadá). Essas fragmentações foram comparadas com os espectros reais gerados pela técnica de MS/MS e as correspondências foram avaliadas. Não foi possível identificar nenhum dos metabólitos selecionados a partir da comparação dos espectros gerados no experimento de MS/MS e da fragmentação teórica das moléculas encontradas no banco de dados para cada m/z .

4.3.2 Análise dos metabólitos por GC-MS

Cromatogramas característicos dos extratos dos tratamentos: plantas S04, plantas R03 e azeite de oliva, foram gerados a partir da análise por GC-MS. Após comparação dos índices de retenção e espectros de massas experimentais com os dados da biblioteca de espectros (GMD), foram observados 154 metabólitos e, entre esses, 100 foram identificados (ANEXO D). Os 54 metabólitos não identificados (*unknowns*) foram removidos da matriz de análise. O diagrama de Venn foi construído para verificar a distribuição dos 100 metabólitos identificados entre os tratamentos (Figura 4.5).

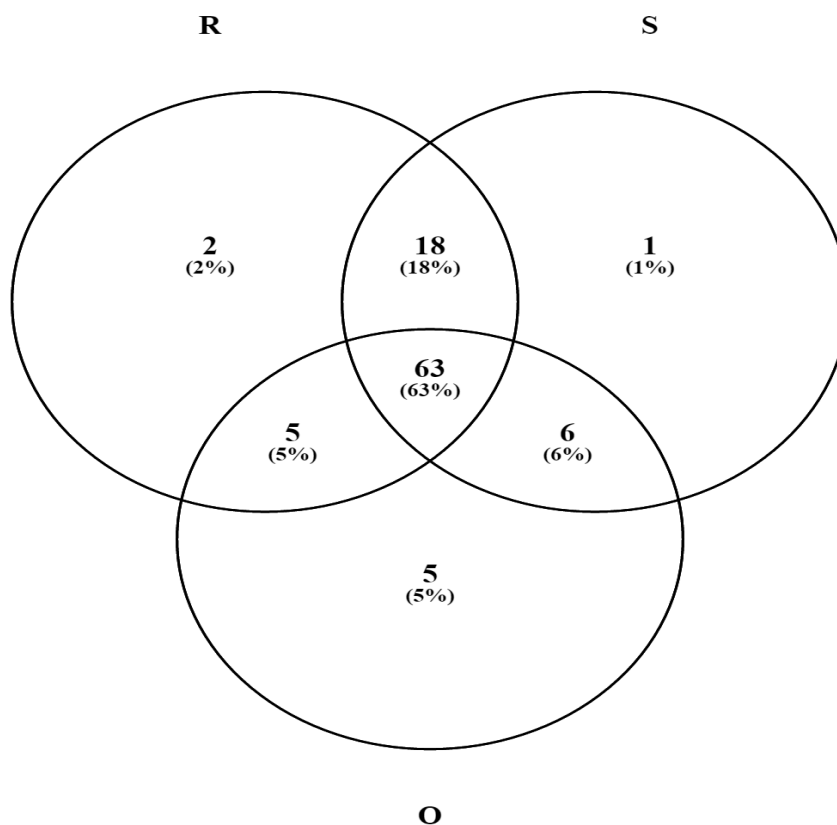


Figura 4.5 - Diagrama de Venn representando os 100 metabólitos obtidos por GC-MS e identificados pela biblioteca GMD (*The Golm Metabolome Database*). É possível observar como estes metabólitos estão distribuídos nos diferentes tratamentos. **R**- plantas R03, **S**- plantas S04 e **O**- azeite de oliva. Os metabólitos comuns entre os tratamentos encontram-se nas intersecções dos balões

A análise de PCA construída por meio da comparação plantas S04 *versus* plantas R03 *versus* azeite de oliva indicou uma tendência de separação entre os três tratamentos, sendo que a soma dos três primeiros componentes principais da PCA explica 66.3% da variância dos dados do modelo (Figura 4.6).

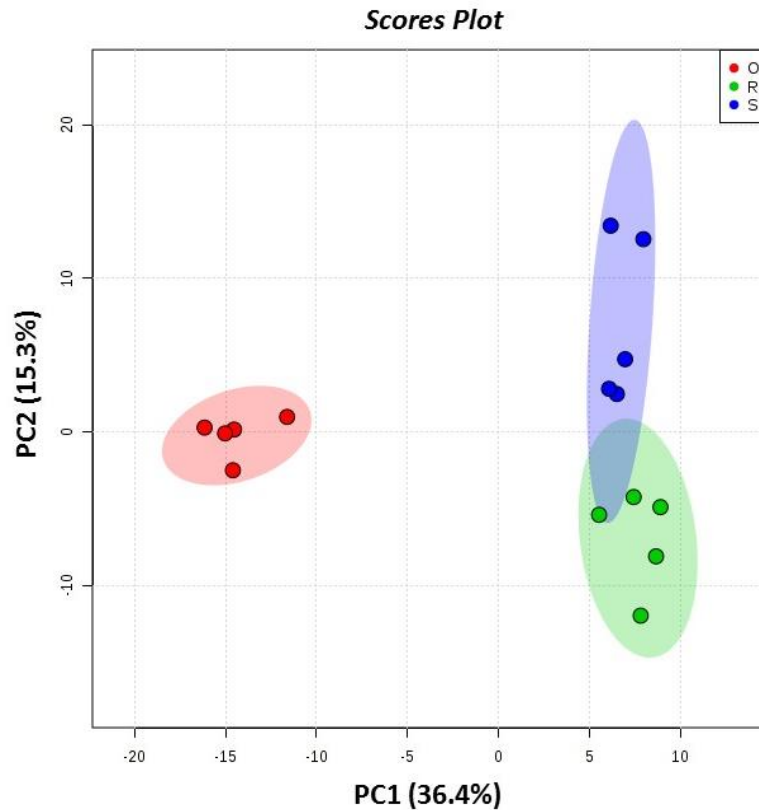


Figura 4.6 - PCA 2D Scores Plot da comparação plantas S04 versus plantas R03 versus azeite de oliva. Conjunto de dados obtidos para as 5 repetições biológicas. Plantas S04 (S) é representado pela cor azul, plantas R03 (R) pela cor verde e o do azeite de oliva (O) pela cor vermelha

Dos 100 metabólitos identificados por GC-MS nos extratos das ceras cuticulares de *E. grandis* e no azeite de oliva, 30 foram considerados característicos de ceras cuticulares por pertencerem às classes de alcanos, ácidos graxos, cetonas, triterpenoides e flavonoides (BUSCHHAUS; HERZ; JETTER, 2007; CAMERON et al., 2002; JETTER, 2000; SILVA, 2014; KUNST; SAMUELS, 2013; SILVA, 2014; SZAFRANEK et al., 2012). Considerando o objetivo do presente trabalho, apenas estes metabólitos foram considerados para análise e discussão.

Dos 30 metabólitos selecionados, oito metabólitos foram diferencialmente abundantes em pelo menos dois tratamentos (R03, S04 e Oliva), 19 metabólitos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e 3 metabólitos foram detectados exclusivamente no azeite de oliva. Dessa forma foram gerados nove padrões de cores para explicar a abundância de cada metabólito entre os tratamentos analisados (Figura 4.7).

Padrão	GMD_ID	Metabólito	Classe	R	S	O
Padrão 1	1839	13-(Z)-Docosenoic acid methyl ester	Ácido graxo	■	■	■
Padrão 2	474	n-Pentadecane	Alcano	■	■	■
	282	Nonanoic acid	Ácido graxo (acil)	■	■	■
	2069	Octadecanoic acid-2,3-dihydroxypropylester	Ácido graxo (éster)	■	■	■
	1214	Hexadecanoic acid methyl ester	Ácido graxo (éster)	■	■	■
Padrão 3	620	3-Hydroxydodecan-4-one	Cetona	■	■	■
Padrão 4	1369	9-(Z)-Hexadecenoic acid	Ácido graxo (acil)	■	■	■
Padrão 5	2160	Hesperetin	Flavonoide	■	■	■
Padrão 6	1894	n-Hexacosane	Alcano	■	■	■
	1672	n-Tricosane	Alcano	■	■	■
	1330	n-Eicosane	Alcano	■	■	■
	1745	n-Tetracosane	Alcano	■	■	■
	945	n-Octadecane	Alcano	■	■	■
	815	Tetradecanoic acid methyl ester	Ácido graxo (éster)	■	■	■
	2277	Hexacosanoic acid	Ácido graxo (acil)	■	■	■
	1660	Tetradecane-1,14-dioic acid	Ácido graxo (acil)	■	■	■
	695	Dodecanoic acid	Ácido graxo (acil)	■	■	■
	566	Cis,cis-muconic acid	Ácido graxo (acil)	■	■	■
	2202	Morin	Flavonoide	■	■	■
	2285	Acacetin	Flavonoide	■	■	■
	Padrão 7	2146	Daidzein	Flavonoide (iso)	■	■
1607		9-(E)-Octadecenoic acid	Ácido graxo	■	■	■
1921		Docosanoic acid (Behenic acid)	Ácido graxo	■	■	■
2383		Nonacosanoic acid	Ácido graxo	■	■	■
2104		All-trans-squalene	Triterpenoide	■	■	■
2090	n-Octacosane	Alcano	■	■	■	
Padrão 8	1042	2-Hydroxytetradecanoic acid	Ácido graxo (acil)	■	■	■
Padrão 9	1463	n-Heneicosane	Alcano	■	■	■
	1462	Octadecadienoic acid methyl ester, 9,12-(Z,Z)-, n-	Ácido graxo (éster)	■	■	■
	1480	9-(E)-,n-Octadecenoic	Ácido graxo (éster)	■	■	■

Figura 4.7 - Metabólitos presentes em extratos clorofórmicos de folhas de *Eucalyptus grandis* resistentes (R) e suscetíveis (S) ao patógeno *Puccinia psidii* e em extratos clorofórmicos de azeite de oliva (O). ■ indica maior abundância do metabólito entre os grupos R, S e O, ■ indica menor abundância do metabólito entre os grupos R, S e O, ■ indica abundâncias sem diferença significativa e ■ indica ausência do metabólito nos grupos R, S e O. Quando comparados os três grupos, as médias foram analisadas por ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$). Quando comparados dois grupos em função da ausência do metabólito em determinado grupo, as médias foram diferenciadas por ANOVA ($p < 0,05$). GMD_ID= identificação do metabólito na biblioteca GMD

Quatro padrões representam os metabólitos que estão presentes nos 3 grupos analisados. Destes, o Padrão 1 indica que um ácido graxo está em maior abundância nas plantas R03 e S04 em relação ao azeite de oliva, o Padrão 2 indica que um alcano e três ácidos graxos estão em maior abundância no azeite de oliva em relação às plantas R03 e S04 e o Padrão 3 indica que uma cetona é mais abundante nas plantas S04 em relação às plantas R03 e o azeite de oliva. O Padrão 6 indica 12 metabólitos (alcanos, ácidos graxos e flavonoides) presentes nos três tratamentos com a mesma abundância.

Quatro padrões indicam metabólitos presentes em dois tratamentos e ausentes em um tratamento. O Padrão 4 indica um ácido graxo ausente nas plantas R03 e presente em maior abundância no azeite de oliva em relação às plantas S04.

O Padrão 5 indica um flavonoide ausente no azeite de oliva e presente em maior abundância nas plantas R03 em relação às plantas S04. O Padrão 7 indica seis metabólitos (flavonoide, ácidos graxos, triterpenoide e alcanos) ausentes no azeite de oliva e presentes com mesma abundância nas plantas R03 e S04. O Padrão 8 indica um ácido graxo ausente nas plantas S04 e presente com mesma abundância nas plantas R03 e no azeite de oliva. O Padrão 9 indica três metabólitos presentes exclusivamente no azeite de oliva.

4.4 Discussão

A técnica de MALDI-TOF/TOF para análises de lipidômica é uma técnica relativamente nova que tem se tornado cada vez mais importante (SCHILLER et al., 2004). Estudos têm mostrado que o ácido 2,5-di-hidroxibenzoico (DHB) funciona bem como matriz para ionização de lipídeos neutros (CVACKA; SVATOS, 2003; VRKOSLAV; MÍKOVÁ; CVACKA, 2009), permitindo o emprego da técnica para a identificação de possíveis biomarcadores para diagnóstico de doenças humanas (REGIANI, 2013; VILLAS-BÔAS et al., 2005). Mais recentemente, essa técnica passou a ser empregada para estudos das ceras cuticulares em plantas e vem mostrando grande potencial para esclarecer o envolvimento dos lipídeos presentes nestas ceras nas interações planta-patógeno e planta-insetos (CVACKA; SVATOS, 2003; VRKOSLAV et al., 2010; VRKOSLAV; MÍKOVÁ; CVACKA, 2009).

Visto que a técnica de MALDI-TOF/TOF para estudo dos lipídeos presentes nas ceras cuticulares é mais recente, a verificação da reprodutibilidade da técnica foi realizada pela análise de 3 repetições técnicas das 5 repetições biológicas de cada tratamento (R03, S04 e azeite de oliva). Para todas as amostras testadas, as três repetições técnicas apresentaram perfis de espectros muito similares e foi possível observar nas análises multivariadas a formação de grupos distintos contendo tanto as repetições técnicas como as repetições biológicas, indicando a reprodutibilidade da técnica de MALDI-TOF/TOF para o estudo dos extratos clorofômicos das ceras e do azeite de oliva.

Para a análise de perfil metabólico por MALDI-TOF/TOF, uma abordagem interessante é o *fingerprinting*. Essa análise trata da avaliação de um conjunto de amostras de forma rápida, na qual um grande número de sinais é avaliado sem a intenção de identificar cada metabólito, mas visando comparar e classificar perfis ou

modelos de sinais que podem variar quanto à resposta a uma determinada doença, condição fisiológica, exposição a uma toxina e variações genéticas ou ambientais sobre indivíduos (KATJA et al., 2007; REGIANI, 2013). Adicionalmente, análises metabolômicas constituem uma ferramenta robusta para a investigação holística da composição da cutícula de plantas, uma vez que permitem obter uma extensa visão de perfil metabólico do vegetal.

A análise de PCA dos dados obtidos por MALDI-TOF/TOF indica diferenças entre a composição das ceras das plantas resistentes R03 e plantas suscetíveis S04. Infelizmente, as informações dos bancos de dados utilizados não foram suficientes para a elucidação estrutural e identificação das moléculas em função dos valores de m/z encontrados por MALDI-TOF/TOF.

Mesmo sem a identificação dos íons, os resultados obtidos indicam a possibilidade do uso da técnica de MALDI-TOF/TOF para identificação de genótipos de *E. grandis* resistentes ao patógeno *P. psidii*, a partir de um *fingerprinting* metabólico. O metabólito com valor de m/z 751.0658 pode ser utilizado como um biomarcador de resistência, visto que foi o único observado em maior abundância nas plantas resistentes R03 em relação às plantas suscetíveis S04 e ao azeite de oliva.

A técnica de GC-MS para estudo em plantas tem sido utilizada por diferentes autores para a caracterização da composição das ceras cuticulares (HANTÃO et al., 2013; SILVA, 2014; TESSMANN; DIANESE et al., 2002; UPPALAPATI et al., 2012). Dentre os metabólitos das ceras cutilares de *E. grandis* identificados por GC-MS, o metabólito *2-Hydroxytetradecanoic acid* (análogo do ácido mirístico) pode ser considerado como candidato a biomarcador de resistência. No entanto, tanto para os resultados obtidos por MALDI-TOF/TOF quanto por GC-MS, mais estudos devem ser realizados entre vários genótipos de *E. grandis* com diferentes níveis de resistência e suscetibilidade a *P. psidii* para comprovação desta hipótese.

A cutícula das plantas é o local inicial de contato de diversos patógenos com os seus respectivos hospedeiros, tornando-a fundamental nos processos de interação planta-patógeno (RINGELMAN et al., 2009). Para viabilizar a germinação e diferenciação *in vitro* das estruturas de infecção de patógenos biotróficos, estímulos físicos e químicos apropriados que simulem a cutícula foliar devem ser fornecidos ao patógeno (DICKINSON, 1969; HEATH; PERUMALLA, 1988; HOCH; STAPLES, 1987; MENDGEN et al., 1996; WIETHOLTER et al., 2003; WILLIANS et al., 1967).

Estudos histopatológicos (XAVIER et al., 2001; LEITE, 2012) descreveram que o processo de germinação dos uredósporos de *P. psidii* em folhas de *E. grandis* ocorre tanto em plantas resistentes quanto em plantas suscetíveis. Os resultados apresentados no Capítulo 3, mostraram que a utilização do azeite de oliva elevou a taxa de germinação *in vitro* dos uredósporos de *P. psidii* em aproximadamente 40% após 48 horas de incubação quando comparado com a taxa de germinação obtida com óleo mineral. Este resultado corrobora a hipótese de que o patógeno utiliza sinais químicos presentes no azeite de oliva que provavelmente simula alguns componentes químicos da cutícula foliar de *E. grandis*, estimulando a germinação dos mesmos. Entre os metabólitos presentes no azeite de oliva candidatos a simular os componentes das ceras cuticulares nas plantas R03 e S04 e a participarem da sinalização da germinação dos uredósporos de *P. psidii*, estão 18 metabólitos pertencentes às classes alcanos, ácidos graxos, flavonoides e cetona com os padrões de abundância 1, 2, 3 e 6 (Figura 4.7). Entretanto, a identificação dos metabólitos presentes no azeite de oliva que equivalem aos sinais presentes na cera cuticular de *E. grandis* é uma tarefa complexa.

O estudo de Tessmann e Dianese (2002) comprovou o efeito desencadeador da germinação de *P. psidii* por um composto da cera cuticular de *Syzygium jambos*. Uma fração do extrato hexânico de folhas de *S. jambos* que continha um alcano de cadeia linear identificado como hentriacontano ($C_{31}H_{64}$) foi associada ao aumento de 88% da germinação de uredósporos de *P. psidii* quando comparados com uredósporos germinados apenas em óleo mineral. No presente trabalho os alcanos de cadeia linear *n*-Pentadecane, *n*-Hexacosane, *n*-Tricosane, *n*-Eicosane, *n*-Tetracosane e *n*-Octadecane foram encontrados nas plantas R03 e S04 e no azeite de oliva e podem estar relacionados com o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno, sendo possíveis responsáveis pelo aumento de 40% da taxa de germinação *in vitro* dos uredósporos do patógeno *P. psidii*(Capítulo 3).

De forma diferente, o metabólito *Hesperetin* (Padrão 5) foi o único que apresentou maior abundância nas plantas resistentes R03 em relação às plantas suscetíveis S04 e não foi detectado no azeite de oliva. A literatura indica que o flavonoide *Hesperetin* possui ação antifúngica (ORTUÑO et al., 2006) e, em *Gigaspora margarita*, não altera a taxa de germinação do fungo mas exerce efeito inibitório no crescimento de suas hifas (CHABOT et al., 1992). Flavonoides de plantas são conhecidos por atuarem como toxinas antimicrobianas envolvidas na

defesa das plantas contra fitopatógenos (HASSAN et al., 2012). Os flavonoides podem ser produzidos constitutivamente e armazenados em uma forma inativa funcionando como fitoanticipinas de largo espectro para montar uma defesa rápida contra ataques futuros de patógenos (LATTANZIO et al., 2006). Desse modo, a presença do flavonoide *Hesperetin* em maior abundância nas plantas resistentes sugere que esse metabólito possa estar associado aos mecanismos de defesa da planta contra patógenos e ter efeito sobre a inibição do crescimento de *P. psidii* em plantas resistentes R03.

Finalmente, a abordagem comparativa entre os metabólitos presentes nos extratos das ceras cuticulares de folhas de *E. grandis* resistentes e suscetíveis e no azeite de oliva, promotor da germinação *in vitro* de *P. psidii*, permitiu trilhar novos *insights* a respeito da influência da composição química das ceras cuticulares de *E. grandis* no reconhecimento do hospedeiro, início da germinação e desenvolvimento de *P. psidii*, importante fitopatógeno da cultura do eucalipto.

Referências

BUSCHHAUS, C.; HERZ, H.; JETTER, R. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of *Ligustrum vulgare* leaves. **New Phytologist**, Cambridge, v. 176, n. 2, p. 311-316, 2007.

CAMERON, K.D.; TEECE, M.A.; BEVILACQUA, E.; SMART, L.B. Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. **Phytochemistry**, New York, v. 60, n. 7, p. 715-725, 2002.

CHABOT, S.; BEL-RHLID, R.; CHENEVERT, R.; PICHE, Y. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. **New Phytologist**, New Jersey, v. 122, n. 3, p. 461-467, 1992.

CUADROS-INOSTROZA, A.; CALDANA, C.; REDESTIG, H.; KUSANO, M.; LISEC, J.; PEÑA-CORTÉS, H.; WILLMITZER, L.; HANNAH, M.A. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, n. 1, p. 428, 2009.

CVACKA, J.; SVATOS, A. Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of lipids and high molecular weight hydrocarbons with lithium 2, 5-dihydroxybenzoate matrix. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, West Sussex, v. 17, n. 19, p. 2203-2207, 2003.

DICKINSON, S. Studies in the physiology of obligate parasitism. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 66, n. 1, p. 38-49, 1969.

- FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A.R. Fungal pathogens: the battle for plant infection. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 25, n. 6, p. 505-524, 2006.
- GNIWOTTA, F.; VOGG, G.; GARTMANN, V.; CARVER, T.L.W.; RIEDERER, M.; JETTER, R. What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticular waxes. **Plant Physiology**, Washington, v. 139, n. 1, p. 519-531, 2005.
- GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTRÖM, A.; SJÖSTRÖM, M.; MORITZ, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 331, n. 2, p. 283-295, 2004.
- HANTÃO, L.W.; TOLEDO, B.R.; DE LIMA RIBEIRO, F.A.; PIZETTA, M.; PIEROZZI, C.G.; FURTADO, E.L.; AUGUSTO, F. Comprehensive two-dimensional gas chromatography combined to multivariate data analysis for detection of disease-resistant clones of Eucalyptus. **Talanta**, Amsterdam, v. 116, p. 1079-1084, 2013.
- HASSAN, S.; MATHESIUS, U. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 9, p. 3429-3444, 2012.
- HEATH, M.C.; PERUMALLA, C.J. Haustorial mother cell development by *Uromyces vignae* on collodion membranes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, n. 4, p. 736-741, 1988.
- HOCH, H.C.; STAPLES, R.C. Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 231-247, 1987.
- IWAMOTO, M.; TAKEUCHI, Y.; TAKADA, Y.; YAMAOKA, N. Coleoptile surface cuticle of barley is involved in survival and penetration of *Blumeria graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 1, p. 31-38, 2002.
- JETTER, R.; SCHÄVER, S.; RIEDERER, M. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 619-628, 2000.
- KATJA, D.K.; ARONOV, P.A.; HAMMOCK, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometric Reviews**, Hoboken, v. 26, n. 1, p. 51-78, 2007.
- KHALIL, M.B.; HOU, W.; ZHOU, H.; ELISMA, F.; SWAYNE, L.A.; BLANCHARD, A.P.; YAO, Z.; BENNETT, S.A.L.; FIGEYS, D. Lipidomics ERA: Accomplishments and challenges. **Mass Spectrometry Reviews**, Hoboken, v. 29, n. 6, p. 877-929, 2010.

KOLATTUKUDY, P.E.; ROGERS, L.M.; LI, D.; HWANG, C.S; FLAISHMAN, M.A. Surface signaling in pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 10, p. 4080-4087, 1995.

KUNST, L.; SAMUELS, A.L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. **Progress in lipid research**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 51-80, 2003.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in research**, Trivandrum, v. 661, p. 23-67, 2006

LEITE, T.F. **Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter por meio da técnica de RNA-Seq**. 2012. 160 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n.1, p. 367-386, 1996.

MÜLLER, C.; RIEDERER, M. Plant surface properties in chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 11, p. 2621-2651, 2005.

ORTUÑO, A.; BÁIDEZ, A.; GÓMEZ, P.; ARCAS, M.C.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; DEL RIO, J.A. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, London, v. 98, n. 2, p. 351-358, 2006.

REGIANE, T. **Análise dos perfis proteômico e lipídômico do líquido folicular de pacientes com endometriose e seus endometriomas submetidas ao tratamento de fertilização *in vitro***. 2013. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Paulista de Medicina. UNIFESP. São Paulo, 2013.

RINGELMANN, A.; RIEDEL, M.; RIEDERER, M.; HILDEBRANDT, U. Two sides of a leaf blade: *Blumeria graminis* needs chemical cues in cuticular waxes of *Lolium perenne* for germination and differentiation. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 1, p. 95-105, 2009.

ROSTÁS, M.; RUF, D.; ZABKA, V.; HILDEBRANDT, U. Plant surface wax affects parasitoid's response to host footprints. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 95, n. 10, p. 997-1002, 2008.

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

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, U.; FORBES, M.G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R.; KOPKA, J. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 6, p. 1332-1337, 2005.

SCHILLER, J.; SUSS, R.; ARNHOLD, J.; FUCHS, B.; LESSIG J.; MULLER, M.; PETKOVIC, M.; SPALTEHOLZ, H.; ZSCHORNIG, O.; ARNOLD, K. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 449-488, 2004

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

SILVA, A.A. **Estudo lipídômico em folhas de cultivares de cana-de-açúcar e avaliação do papel desses metabólitos na ferrugem alaranjada**. 2014. 183 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2014.

SZAFRANEK, B.; PASZKIEWICZ, M.; GOŁĘBIOWSKI, M.; STEPNOWSKI, P. Gas chromatographic analysis of plant and insect surface compounds: cuticular waxes and terpenoids. In: SALIH, B.; ÇELIKBIÇAK, Ö. (Eds.) **Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications**. Rijeka: InTech, 2011. p. 39-72.

SZYMAŃSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A.K.; WESTERHUIS, J.A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, New York, v. 8, n. 1, p. 3-16, 2012.

TESSMANN, D.J.; DIANESE, J.C. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 538-542, 2002.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 4, p. 351-357, 2003.

TSUBA, M.; KATAGIRI, C.; TAKEUCHI, Y.; TAKADA, Y.; YAMAOKA, N. Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 2, p. 51-57, 2002.

UPPALAPATI, S.R.; ISHIGA, Y.; DORAISWAMY, V.; BEDAIR, M.; MITTAL, S.; CHEN, J.; NAKASHIMA, J.; TANG, Y.; TADEGE, M.; RATET, P.; CHEN, R.; SCHULTHEISS, H.; MYSORE, K.S. Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* irg1/palm1 mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 353-370, 2012.

VILLAS-BÔAS, S.G.; MAS, S.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, Hoboken, v. 24, n. 5, p. 613-646, 2005.

VRKOSLAV, V.; MÍKOVÁ, R.; CVACKA, J. Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, West Sussex, v. 44, n. 1, p. 101-110, 2009.

RKOSLAV, V.; MUCK, A.; CVACKA, J.; SVATOS, A. MALDI imaging of neutral cuticular lipids in insects and plants. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 21, n. 2, p. 220-231, 2010.

WIETHOLTER, N.; HORN, S.; REISIGE, K.; BEIKE, U.; MOERSCHBACHER, B.M. *In vitro* differentiation of haustorial mother cells of the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, triggered by the synergistic action of chemical and physical signals. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 3, p. 320-326, 2003.

WILLIAMS, P.G.; SCOTT, K.J.; KUHL, J.L.; MACLEAN, D.J. Sporulation and pathogenicity of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* grown on an artificial medium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 3, p. 326-327, 1967.

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

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

ZABKA, V.; STANGL, M.; BRINGMANN, G.; RIEDERER, M.; VOGG, G.; HILDEBRANDT, U. Host surface properties affect pre-penetration processes in the barley powdery mildew fungus. **New Phytologist**, Cambridge, v. 177, n. 1, p. 251-263, 2008.

5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Puccinia psidii* Winter EM FOLHAS DE *Eucalyptus grandis*

Resumo

O aumento da demanda por papel e celulose tem estimulado a expansão das plantações de *Eucalyptus* spp nos últimos anos. No entanto, as plantações têm sido comprometidas pelo ataque do patógeno biotrófico *Puccinia psidii* Winter, fungo causador da ferrugem em diversas Myrtaceae. Os danos causados por *P. psidii* em viveiros e plantas jovens são grandes dependendo do local, manejo silvicultural e da espécie de eucalipto utilizada. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um método sensível para detectar precocemente e quantificar o patógeno em folhas infectadas por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para tanto, *primers* foram desenvolvidos e validados para *P. psidii* tendo como base os genes beta tubulina e fator de alongação e a região intergênica espaçadora do rDNA (IGS). Os três conjuntos de *primers* se mostraram específicos para *P. psidii*. No entanto, o conjunto IGS7/IGS9 foi mais sensível, sendo capaz de detectar 0.5 pg do DNA do fungo em tecidos de eucalipto recém inoculados. O método desenvolvido foi eficiente para detectar e quantificar o patógeno *P. psidii* em folhas de *Eucalyptus grandis* sintomáticas e assintomáticas, tanto inoculadas em condições controladas quanto em condições naturais de infecção. As implicações dessa metodologia para o manejo da ferrugem do eucalipto bem como uma estratégia fitossanitária são discutidas no presente trabalho, já que se trata de uma importante ferramenta de diagnose molecular do patógeno *P. psidii*.

Palavras-Chave: Ferrugem do eucalipto; qPCR; Estratégia fitossanitária

Abstract

The commercial areas of *Eucalyptus* plantation expanded in recent years due to the increasing demands for pulp and paper. One of the threats that reduce *Eucalyptus* production is the rust disease caused by *Puccinia psidii* Winter, a biotrophic fungus that affect a broad range of Myrtaceae. Since eucalyptus rust causes major damages to seedlings and young trees, an accurate diagnosis of this disease may be used to assess *P. psidii* in infected tissues. The aim of this study was to develop a method for early detection and quantification of *P. psidii* in *Eucalyptus grandis* leaves, based on real-time quantitative PCR assay (qPCR). Sets of primers based on genes of ribosomal DNA intergenic space region, beta-tubulin and elongation factor of *P. psidii* were designed and evaluated. The IGS set of primers showed the highest efficiency, detecting a lower limit of 0.5 pg of *P. psidii* DNA. The qPCR analysis was efficient to detect *P. psidii* in artificial inoculation conditions, enabling the quantification of *P. psidii* DNA during eucalyptus infection at 0 to 240 hours post-inoculation. In field, the qPCR was able to identify the existence of the pathogen in naturally infected leaves with or without rust symptoms. The implications of this method in eucalyptus rust management and as a phytosanitary strategy are discussed.

Keywords: Eucalyptus rust; qPCR; Phytosanitary strategy

5.1 Introdução

A ferrugem do eucalipto é uma doença causada pelo fungo biotrófico *Puccinia psidii* Winter e foi descrita pela primeira vez em goiaba no Brasil (WINTER, 1884). A *P. psidii* afeta *Eucalyptus* spp. com diferentes graus de severidade, sendo os clones de *E. grandis* os mais suscetíveis (DIANESE; MORAES; SILVA, 1984). No Brasil, a maioria das plantações é de *Eucalyptus grandis* ou de seus híbridos e, portanto, a presença de *P. psidii* nessas áreas representa um grande problema para a produção de madeira, papel e celulose (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL, 2014). No cenário mundial a ferrugem do eucalipto é considerada uma doença quarentenária, pois além de infectar plantações comerciais de eucalipto *P. psidii* ataca várias mirtáceas comprometendo a biodiversidade de plantas nativas (CARNEGIE, 2015; COUTINHO et al., 1998; GLEN et al., 2007; GRGURINOVIC; WALSH; MACBETH, 2006; JUNGHANS et al., 2003; LANGRELL; GLEN; ALFENAS, 2008; QUECINE et al., 2014; QUECINE et al., 2016; TOMMERUP; ALFENAS; OLD, 2003).

Após o primeiro relato do patógeno no Brasil, *P. psidii* foi detectada infectando diferentes Myrtaceae em vários países da América do Sul e Central, incluindo o Caribe (COUTINHO et al., 1998; GLEN et al., 2007; GRAÇA et al., 2011) e moveu-se rapidamente para novos territórios como Califórnia, Flórida e Havaí nos Estados Unidos (MARLATT; KIMBROUGH, 1979; UCHIDA; ZHONG; KILLGORE, 2006), Japão (KAWANISHI et al., 2009), Austrália (CARNEGIE et al., 2010; CARNEGIE, 2015), China (ZHUANG; WEI, 2011), Nova Caledônia (GIBLIN, 2013), África do Sul (ROUX et al., 2013) e mais recentemente Indonésia (MCTAGGART et al., 2016). A propagação do agente patogênico pelos continentes sugere que seus uredósporos podem ser dispersos pelo vento, pólen contaminado e principalmente pela troca de material vegetal infectado assintomático entre esses países. (LANGRELL; GLEN; ALFENAS, 2008; ZAUZA et al., 2015).

A identificação de *P. psidii* atualmente é baseada em características morfológicas do fungo por microscopia (uredósporos e pústulas) e sintomas da doença no campo. Essa metodologia é simples para ser empregada durante as epidemias de ferrugem em hospedeiros suscetíveis. No entanto, a detecção e identificação do patógeno tornam-se complicadas em algumas situações: hospedeiros menos suscetíveis, quando os níveis da doença são baixos, em tecidos

assintomáticos ou germoplasmas, ou mesmo em tecidos recém-infectados. Para estes casos, é necessária a busca por técnicas mais eficazes e sensíveis para detecção de *P. psidii* (GLEN et al., 2007).

Com base nos avanços da biologia molecular, a detecção de *P. psidii* começou a ser explorada por ensaios de PCR (LANGRELL; GLEN; ALFENAS, 2008; BASKARATHEVAN et al., 2016). Em especial pela técnica de PCR em tempo real - qPCR (BASKARATHEVAN et al., 2016) que oferece oportunidade para a rápida detecção e quantificação de agentes patogênicos no interior de seus hospedeiros, auxiliando no diagnóstico de doenças em plantas (YAN et al., 2008; SANZANI et al., 2014; ARIF et al., 2014). Devido a utilização de fluorescência, a técnica de qPCR é até 100 vezes mais sensível que o PCR convencional e tem resolução suficiente para detectar um único esporo fúngico (ARIF et al., 2014; PEDLEY, 2009), como já relatado em *Glomus intraradices* (ALKAN et al., 2004).

A elevada sensibilidade da técnica de qPCR permite a quantificação de níveis baixos do agente patogênico, que normalmente correspondem à quantidade de fungo presente no início da infecção ou durante as infecções latentes, assintomáticas. Além disso, a técnica permite a quantificação do patógeno acumulado ao longo de todo o ciclo da doença e um exame detalhado de todos os estádios da infecção no material vegetal (COVARELLI et al., 2012; DEMONTIS et al., 2008; SANZANI et al., 2014).

A detecção precoce e quantificação do patógeno propiciam um diagnóstico mais rápido e preciso da doença na cultura, que é fundamental para melhorar as estratégias de manejo da doença, reduzindo assim as perdas na produção (LANGRELL; GLEN; ALFENAS, 2008). Além disso, podem ser utilizadas para fins fitossanitários como a certificação de materiais vegetais livres da doença a serem importados ou exportados (SANZANI et al., 2014; YAN et al., 2008).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia eficaz, baseada na técnica de qPCR, para detectar precocemente e quantificar *P. psidii* em folhas de *Eucalyptus grandis* infectadas. O método proposto pode auxiliar as práticas de manejo da ferrugem do eucalipto em viveiros e plantações jovens, bem como se mostra um método útil para a certificação de plantas livres desta séria doença quarentenária.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Material biológico

No presente trabalho foram utilizados uredósporos de *P. psidii* do isolados monopustular MF-1 (LEITE et al., 2013) pertencente ao Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil e do isolado monopustular #64, proveniente de *Myrtus communis*, cedido pela Dra. Janice Uchida do Departamento de Proteção de Plantas e Ambiente de Honolulu, Havaí. Também foram utilizadas populações de *P. psidii* provenientes de diferentes hospedeiros (QUECINE et al., 2014): goiaba (PGuava), jambo (PSyz), jaboticaba (Pjab) e *E. grandis* genótipo D901 (PEGM9). Além de outras espécies de ferrugens: *P. triticina* isolada de *Triticum* spp. e fornecida pelo Dr. Guus Bakkeren do centro *Agriculture and Agri-Food Canadá, Pacific AgriFood Research Centre (PARC)*, Ottawa, Canadá; *P. polysora*, *P. sorghi* e *P. kuehnii* cedidas pelo Departamento de Fitossanidade da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Jaboticabal, São Paulo, Brasil; E *P. emiliae* isolada de falsa serralha (*Emilia sonchifolia*) no laboratório Max Feffer de Genética e Melhoramento de Plantas.

O material vegetal utilizado foram plântulas de *E. grandis* clone S04 susceptíveis, selecionadas a partir da progênie de meio-irmãos do clone Brasuz (LEITE, 2012) e folhas coletadas de diferentes progênies de *E. grandis*, de aproximadamente seis meses de idade, provenientes de experimento de campo com incidência natural de ferrugem, localizado na estação experimental de Itatinga, pertencente a Universidade de São Paulo - USP, Itatinga-SP, Brasil. Plântulas de *E. grandis* progênie D901, altamente susceptíveis ao patógeno *P. psidii* (QUECINE et al., 2014), foram utilizados para a manutenção e a multiplicação do isolado MF-1 como descrito por Leite et al. (2013).

5.2.2 Extração de DNA

As extrações do DNA total das folhas de eucalipto sadias e infectadas e dos uredósporos de *Puccinia* foram realizadas com o Kit “DNeasy Plant Mini” (Qiagen).

Aproximadamente 100 mg de material vegetal e 10-20 mg de uredósporos foram macerados em nitrogênio líquido juntamente com 8 mg de PVP- 40 e 16 mg de sílica autoclavada, em almofariz e com ajuda de um pistilo. Após maceração do material, a extração foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Para análise da integridade do DNA extraído foi realizada eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose (1%). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 mg/mL) e fotodocumentado em luz UV. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro *GENESYS 10S UV-Vis* com o acessório *nanoCell* (Thermo Scientific, Madison, USA) e mantidas a temperatura de - 20°C, até o momento de uso.

5.2.3 Desenvolvimento dos *primers* espécie-específicos

Inicialmente os *primers* universais CNL12/CNS1, Bt2a/Bt2b e 3F/7R (Tabela 5.1) foram utilizados para amplificar respectivamente a região intergênica espaçadora do rDNA (IGS) e o gene beta tubulina (BTub) e o gene fator de alongação (EF) do isolado MF-1. Os produtos de PCR gerados foram purificados com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e sequenciados utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Utilizando a ferramenta BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), as sequências geradas a partir dos *primers* universais para isolado MF-1 foram comparadas com sequências de *Puccinia* spp. já existentes no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram alinhadas com base na similaridade usando o programa de alinhamento de sequências CLUSTAL W-1,7 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). As regiões de dissimilaridade entre as sequências de MF-1 e de outras *Puccinia* spp. foram então identificadas e utilizadas para desenhar os *primers* específicos para *P. psidii*. Os *primers* espécie-específicos foram desenhados para os genes IGS, BTub e EF com o intuito de gerar produtos de PCR de aproximadamente 200pb (Tabela 5.1), para tanto foi utilizado o programa *DesignerOligoPerfect™* (<http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>). A formação de dímeros de *primer* e *hairpins* foi avaliada pelo programa *Oligo Analysis Tool* (<http://www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx>).

Finalmente, as sequências dos *primers* foram comparadas com o genoma de *E. grandis* depositado no banco de dados *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) para assegurar que os *primers* desenvolvidos eram específicos de *P. psidii*.

Tabela 5.1 - Lista de *primers* utilizados e desenvolvidos

<i>Primers</i>	Sequência (5' - 3')	Gene Amplificado	Referência
CNL 12	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	IGS rDNA	ANDERSON; STASOVSKI, 1992.
CNS1	GAGACAAGCATATGACTACTG		
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Beta tubulina	GLASS; DONALDSON, 1995.
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTTGGC		
3F	CGGAAGCTTTCAAYAARATGGA	Fator de elongação	BALDAUF; DOOLITTLE, 1997.
7R	CCNCTRTRTRCAACCTAGGTTGCA		
IGS7	CAAAGTTATTTCTGGATCAC	IGS rDNA	Presente estudo
IGS9	CATTCTAGTGAATTTTCTTTAC		
BTub1	GGACTCTGTTTTAGATGTCGTC	Beta tubulina	Presente estudo
BTub3	TTGATGGACTGATAGGGTAGCG		
EF5	CAGTTATGGAAGTTTGAACTCC	Fator de elongação	Presente estudo
EF2	GACAATAAGCTGTGGAACACCAAGG		

5.2.4 Especificidade e sensibilidade dos *primers* desenvolvidos

A especificidade e sensibilidade dos *primers* IGS7/IGS9, BTub1/BTub3 e EF5/EF2 desenvolvidos no presente trabalho foram determinadas por meio de reações de PCR convencional (cPCR). Para cada conjunto de *primers*, as reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL compostas por 1X Taq DNA Buffer, 3,7 mM MgCl₂, 0,2 mM DNTP, 5 pmol de cada primer (*forward* e *reverse*), 1,25 U taq DNA polimerase (Thermo), 0,5 µg de BSA e 5 ng de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) e consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

A especificidade dos *primers* desenvolvidos foi avaliada utilizando DNA de dois isolados (MF-1 e #64) e quatro populações (PGuava, PSyz, Pjab e PEGM9) do

patógeno alvo *P. psidii* e DNA de 5 espécies de ferrugens não alvo (*P. triticina*, *P. polysora*, *P. sorghi*, *P. emiliae* e *P. kuehni*). Foram utilizados também DNA de folhas de *E. grandis* (genótipo S04) sadias e infectadas pelo isolado MF-1. Para o teste de sensibilidade dos primers foram utilizados uma quantidade inicial de 25 ng e uma diluição seriada (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,1 pg e 10 fg) do DNA de MF-1.

Os ensaios de sensibilidade e especificidade foram repetidos duas vezes para garantir a exatidão dos resultados e os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio.

5.2.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O conjunto de primers IGS7/IGS9 foi selecionado para detectar precocemente e quantificar o patógeno *P. psidii* por qPCR. A reação de qPCR foi realizada utilizando o sistema *iCycler iQ Real Time PCR* (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) em um volume final de 25 µl, contendo 12,5 µl de *Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 0,5 µg de BSA, 5 pmol de cada primer (IGS7/IGS9) e 5 ng de DNA. A condição de amplificação consistiu em pré-aquecimento inicial de 5 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 30 s, 58°C durante 30 s, 72°C durante 30 s para obtenção dos dados e análise em tempo real. Para analisar a especificidade dos produtos amplificados, foram geradas curvas de dissociação dos primers (curva de *melting*), adicionando-se à reação de amplificação 1 ciclo, com a temperatura aumentando de 72 a 95 °C com leitura da fluorescência a cada 30 s.

Para quantificar o DNA de *P. psidii* nas folhas de *E. grandis* infectadas, avaliar a eficiência de amplificação dos primers e verificar os limites de detecção do ensaio de qPCR, uma curva padrão foi gerada a partir de uma diluição seriada do DNA de MF-1 (5000 pg, 500 pg, 50 pg, 5 pg e 0,5 pg), que foi extraído de uredóporos e diluído ao DNA de folhas saudáveis de *E. grandis* S04 (1 ng mL⁻¹).

Para a curva padrão, cada ponto da diluição seriada foi realizado em triplicata técnica. Já para as amostras do experimento de detecção e análise temporal de *P. psidii* e para as amostras coletadas em campo o qPCR foi realizado em duplicata técnica. A média e o erro padrão dos valores da fluorescência de fundo (CP), conhecida como *threshold cycle* (Ct), obtidos nas repetições técnicas foram calculados e usados como valores de Ct para os cálculos da quantidade de *P. psidii* em cada amostra.

5.2.6 Detecção e análise temporal de *P. psidii* em folhas de eucalipto sob condições controladas

Para detectar precocemente e monitorar o processo de infecção de *P. psidii* em folhas de eucalipto, dez mudas de *E. grandis* (genótipo S04) foram aclimatadas em câmaras de crescimento E15 (Convion, Winnipeg, Canadá) durante 7 dias sob fotoperíodo de 12 horas ($142 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e 20 °C. Cinco plantas foram inoculadas com solução de uredósporos do isolado MF-1 (10^5 urediniospores mL^{-1}) como descrito por Leite et al. (2013). As outras cinco plantas foram falso-inoculadas com água destilada acrescida de 0,05% de Tween 20 (Invitrogen) e foram utilizadas como controles. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Com base em estudos prévios de microscopia, que mostraram a dinâmica do desenvolvimento do isolado MF-1 em folhas de *E. grandis* genótipo S04 (LEITE, 2012), um ensaio temporal foi criado com 5 intervalos de amostragem (Figura 5.1); (1) zero horas após inoculação (0 h.a.i.), no qual as plantas foram aspergidas com suas respectivas soluções; (2) 24 horas após a inoculação (24 h.a.i.), quando apressório, vesícula subestomática, hifa de infecção e célula mãe do haustório (CMH) são formados; (3) 72 horas após inoculação (72 h.a.i.), fase inicial de colonização do mesófilo foliar, quando CMH e hifas de infecção são abundantes (início da formação das hifas secundárias); (4) 144 horas após a inoculação (144 h.a.i.) quando o mesófilo foliar está altamente colonizado pelo patógeno com muitas CMH, mas sem pústulas visíveis; e (5) 240 horas após inoculação (240 h.a.i.), mesófilo foliar completamente tomado pelo patógeno com as primeiras pústulas em formação e visíveis. Para cada intervalo de tempo, folhas provenientes dos dois primeiros pares de cada ramo foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C. Para as plantas falso-inoculadas (controles), as folhas foram coletadas apenas nos tempos 0 h.a.i e 240 h.a.i. Após a extração de DNA das folhas inoculadas e falso-inoculadas, as análises de qPCR foram realizadas como descrito acima.

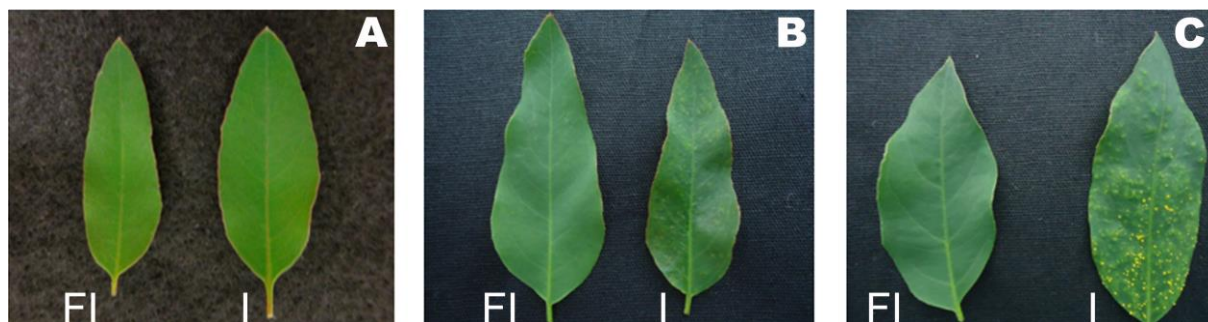


Figura 5.1 - Aparência visual das folhas de *E. grandis* genótipo S04 amostradas no ensaio temporal. FI- Folhas falso-inoculadas e I- Folhas inoculadas, em cada intervalo de tempo amostrado **A** - 0, 24 e 72 horas após inoculação (h.a.i), sem sintomas de ferrugem visíveis **B** - 144 h.a.i., primeiros sintomas de ferrugem aparentes, mas ausência de pústulas visíveis e **C** - 240 h.a.i., presença de pústulas visíveis

5.2.7 Detecção de *P. psidii* em campo

Para detectar *P. psidii* em plantas jovens de campo, amostras de *E. grandis* foram coletadas de um ensaio de campo com incidência natural de ferrugem, na Estação Experimental de Itatinga, Anhembi-SP, Brasil (22 ° 47 ' 20 "S e 48 ° 07' 37 "W). Folhas com e sem sintomas de ferrugem foram coletadas de plantas infectadas. Árvores que se encontravam ao lado dessas plantas infectadas e não apresentavam sinais de doença, tiveram suas folhas assintomáticas coletadas também. As coletas foram feitas nas mesmas plantas de *E. grandis* duas vezes: em 22 de outubro e 27 de novembro de 2014. As amostras foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Após a extração de DNA das folhas sintomáticas e assintomáticas, as análises de qPCR foram realizadas como descrito acima.

5.2.8 Análise dos dados

Para obter a inclinação da reta (*slope*) e o coeficiente de correlação (R^2) da curva padrão, foram plotados em um gráfico os valores de Ct no eixo das ordenadas (y) e o Log da concentração conhecida de cada ponto da diluição seriada do DNA de MF-1 no eixo das abscissas (x). Para estimar a quantidade de DNA de *P. psidii* nas amostras, o valor de Ct obtido para cada amostra foi interpolado com a curva padrão. Para avaliar a eficiência do método de qPCR desenvolvido para o diagnóstico e quantificação de *P. psidii* no ensaio sob condições controladas, os

dados provenientes das plantas inoculadas foram analisados por meio do teste de Tukey ($p < 0.05$) no programa SAS (versão para windows).

5.3 Resultados

5.3.1 Especificidade e sensibilidade dos *primers* por cPCR

Como esperado, os conjuntos de *primers* IGS7/IGS9, BTub1/BTub3 e EF5/EF2 desenvolvidos para *P. psidii* amplificaram fragmentos de aproximadamente 200pb quando utilizado DNA proveniente de uredósporos de *P. psidii* coletados de diferentes hospedeiros (MF-1, #64, PGuava, PSyz, PJab, PEGM9) e de folhas de *E. grandis* infectadas com MF-1. Não foi observada amplificação quando o DNA de outras espécies de ferrugem (*P. triticina*, *P. polysora*, *P. sorghi*, *P. emiliae* e *P. kuehnii*) e de folhas saudias de *E. grandis* foram utilizados como DNA molde nas reações de PCR (Figura 5.2 e Tabela 5.2), confirmando a especificidade dos *primers* desenvolvidos.

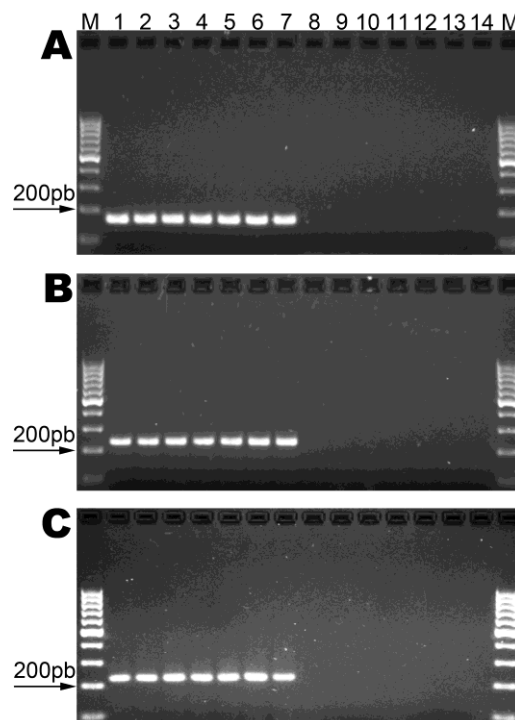


Figura 5.2 - Teste de especificidade utilizando DNA de *P. psidii*, de outras espécies de ferrugem pertencentes ao gênero *Puccinia* e de plantas infectadas e saudias de *E. grandis* S04. **A** - IGS7/IGS9, **B** - BTub1/BTub3, **C** - EF5/EF2. Em cada gel: M – Marcador 100 pb (Thermo), 1- MF-1, 2- #64, 3- PGuava, 4- PSyz, 5- PJab, 6- PEGM9, 7- *E. grandis* S04 infectada com MF-1, 8- *P. triticina*, 9- *P. polysora*, 10- *P. sorghi*, 11- *P. emiliae*, 12- *P. kuehnii*, 13- *E. grandis* S04 sadia, 14- controle negativo

Tabela 5.2 - Isolados e populações de *P. psidii* e diferentes espécies de *Puccinia* spp. utilizadas para o teste de especificidade

Organismos	Código	Hospedeiros	Origem	Referência	Amplificação cPCR*		
					IGS7/IGS9	BTub1/BTub3	EF5/EF2
Isolados							
<i>Puccinia psidii</i>	MF-1	<i>Eucalyptus grandis</i>	Brasil	LEITE et al., 2013	+	+	+
<i>P. psidii</i>	# 64	<i>Myrtus communis</i>	Havai	Dra. Janice Uchida ^b	+	+	+
Populações de Uredósporos							
<i>P. psidii</i>	PGuava	<i>Psidium guava</i>	Brasil	QUECINE et al., 2014	+	+	+
<i>P. psidii</i>	PSyz	<i>Syzygium jambos</i>	Brasil	QUECINE et al., 2014	+	+	+
<i>P. psidii</i>	Pjab	<i>Myrciaria cauliflora</i>	Brasil	QUECINE et al., 2014	+	+	+
<i>P. psidii</i>	PEGM9	<i>Eucalyptus grandis</i>	Brasil	QUECINE et al., 2014	+	+	+
Outras espécies							
<i>P. triticina</i>	P1	<i>Triticum</i> spp.	Canadá	Dr. Guus Bakkeren ^c	-	-	-
<i>P. polysora</i>	P2	<i>Zea mays</i>	Brasil	UNESP/FCAV ^d	-	-	-
<i>P. sorghi</i>	P3	<i>Zea mays</i>	Brasil	UNESP/FCAV ^d	-	-	-
<i>P. emiliae</i>	P4	<i>Emilia sonchifolia</i>	Brasil	Max Feffer ^a	-	-	-
<i>P. kuehnii</i>	P5	<i>Saccharum</i> spp.	Brasil	UNESP/FCAV ^d	-	-	-

* PCR convencional (cPCR) com os três conjuntos de *primers* desenvolvidos no presente estudo para *P. psidii* baseados em sequências de DNA do isolado MF-1; +, presença do fragmento esperado de aproximadamente 200 pb; -, sem ocorrência de amplificação.

^a Laboratório “Max Feffer” de Genética de Plantas, Departamento de Genética – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, (ESALQ/USP), Piracicaba –SP, Brazil.

^b *Department of Plant and Environmental Protection Sciences, University of Hawaii at Manoa, Honolulu 96822.*

^c *Agriculture and Agri-Food Canadá, Pacific AgriFood Research Centre (PARC), Ottawa, Canada.*

^d Departamento de Fitossanidade, Fitopatologia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Jaboticabal –SP, Brasil.

Nos testes de sensibilidade, os *primers* IGS7/IGS9, BTub1/BTub3 e EF5/EF2 foram capazes de detectar respectivamente 10 pg, 1 ng e 1 ng de DNA do isolado MF-1 (Figura 5.3). O conjunto de *primers* IGS7/IGS9 se mostrou 100 vezes mais sensível que BTub1/BTub3 e EF5/EF2. Portanto, o conjunto de *primers* IGS7/IGS9 foi selecionado para todos os ensaios subsequentes.

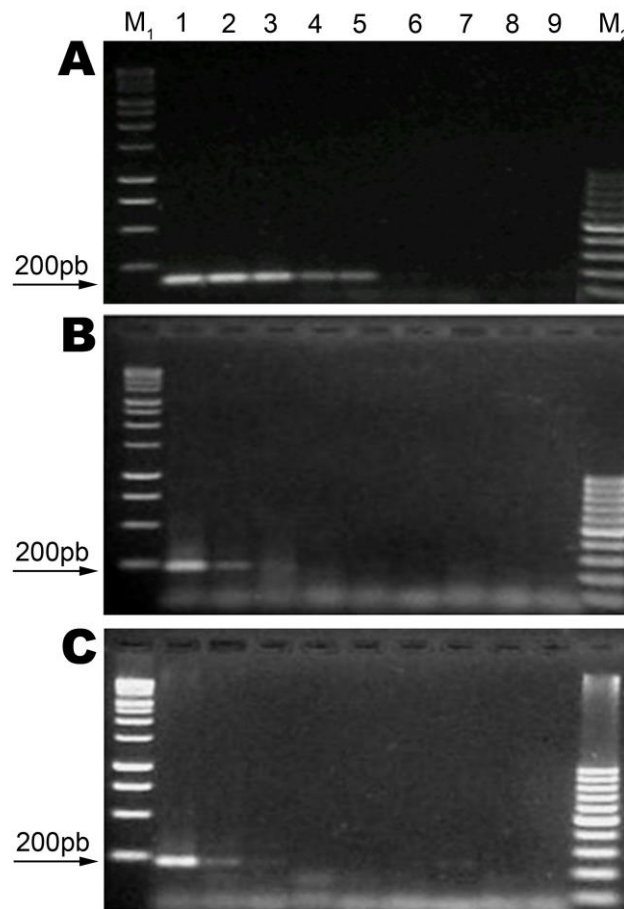


Figura 5.3 - Sensibilidade dos primers para diferentes concentrações de DNA de *P. psidii* (isolado MF-1). **A** - IGS7/IGS9, **B** - BTub1/BTub3 e **C** - EF5/EF2. Em cada gel: M - Marcadores ($M_1=1\text{Kb}$ e $M_2=100\text{pb}$ Thermo), 1- 25 ηg , 2- 10 ηg , 3- 1 ηg , 4- 100 μg , 5- 10 μg , 6- 1 μg , 7- 0.1 μg , 8- 10 fg e 9- controle negativo

5.3.2 Ensaio de qPCR

Como esperado o *amplicon* de ~200 pb gerou um único pico de dissociação à 73 °C na curva de melting (Figura 5.4), confirmando a especificidade dos *primers* IGS7/IGS9. A curva padrão gerada (Fig. 5.4) possui $R^2 = 0,992$, o que sugere uma alta correlação linear entre a quantidade de DNA de cada diluição e os valores de Ct. Utilizando os *primers* IGS7/IGS9 o limite de detecção para o DNA de *P. psidii* foi de 0,5 μg , sendo que a faixa de detecção teve valores de Ct que variaram de 14 a 30 (Fig. 5.4). Para IGS7/IGS9 as amplificações foram positivas para todas as reações contendo DNA de *P. psidii* e folhas infectadas. Nenhum sinal de fluorescência foi detectado em reações onde foram usados DNA de folhas saudas e de outras espécies de *Puccinia*, indicando a especificidade do conjunto de *primers* IGS7/IGS9 para *P. psidii*.

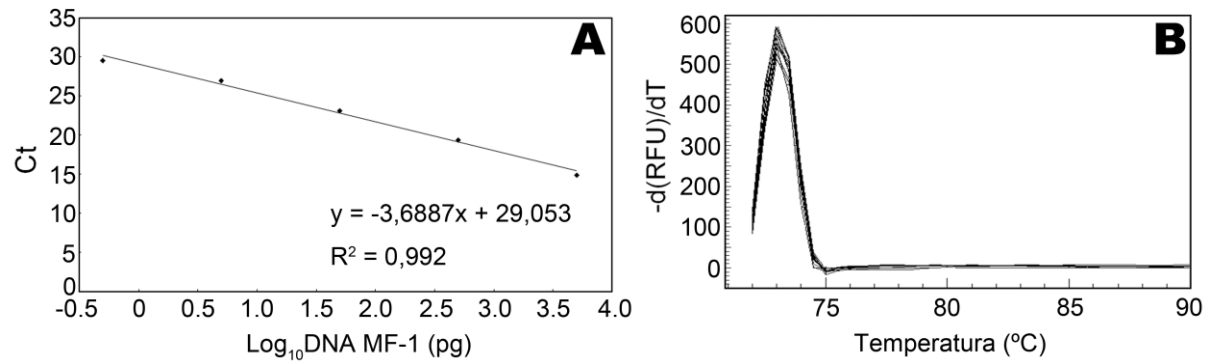


Figura 5.4 - Curva padrão e de *melting* do ensaio de qPCR utilizando os *primers* IGS7/IGS9. **A** – Curva padrão obtida com os valores de Ct e o Log da quantidade de DNA conhecida de MF-1 (pg) e **B** – Curva de *melting* mostrando um único pico de dissociação a 73 °C

5.3.3 Detecção e monitoramento de *P. psidii* em folhas de eucalipto em experimento controlado

Utilizando a curva padrão apresentada acima (Figura 5.4), o qPCR foi capaz de detectar e quantificar o DNA de *P. psidii* presente nas folhas de *E. grandis* infectadas em todos os tempos amostrados. Desta forma, a dinâmica do processo de infecção de *P. psidii* em folhas de *E. grandis* pôde ser acompanhada ao longo do tempo (Figura 5.5). Nas folhas inoculadas com MF-1, entre os tempos 0 e 240 h.a.i., a quantidade de DNA do patógeno detectado variou entre ~10,8 pg e 1.382 pg (Figura 5.5). Além disso, a quantidade de DNA de *P. psidii* calculada foi significativa entre os pontos 144 e 244 h.a.i. (Figura 5.5). Como esperado, o DNA das folhas falso-inoculadas (controles) não gerou nenhum sinal de fluorescência (sem amplificação) nos tempos amostrados (0 e 240 h.p.i.).

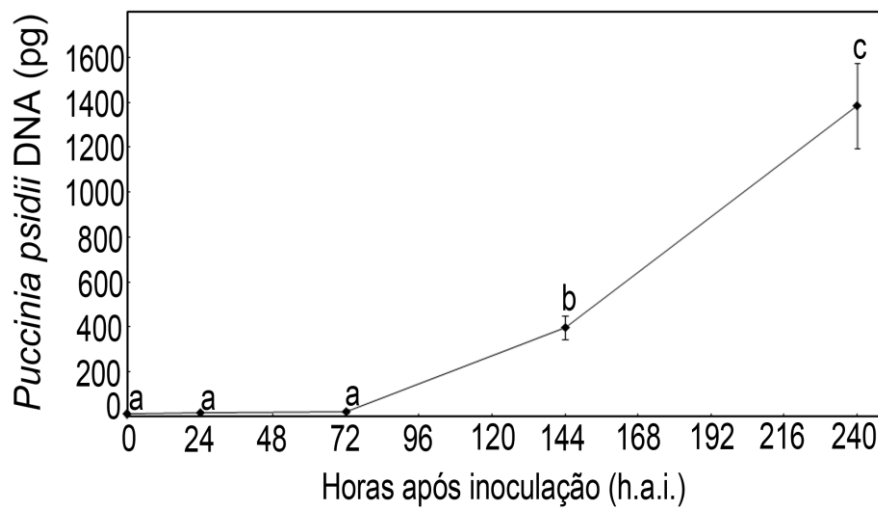


Figura 5.5 - Quantificação de *P. psidii* durante o processo de infecção de *E. grandis*. Para analisar a quantidade (pg) de DNA de MF-1 presente no tecido foliar infectado a média das cinco repetições biológicas foram usadas para cada ponto de amostragem; barras verticais representam erro padrão; letras diferentes são significantes estatisticamente ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey

5.3.4 Detecção da ferrugem do eucalipto em campo

Utilizando o conjunto de *primers* IGS7/IGS9, foi observada amplificação positiva para amostras de campo em ambas as datas de amostragem, 22 de outubro e 27 de novembro. Além disso, foi possível detectar a partir de folhas assintomáticas e sintomáticas diferentes quantidades de DNA de *P. psidii* em 5 ng de DNA total (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Folhas de *E. grandis* amostradas de plantas jovens na Estação experimental de Itatinga, Itatinga-SP, Brasil e análise por qPCR

Identificação da planta	Local da coleta	Data da amostragem	Sintomas de ferrugem *	qPCR **	
				Detecção de <i>P. psidii</i>	Quantificação (pg)***
85	Bloco 28	22.10.14	-	+	25.338 (10.591)
85	Bloco 28	22.10.14	+	+	382.543 (25.319)
85	Bloco 28	27.11.14	-	+	214.004 (7.398)
85	Bloco 28	27.11.14	+	+	1,058.724 (3.051)
14	Bloco 28	22.10.14	+	+	3,712.556 (171.062)
14	Bloco 28	27.11.14	+	+	221.639 (76.276)
170	Bloco 28	22.10.14	+	+	1,747.642 (277.162)
170	Bloco 28	27.11.14	+	+	271.177 (12.495)
185 (próximo a 170)	Bloco 28	22.10.14	-	+	14.974 (1.291)
185 (próximo a 170)	Bloco 28	27.11.14	-	-	0.000
127	Bloco 28	22.10.14	+	+	692.150 (37.861)
127	Bloco 28	27.11.14	+	+	982.821 (109.998)
134 (próximo a 127)	Bloco 28	22.10.14	-	-	0.000
134 (próximo a 127)	Bloco 28	27.11.14	+	+	37.412 (0.539)

* Sintomas da ferrugem do eucalipto visíveis a olho nu; + folhas com sintomas aparentes; - folhas sem sintomas.

** PCR quantitativo em tempo real (qPCR) com os *primers* IGS7/IGS9 desenvolvidos para *P. psidii* no presente baseado na sequência de DNA do isolado MF-1.; +, amostras com valores de Ct < 34; -, amostras com valores de Ct > 34.

***Quantidade em picogramas do DNA de *P. psidii* com base na curva padrão; erro padrão em parênteses.

Em 22 de outubro, a planta 85 apresentava folhas com e sem sintomas de ferrugem e nessas foram encontrados respectivamente ~ 382 e 25 pg de DNA de *P. psidii*. No outro mês (27 de novembro) os sintomas da doença na planta 85 eram mais severos e as folhas sintomáticas e assintomáticas apresentaram ~ 1.059 e 214 pg de DNA de *P. psidii*. O oposto foi observado na planta 14 que na primeira amostragem já apresentava grau avançado da doença e possuía apenas folhas sintomáticas, e aproximadamente 3.712 pg de DNA de *P. psidii* foram detectados. Na segunda amostragem, a planta 14 já se encontrava quase morta e suas folhas sintomáticas possuíam ~ 221 pg de DNA de *P. psidii* indicando a fase final da doença, sem existência de tecido saudável para colonização e multiplicação do patógeno.

Em ambas as datas de amostragem as plantas 170 e 127 apresentavam apenas folhas sintomáticas onde o DNA de *P. psidii* foi detectado. Em torno das plantas sintomáticas 170 e 127, duas plantas 185 e 134 não apresentavam quaisquer sintomas de ferrugem na primeira amostragem (22 de outubro) e suas folhas sem sintomas foram coletadas para análise. Por qPCR foi possível detectar na planta 185 aproximadamente 15 pg de DNA de *P. psidii* enquanto nas folhas da

planta 134 não foi detectado DNA do patógeno. Na segunda amostragem (27 de novembro) a planta 185 continuava sem apresentar sintomas, porém a planta 134 começou a apresentar os sintomas iniciais da ferrugem. Por qPCR uma pequena quantidade de DNA de *P. psidii* (~37 pg) foi detectada nas folhas da planta 134 enquanto que na planta 185 o DNA do patógeno não foi detectado.

Estes resultados sugerem que as plantas 185 e 134 possuem diferentes níveis de resistência à ferrugem quando comparadas com plantas 85, 14, 170 e 127 que se mostraram suscetíveis a *P. psidii*. A metodologia empregada foi eficaz para detectar e quantificar *P. psidii*, em folhas sintomáticas e assintomáticas de *E. grandis* no campo, em condições naturais de incidência da doença.

5.4 Discussão

Nos últimos anos, vários estudos têm apresentado metodologias baseadas na técnica de qPCR para auxiliar o diagnóstico de doenças em plantas. Para *Puccinia* spp. os trabalhos utilizam *primers* baseados no rDNA e a faixa de detecção é de 1 pg a 100 ng para *P. horiana* em *Chrysanthemum* (PEDLEY, 2009), 50 pg a 100 ng para *P. polysora* e *P. sorghi* em milho (CROUCH; SZABO, 2011), 1 pg a 1 ng para *P. pelargonii-zonalis* em *Geranium* (SCOCCO et al., 2013) e 0,11 pg a 11 ng para *P. psidii* in *Rhodomyrtus psidioides*, *Rhodamnia robescens*, *Syzygium jambos* e *Eugenia gocognei* (BASKARATHEVAN et al., 2016). No presente trabalho foi possível detectar de 0,5 pg a 5 ng de DNA de *P. psidii* em *E. grandis*, confirmando a sensibilidade do conjunto de *primers* IGS7/IGS9 desenvolvidos.

A técnica de qPCR é uma ferramenta importante para o diagnóstico molecular de patógenos biotróficos uma vez que, é impossível usar métodos de cultivo convencionais para detectar e identificar estes fungos (SANZANI et al., 2014). Sendo essa, uma das principais motivações para o desenvolvimento de um método eficiente para a detecção de *P. psidii* em *E. grandis*.

Atualmente, a identificação de *P. psidii* é feita por observação de sinais e sintomas da doença nas plantas, mas em hospedeiros menos susceptíveis, essa metodologia torna-se complicada (GLEN et al., 2007; SIMPSON; THOMAS; GRGURINOVIC, 2006). Mesmo em plantas de eucaliptos suscetíveis, são necessários, pelo menos, 5 dias após a infecção para o aparecimento dos primeiros sintomas para a detecção da doença e de 10 a 12 dias para a formação das

primeiras pústulas e uredóporos (XAVIER et al., 2001; LEITE, 2012). Utilizando a técnica de qPCR a detecção de *P. psidii* foi realizada em aproximadamente 4 horas, sendo possível diagnosticar a doença em folhas de *E. grandis* assintomáticas, provenientes tanto de plantas infectadas naturalmente no campo quanto de plantas que foram inoculadas com *P. psidii* em condições controladas. Assim, o método desenvolvido no presente estudo pode reduzir significativamente o tempo necessário para a detecção da ferrugem do eucalipto em viveiros e plantações jovens que não apresentam sintomas da doença e auxiliar no controle da mesma.

Um ensaio de PCR de confiança depende de *primers* altamente sensíveis, que são específicos para o organismo alvo (YAN et al., 2008) e conservados entre as populações desse organismo (NATH et al., 2014). Com este propósito, os genes de rDNA (IGS- região intergênica espaçadora e ITS região intergênica espaçadora transcrita), beta tubulina e fator de alongação são comumente alvos para o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos de fungos (LIANOS; FRANÇOIS; PARROU, 2015; MULLER et al., 2013; WESTPHAL et al., 2014; YAN et al., 2008; ZARIVI et al., 2015). Em trabalho recente QUECINE et al. (2014), mostraram, por meio de métodos independentes de cultivo, a existência de variabilidade genética entre diferentes populações de *P. psidii* no Brasil. Populações coletadas de goiaba, jaboticaba, e jambo são diferentes entre si e possuem um maior nível de diversidade do que as populações de eucalipto. No presente trabalho foram desenvolvidos três conjuntos de *primers* baseados nos genes IGS, BTub e EF, que se mostraram específicos ao DNA de *P. psidii* proveniente de isolados do Brasil e do Havaí e das populações utilizadas por Quecine et al. (2014), garantindo a capacidade dos *primers* para detectar o patógeno *P. psidii*. Além disso, nenhuma amplificação foi observada para as outras espécies de *Puccinia* testadas.

O conjunto de *primers* IGS7/IGS9 mostrou ser 100 vezes mais sensível que BTub1/BTub3 e EF5/EF2 para detectar o DNA de *P. psidii* em folhas de *E. grandis*. Baskarathevan et al. (2016), desenvolveram para *P. psidii* dois pares de *primers* um baseado na região ITS do rDNA e outro no gene beta tubulina, e obtiveram resultados semelhantes de sensibilidade, sendo que o primeiro gene foi 100 vezes mais sensível para detectar o agente patogênico que o segundo. Esses resultados já eram esperados uma vez que os genes do rDNA (IGS e ITS) têm um elevado número de cópias em genomas eucarióticos enquanto que BTub e EF são descritos como genes de cópia única (HAYDEN et al., 2004; YAN et al., 2008).

Langrell, Glen e Alfenas (2008) desenvolveram um ensaio de *nested* PCR para *P. psidii* utilizando *primers* para a região ITS e confirmaram que esta técnica foi útil para detectar e identificar o agente patogênico dentro de tecidos do hospedeiro. O desenvolvimento de ensaios de qPCR para o diagnóstico de *P. psidii* é uma ferramenta promissora uma vez que, é mais rápido, altamente sensível e menos trabalhoso, pois elimina o processamento pós-PCR (NATH et al., 2014; YAN et al., 2008). Além disso, o qPCR permite a quantificação do DNA de *P. psidii* dentro do tecido do hospedeiro diferente das técnicas qualitativas como o PCR convencional.

Até hoje, apenas um trabalho utilizou o qPCR com o objetivo de detectar precocemente *P. psidii* em folhas de *Rhodomyrtus psidioides*, *Rhodamnia rubescens*, *Syzygium jambos* e *Eugenia gocognei*, para tanto a metodologia desenvolvida foi baseada em sondas de hidrólise (TaqMan) e *primers* para a região ITS do rDNA e gene beta tubulina (BASKARATHEVAN et al., 2016). No presente trabalho o qPCR para detecção precoce e quantificação de *P. psidii* desenvolvido foi baseado em outro tipo de fluoróforo, o *SYBR Green*, que possui como vantagem baixo custo e facilidade no uso (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Além disso, dentre os três conjuntos de *primers* desenvolvidos, dois deles foram baseados em sequências da região IGS do rDNA e do gene EF que ainda não haviam sido exploradas em estudos de detecção de *P. psidii*. Baseado nos resultados obtidos neste estudo e no trabalho de Baskarathevan et al. (2016), os diferentes conjuntos de *primers* (IGS, ITS, Btub e EF) e compostos químicos fluorescentes (TaqMan® e SYBR® Green) se mostraram promissores para diagnosticar por qPCR a ferrugem do eucalipto em diferentes espécies de mirtáceas com diferentes níveis de infecção da doença.

Adicionalmente no presente trabalho um ensaio de monitoramento e quantificação temporal de *P. psidii* foi conduzido para estimar o crescimento do patógeno dentro das folhas de *E. grandis*. A quantidade de DNA de *P. psidii* (MF-1) muda ao longo do tempo amostrado sendo que, os principais incrementos na detecção do fungo ocorrem nos intervalos de tempo 72 a 144 h.a.i. e 144 a 240 h.a.i. Estes resultados corroboram os dados de microscopia de fluorescência de um trabalho prévio, realizado no laboratório, que descreve o processo de infecção de *P. psidii* em folhas de *E. grandis* genótipo S04 (LEITE, 2012).

Nos intervalos de tempo 0, 24 e 72 h.a.i foi possível detectar, respectivamente, ~ 11 pg, 18 pg e 22 pg de DNA de MF-1 a partir de 5 ng de DNA

total analisado. Estes resultados mostram a sensibilidade do conjunto de *primers* IGS7/IGS9 e seu potencial para detectar o patógeno em folhas de eucalipto assintomáticas. Resultados semelhantes foram obtidos por Alaei et al. (2009) para *P. horiana* onde o agente patogênico pode ser detectado no tecido hospedeiro imediatamente após a inoculação.

Utilizando os *primers* IGS7/IGS9 e a técnica de qPCR, o patógeno *P. psidii* também foi diagnosticado em folhas assintomáticas de *E. grandis* provenientes de campo com incidência natural da ferrugem. O método desenvolvido no presente trabalho é uma ferramenta promissora para melhorar o manejo da ferrugem, em viveiros e plantações jovens, já que permite monitorar áreas contaminadas e limitar a dispersão do inoculo no campo. Para fins fitossanitários, este método permite detectar e destruir materiais vegetais contaminados, a serem importados por diversos países, antes da formação das estruturas (uredósporos e pústulas) responsáveis pela propagação da doença.

Por fim, no presente trabalho foi possível desenvolver um ensaio de qPCR eficaz e sensível para detectar precocemente e quantificar *P. psidii* em folhas de *E. grandis* infectadas sob condições naturais e controladas. O método mostrou ser confiável e rápido, podendo auxiliar no monitoramento do patógeno em plantações comerciais e contribuir para melhores estratégias de manejo da ferrugem. E também é um método promissor para o estabelecimento de novas estratégias fitossanitárias visando à certificação de mudas de eucalipto livres desta grave doença quarentenária.

Referências

- ALAEI, H.; BAEVEN, S.; MAES, M.; HOFTE, M.; HEUNGENS, K. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 136-145, 2009.
- ALKAN, N.; GADKAR, V.; COBURN, J.; YARDEN, O.; KAPULNIK, Y. Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real - time polymerase chain reaction. **New Phytologist**, Oxford, v. 161, n. 3, p. 877-885, 2004.
- ANDERSON, J.B.; STASOVSKI, E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. **Mycologia**, Bronx, v. 84, p. 505-516, 1992.

ARIF, M.; DOBHAL, S.; GARRIDO, P.A.; ORQUERA, G.K.; ESPÍNDOLA, A.S.; YOUNG, C.A.; OCHOA-CORONA, F.M.; MAREK, S.M.; GARZÓN, C.D. Highly sensitive end-point PCR and SYBR Green qPCR detection of *Phymatotrichopsis omnivora*, causal fungus of cotton root rot. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 9, p. 1205-1212, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. Panorama do setor. São Paulo, 2014. 29 p. Disponível em: <<http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>> Acesso em: 22 abr. 2016.

BALDAUF, S.L.; DOOLITTLE, W.F. Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 22, p. 12007-12012, 1997.

BASKARATHEVAN, J.; TAYLOR, R.K.; HO, W.; MCDUGAL, R.L.; SHIVAS, R.G.; ALEXANDER, B.J.R. Real-time PCR assays for the detection of *Puccinia psidii*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, p. 617-624, 2016.

CARNEGIE, A.J. First report of *Puccinia psidii* (myrtle rust) in *Eucalyptus* plantations in Australia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 1, p. 161-161, 2015.

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

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

COVARELLI, L.; BECCARI, G.; STEED, A.; NICHOLSON, P. Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. **Plant Pathology**, Malden, v. 61, n. 6, p. 1121-1129, 2012.

CROUCH, J.A.; SZABO, L.J. Real-time PCR detection and discrimination of the southern and common corn rust pathogens *Puccinia polysora* and *Puccinia sorghi*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 6, p. 624-632, 2011.

DEMONTIS, M.A.; CACCIOLA, S.O.; ORRU, M.; BALMAS, V.; CHESSA, V.; MASERTI, B.E.; MASCIA, L.; RAUDINO, F.; DI SAN LIO, M.G.; MIGHELI, Q. Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of *Phoma tracheiphila* in infected Citrus. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, n. 4, p. 339-351, 2008.

DIANESE, J.C.; MORAES, T.S.A.; 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.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A.R. Fungal pathogens: the battle for plant infection. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 25, n. 6, p. 505-524, 2006.

GIBLIN, F. **Myrtle rust report: New Caledonia. Assessment of myrtle rust situation in New Caledonia. University of the Sunshine Coast Maroochydore, Maroochydore: USC**, 2013. 18 p. Disponível em: <<http://www.davar.gouv.nc/portal/page/portal/davar/librairie/fichiers/25074187.PDF>> Acesso em: 02 jun. 2016.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

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

GRAÇA, R.N.; AUN, C.P.; GUIMARÃES, L.M.S.; RODRIGUES, B.V.A.; ZAUZA, E.A.V.; ALFENAS, A.C. A new race of *Puccinia psidii* defeats the Ppr-1 resistance gene in *Eucalyptus grandis*. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v.40, p.442-447, 2011

GRGURINOVIC, C.A.; WALSH, D.; MACBETH, F. Eucalyptus rust caused by *Puccinia psidii* and the threat it poses to Australia. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 36, n. 3, p. 486-489, 2006.

HAYDEN, K.J.; RIZZO, D.; TSE, J.; GARBELOTTO, M. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 10, p. 1075-1083, 2004.

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

KAWANISHI, T.; UEMASTU, S.; KAKISHIMA, M.; KAGIWADA, S.; HAMAMOTO, H.; HORIE, H.; NAMBA, S. First report of rust disease on ohia and the causal fungus, *Puccinia psidii*, in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Chiyoda-Ku, v. 75, n. 6, p. 428-431, 2009.

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

LEITE, T.F. **Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter por meio da técnica de RNA-Seq.** 2012. 160 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LEITE, T.F.; MOON, D.H.; LIMA, A.C.M.; LABATE, C.A.; TANAKA, F.A.O. A simple protocol for whole leaf preparation to investigate the interaction between *Puccinia psidii* and *Eucalyptus grandis*. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 42, n. 1, p. 79-84, 2013.

LIANOS, A.; FRANÇOIS, J.M.; PARROU, J-L. Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 1, p. 1-18, 2015.

MARLATT, R.B.; KIMBROUGH, J.W. *Puccinia psidii* on *Pimenta dioica* in south Florida. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 63, n. 6, p. 510-512, 1979.

MCTAGGART, A.R.; ROUX, J.; GRANADOS, G.M.; GAFUR, A.; TARRIGAN, M.; SANTHAKUMAR, P.; WINGFIELD, M. J. Rust (*Puccinia psidii*) recorded in Indonesia poses a threat to forests and forestry in South-East Asia. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 83-89, 2016.

MULLER, L.K.; LORCH, J.M.; LINDNER, D.L.; O'CONNOR, M.; GARGAS, A.; BLEHERT, D.S. Bat white-nose syndrome: a real-time TaqMan polymerase chain reaction test targeting the intergenic spacer region of *Geomyces destructans*. **Mycologia**, Lawrence, v. 105, n. 2, p. 253-259, 2013.

NATH, V.S.; HEGDE, V.M.; JEEVA, M.L.; MISRA, R.S.; VEENA, S.S.; RAJ, M.; UNNIKRISHNAN, S.K.; DARVEEKARAN, S.S. Rapid and sensitive detection of *Phytophthora colocasiae* responsible for the taro leaf blight using conventional and real-time PCR assay. **FEMS Microbiology Letters**, Hoboken, v. 352, n. 2, p. 174-183, 2014.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 33, p.10-13, 2004.

PEDLEY, K.F. PCR-based assays for the detection of *Puccinia horiana* on Chrysanthemums. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 12, p. 1252-1258, 2009.

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

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

ROUX, J.; GREYLING, I.; COUTINHO, T.A.; VERLEUR, M.; WINGFIELD, M.J. The Myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. **IMA fungus**, Madrid, v. 4, n. 1, p. 155-159, 2013.

SANZANI S.M.; LI DESTRI NICOSIA, M.G.; FAEDDA, R.; CACCIOLA, S.O.; SCHENA, L. Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and oomycetes in environmental samples. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 162, n. 1, p. 1-13, 2014.

SCOCCO, E.A.; WALCOTT, R.R.; JEFFERS, S.N.; BUCK, J.W. Detection of *Puccinia pelargonii* - *zonalis* - infected geranium tissues and urediniospores. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 161, n. 5, p. 341-347, 2013.

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

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOMMERUP, I.C.; ALFENAS, A.C.; OLD, K.M. Guava rust in Brazil - a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. **New Zealand Journal of Forestry Science**, London, v. 33, n. 3, p. 420-428, 2003.

UCHIDA, J.; ZHONG, S.; KILLGORE, E. First report of a rust disease on ohia caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 4, p. 524-524, 2006.

WESTPHAL, A.; LI, C.; XING, L.; MCKAY, A.; MALVICK, D. Contributions of *Fusarium virguliforme* and *Heterodera glycines* to the disease complex of sudden death syndrome of soybean. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e99529, 2014.

WINTER, G. Repertorium. Rabenhorstii fungi europaei et extraeuraopaei. Centuria XXXI et XXXII. **Hedwigia**, Stuttgart, v. 23, p.164-175, 1884.

YAN, L.; ZHANG, C.; DING, L.; MA, Z. Development of a real - time PCR assay for the detection of *Cladosporium fulvum* in tomato leaves. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 5, p. 1417-1424, 2008.

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

ZARIVI, O.; CESARE, P.; RAGNELLI, A.M.; AIMOLA, P.; LEONARDI, M.; BONFIGLI, A.; COLAFARINA, S.; POMA, A.M.; MIRANDA, M.; PACIONI, G. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in périgord black truffle (*Tuber melanosporum*) developmental stages. **Phytochemistry**, Oxford, v. 116, p. 78-86, 2015.

ZAUZA, E.A.V.; LANA, V.M.; MAFFIA, L.A.; ARAUJO, M.M.F.C.; ALFENAS R.F.; SILVA F.F.; ALFENAS, A.C. Wind dispersal of *Puccinia psidii* urediniospores and progress of eucalypt rust. **Forest Pathology**, Hoboken, v. 45, n. 2, p. 102-110, 2015.

ZHUANG, J-Y.; WEI, S-X. Additional materials for the rust flora of Hainan Province, China. **Mycosystema**, Beijing, v. 30, p. 853-860, 2011.

6 CONCLUSÕES

O estudo da expressão gênica do processo inicial de germinação e diferenciação *in vitro* de *P. psidii*, revelou a ocorrência de transcritos relacionados a patogenicidade, germinação e formação das estruturas de infecção do patógeno. Os transcritos diferencialmente expressos codificam proteínas como efetores e hidrolases incluindo glicosil hidrolases, proteases, peptidases e lipases. É provável que a expressão desses genes *in vitro* esteja relacionada com a presença do azeite de oliva e da membrana de diálise em meio de cultura, compostos equivalentes aos da superfície foliar do hospedeiro.

As análises de metabolômica revelaram que alcanos, ácidos graxos, flavonoides e cetonas estão presentes nas ceras cuticulares de *E. grandis* e no azeite de oliva. Essas moléculas foram sugeridas como substâncias promotoras da germinação *in vitro* de *P. psidii*. Esses resultados também corroboram a hipótese de que a germinação e diferenciação do patógeno foi possível em meio de cultura, pois o azeite de oliva e a membrana de diálise simularam *in vitro* condições encontradas pelo patógeno nas folhas de *E. grandis*.

As análises de transcritos juntamente com a de metabólitos, permitiu trilhar novos *insights* a respeito da influência da cutícula das folhas de *E. grandis* no reconhecimento do hospedeiro, início da germinação e desenvolvimento de *P. psidii*. Além disso, a metabolômica se mostrou uma ferramenta importante para identificar metabólitos que podem estar relacionados com a resistência de plantas de *E. grandis* à *P. psidii*.

Por fim, no presente trabalho foi possível desenvolver um ensaio de qPCR para detectar e quantificar *P. psidii* em folhas de *E. grandis*. O método desenvolvido poderá auxiliar no monitoramento do patógeno em plantações comerciais e contribuir para estratégias de manejo da ferrugem. E também é promissor como estratégia fitossanitária, para a certificação de mudas de eucalipto livres desta grave doença quarentenária.

ANEXOS

ANEXO A - *Scripts* do R utilizados para a análise de expressão diferencial da germinação e diferenciação in vitro de *P. psidii*

Differential Gene Expression analysis - Puccinia psidii in vitro development

Andressa Peres Bini

May, 15, 2016

```
library(edgeR)

##Loading required package: limma

rm(list=ls())
setwd("C:/Users/Samsung/Desktop/EdgeR/R dados puccinia_final")

#Import description of the experiment
targets<-read.table("targets.txt",header=T)
targets

## samples treatment
##1  OR1  0h
##2  OR2  0h
##3  OR3  0h
##4  OR4  0h
##5  12R1 12h
##6  12R2 12h
##7  12R3 12h
##8  12R4 12h
##9  24R1 24h
##10 24R2 24h
##11 24R3 24h
##12 24R4 24h

targets$samples<-as.factor(targets$samples)
targets$treatment<-relevel(targets$treatment,ref = "0h")

#Import matrix of RNASeq counts per gene per sample (computed by eXpress)
hpi_counts<-
read.table("Express_All_geneLevel_withMaxLength_integers.txt",header=T,row.names='Gene',sep="\t")
dim(hpi_counts)

[1] 13781  13

head(hpi_counts, n=3L)

      X0R1 X0R2 X0R3 X0R4 X12R1 X12R2 X12R3 X12R4 X24R1 X24R2 X24R3
TRINITY_DN22462_c0_g1  0  0  0  0  0  2  0  2  0  0  0
TRINITY_DN3675_c0_g1   6  0  3  6  6  1  3  5  1  1  7
TRINITY_DN14798_c0_g1 889 784 1039 759 524 717 567 509 492 509 592
      X24R4 Length
TRINITY_DN22462_c0_g1  2  405
TRINITY_DN3675_c0_g1   3  487
TRINITY_DN14798_c0_g1 551 2131

hpi_counts_degobj<-
DGEList(counts=hpi_counts[,1:12],group=targets$treatment,genes=data.frame(GeneID=rownames(hpi_counts),Length=hpi_counts[,13]))
hpi_counts_degobj$samples
```

```

group lib.size norm.factors
X0R1 0h 9817162 1
X0R2 0h 9868293 1
X0R3 0h 9785837 1
X0R4 0h 7673405 1
X12R1 12h 9102105 1
X12R2 12h 11781058 1
X12R3 12h 10110554 1
X12R4 12h 9511224 1
X24R1 24h 9222718 1
X24R2 24h 8577639 1
X24R3 24h 10091751 1
X24R4 24h 10768386 1

```

```
dim(hpi_counts_degobj)
```

```
##[1] 13781 12
```

```
hpi_counts_degobj
```

```

          X0R1 X0R2 X0R3 X0R4 X12R1 X12R2 X12R3 X12R4 X24R1 X24R2 X24R3
TRINITY_DN22462_c0_g1 0 0 0 0 0 2 0 2 0 0 0
TRINITY_DN3675_c0_g1 6 0 3 6 6 1 3 5 1 1 7
TRINITY_DN14798_c0_g1 889 784 1039 759 524 717 567 509 492 509 592
          X24R4 Length
TRINITY_DN22462_c0_g1 2 405
TRINITY_DN3675_c0_g1 3 487
TRINITY_DN14798_c0_g1 551 2131

```

```
>
```

```

                                hpi_counts_degobj<-
DGEList(counts=hpi_counts[,1:12],group=targets$treatment,genes=data.frame(GeneID=rownames(hpi_counts),Length=hpi_counts[,13]))

```

```
> hpi_counts_degobj$samples
```

```

group lib.size norm.factors
X0R1 0h 9817162 1
X0R2 0h 9868293 1
X0R3 0h 9785837 1
X0R4 0h 7673405 1
X12R1 12h 9102105 1
X12R2 12h 11781058 1
X12R3 12h 10110554 1
X12R4 12h 9511224 1
X24R1 24h 9222718 1
X24R2 24h 8577639 1
X24R3 24h 10091751 1
X24R4 24h 10768386 1

```

```
> dim(hpi_counts_degobj)
```

```
[1] 13781 12
```

```
> hpi_counts_degobj
```

```
An object of class "DGEList"
```

```
$counts
```

```

          X0R1 X0R2 X0R3 X0R4 X12R1 X12R2 X12R3 X12R4 X24R1 X24R2 X24R3
TRINITY_DN22462_c0_g1 0 0 0 0 0 2 0 2 0 0 0
TRINITY_DN3675_c0_g1 6 0 3 6 6 1 3 5 1 1 7
TRINITY_DN14798_c0_g1 889 784 1039 759 524 717 567 509 492 509 592
TRINITY_DN9096_c0_g1 3075 2867 4100 2586 2139 3108 2829 2719 3695 3718 4177
TRINITY_DN7341_c0_g1 1 3 3 3 1 6 4 1 0 0 1
          X24R4
TRINITY_DN22462_c0_g1 2
TRINITY_DN3675_c0_g1 3

```

```

TRINITY_DN14798_c0_g1 551
TRINITY_DN9096_c0_g1 4498
TRINITY_DN7341_c0_g1 1
13776 more rows ...

```

\$samples

```

  group lib.size norm.factors
X0R1 0h 9817162 1
X0R2 0h 9868293 1
X0R3 0h 9785837 1
X0R4 0h 7673405 1
X12R1 12h 9102105 1
7 more rows ...

```

\$genes

```

  GeneID Length
1 TRINITY_DN22462_c0_g1 405
2 TRINITY_DN3675_c0_g1 487
3 TRINITY_DN14798_c0_g1 2131
4 TRINITY_DN9096_c0_g1 1464
5 TRINITY_DN7341_c0_g1 740
13776 more rows ...

```

Only keep genes that achieve at least one count per million in at least 3 samples

```
hpi_counts_degobj_keep <- rowSums(cpm(hpi_counts_degobj)>1) >= 3
```

```
hpi_counts_degobj<-hpi_counts_degobj[hpi_counts_degobj_keep,]
```

```
dim(hpi_counts_degobj)
```

```
##[1] 8294 12
```

```
hpi_counts_degobj
```

An object of class "DGEList"

\$counts

```

      X0R1 X0R2 X0R3 X0R4 X12R1 X12R2 X12R3 X12R4 X24R1 X24R2 X24R3
TRINITY_DN14798_c0_g1 889 784 1039 759 524 717 567 509 492 509 592
TRINITY_DN9096_c0_g1 3075 2867 4100 2586 2139 3108 2829 2719 3695 3718 4177
TRINITY_DN14054_c0_g1 1641 1706 1951 1426 1354 1966 1386 1303 1212 1274 1312
TRINITY_DN18557_c1_g1 141 166 135 139 121 180 172 93 79 71 109
TRINITY_DN11815_c0_g1 7 14 11 9 6 14 7 5 17 9 13
      X24R4
TRINITY_DN14798_c0_g1 551
TRINITY_DN9096_c0_g1 4498
TRINITY_DN14054_c0_g1 1436
TRINITY_DN18557_c1_g1 136
TRINITY_DN11815_c0_g1 10
8289 more rows ...

```

\$samples

```

  group lib.size norm.factors
X0R1 0h 9817162 1
X0R2 0h 9868293 1
X0R3 0h 9785837 1
X0R4 0h 7673405 1
X12R1 12h 9102105 1
7 more rows ...

```

\$genes

```

  GeneID Length
3 TRINITY_DN14798_c0_g1 2131

```

```

4 TRINITY_DN9096_c0_g1 1464
6 TRINITY_DN14054_c0_g1 2299
7 TRINITY_DN18557_c1_g1 935
10 TRINITY_DN11815_c0_g1 1111
8289 more rows ...

```

```

# Recompute library sizes after removing "non-expressed genes"
hpi_counts_degobj$samples$lib.size <-colSums(hpi_counts_degobj$count)

```

```

#Compute normalization based due to the differences in the lib. sizes
hpi_counts_degobj<-calcNormFactors(hpi_counts_degobj)
hpi_counts_degobj$samples

```

```

  group lib.size norm.factors
X0R1  0h 9805140  1.0313071
X0R2  0h 9854328  1.0654294
X0R3  0h 9771758  0.9811395
X0R4  0h 7663187  1.0353400
X12R1 12h 9096183  0.9941934
X12R2 12h 11771831 0.9860182
X12R3 12h 10102516 0.9828243
X12R4 12h 9503898  0.9650904
X24R1 24h 9216258  1.0013945
X24R2 24h 8572206  0.9852364
X24R3 24h 10084499 0.9837205
X24R4 24h 10760782 0.9927880

```

```

#Create the experimental design table
#The comparisons must be made by explicit contrast.
design<-model.matrix(~0+treatment, data=target)
design

```

```

  treatment0h treatment12h treatment24h
1           1           0           0
2           1           0           0
3           1           0           0
4           1           0           0
5           0           1           0
6           0           1           0
7           0           1           0
8           0           1           0
9           0           0           1
10          0           0           1
11          0           0           1
12          0           0           1

```

```

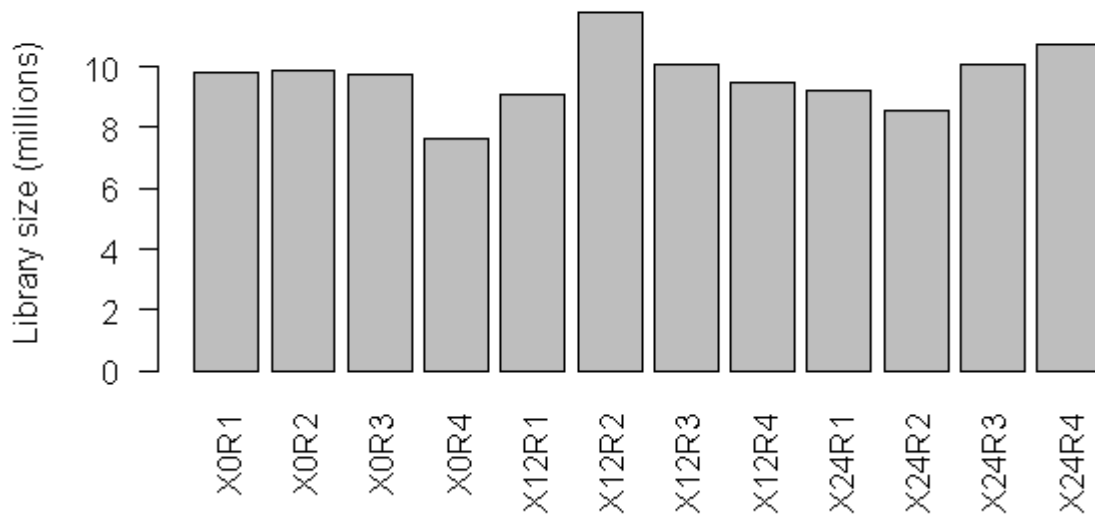
attr("assign")
[1] 1 1 1
attr("contrasts")
attr("contrasts")$treatment
[1] "contr.treatment"

```

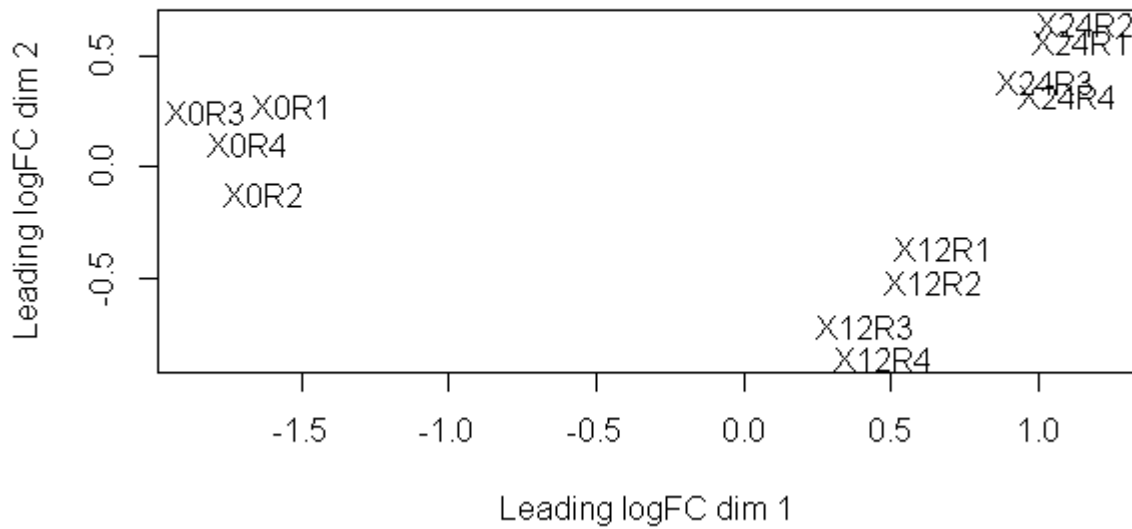
```

hpi_counts_degobj <- estimateGLMCommonDisp(hpi_counts_degobj,design)
hpi_counts_degobj <- estimateGLMTrendedDisp(hpi_counts_degobj,design)
hpi_counts_degobj <- estimateGLMTagwiseDisp(hpi_counts_degobj,design)
barplot(hpi_counts_degobj$samples$lib.size*1e-
6,names=rownames(hpi_counts_degobj$samples),ylab="Library size (millions)",las=2)

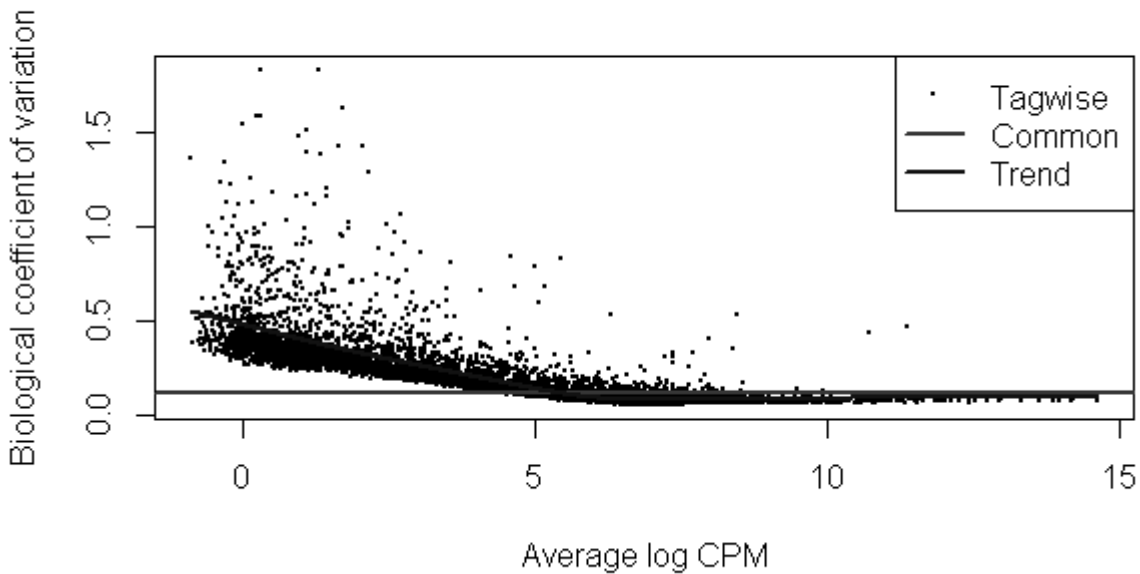
```



```
plotMDS(hpi_counts_degobj)
```

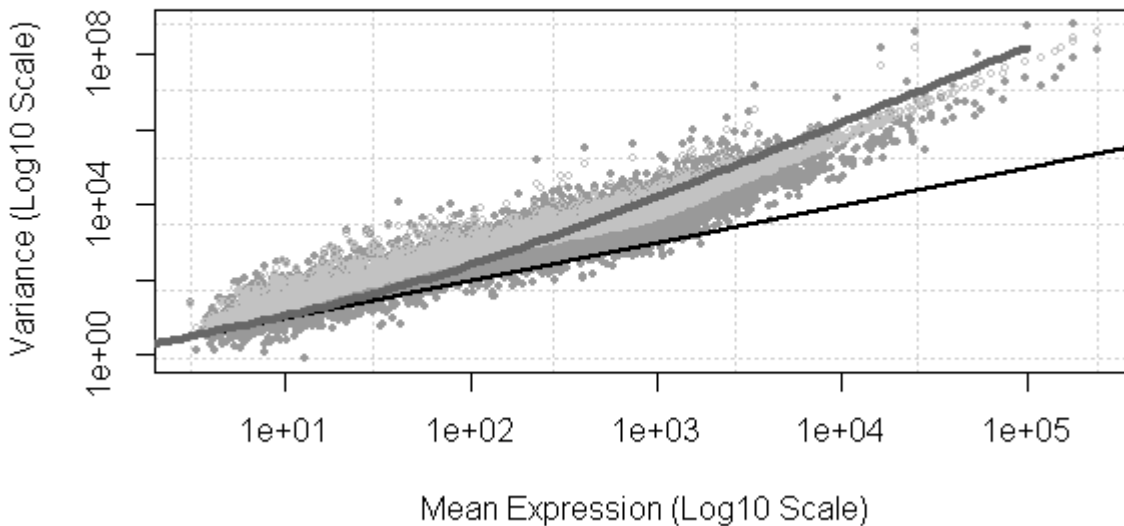


```
plotBCV(hpi_counts_degobj)
```



```
plotMeanVar(hpi_counts_degobj, show.raw.vars=TRUE, show.tagwise.vars=TRUE
,show.binned.common.disp.vars=FALSE, show.ave.raw.vars=FALSE, NBlines = TRUE, nbins = 100
,pch = 16, xlab = "Mean Expression (Log10 Scale)", ylab = "Variance (Log10 Scale)", main = "Mean-
Variance Plot")
```

Mean-Variance Plot



```
fit_hpi_counts<-glmFit(hpi_counts_degobj, design)
colnames(fit_hpi_counts)
```

```
##[1] "treatment0h" "treatment12h" "treatment24h"
```

```
#Differentially expressed genes in consecutive samples - Likelihood ratio test
```

```
# 12h - 0h
```

```
lrt_12h_0h<-glmLRT(fit_hpi_counts, contrast=c(-1,1,0))
```

```
# 24h-12h
```

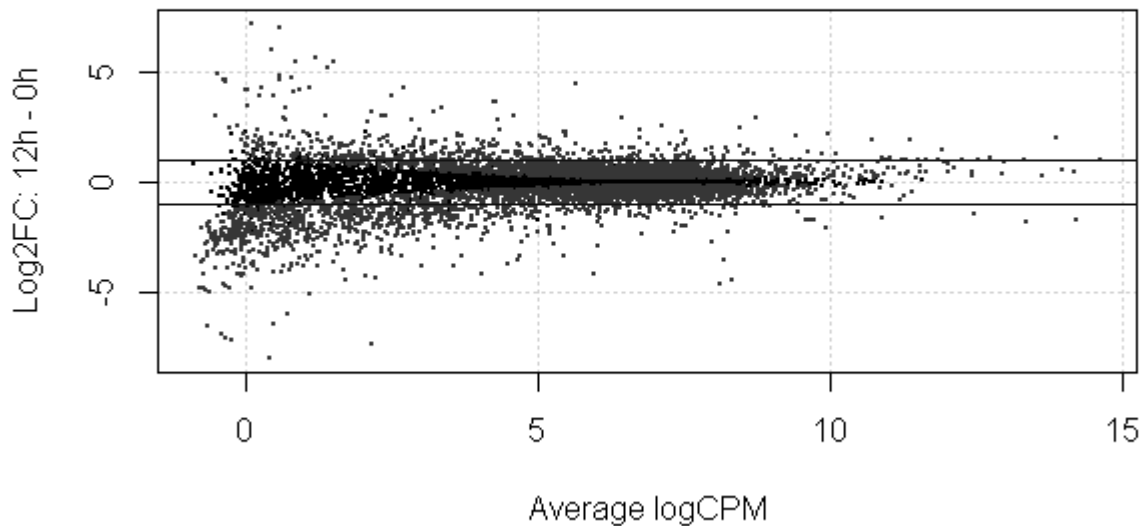
```
lrt_24h_12h<-glmLRT(fit_hpi_counts, contrast=c(0,-1,1))
```

```
#Select (index) differentially expressed genes, FDR <=0.05
de12h_0h<-decideTestsDGE(lrt_12h_0h)
de24h_12h<-decideTestsDGE(lrt_24h_12h)
```

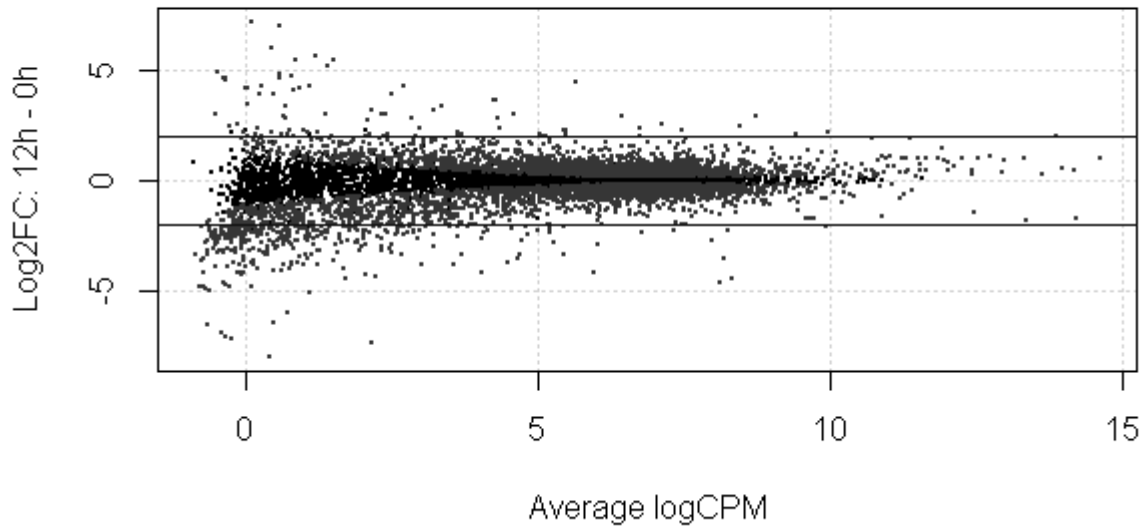
```
#Summary and MA plots
#12h-0h
table(de12h_0h)
```

```
de12h_0h
-1  0  1
2454 3663 2177
```

```
plotSmear(lrt_12h_0h, de.tags=rownames(hpi_counts_degobj)[as.logical(de12h_0h)], ylab = 'Log2FC:
12h - 0h')
abline(h=c(-1, 1), col="blue")
```



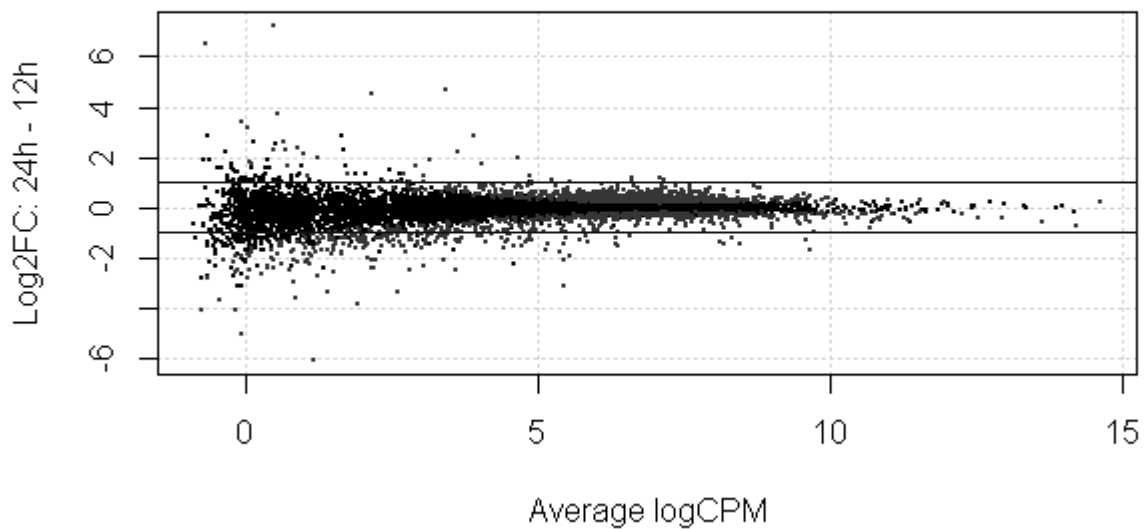
```
plotSmear(lrt_12h_0h, de.tags=rownames(hpi_counts_degobj)[as.logical(de12h_0h)], ylab = 'Log2FC:
12h - 0h')
abline(h=c(-2, 2), col="blue")
```

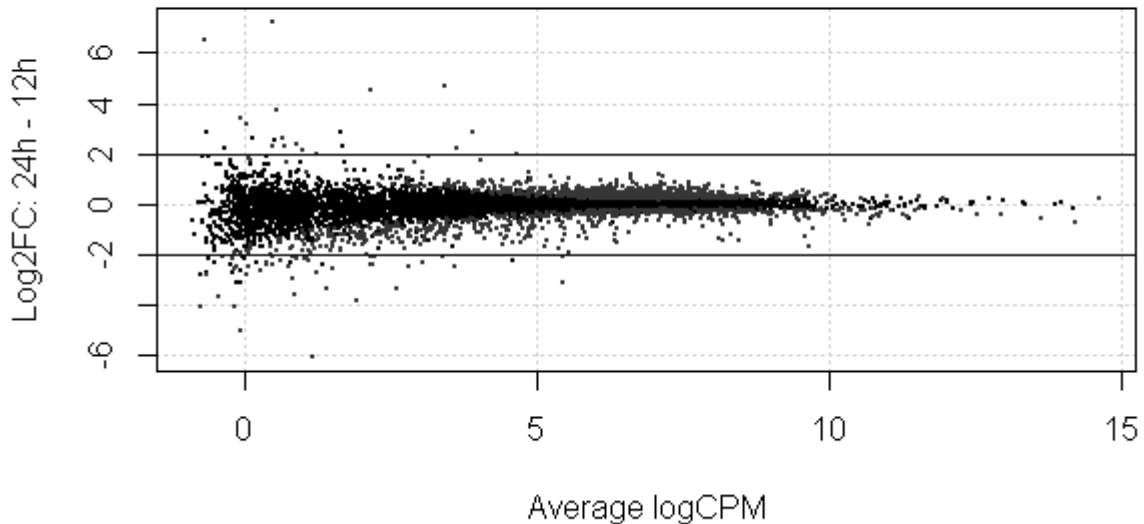
```
#24h-12h
table(de24h_12h)
```

```
de24h_12h
-1  0  1
666 6792 836
```

```
plotSmear(lrt_24h_12h, de.tags=rownames(hpi_counts_degobj)[as.logical(de24h_12h)], ylab =
'Log2FC: 24h - 12h')
abline(h=c(-1, 1), col="blue")
```



```
plotSmear(lrt_24h_12h, de.tags=rownames(hpi_counts_degobj)[as.logical(de24h_12h)], ylab =
'Log2FC: 24h - 12h')
abline(h=c(-2, 2), col="blue")
```



```

#List of diffexp genes with FDR<=0.05
DEGenes12h_0h<-topTags(lrt_12h_0h,n=as.numeric(table(de12h_0h)[3]+table(de12h_0h)[1]))
DEGenes24h_12h<-topTags(lrt_24h_12h,n=as.numeric(table(de24h_12h)[3]+table(de24h_12h)[1]))

#Exporting tables of DE genes
write.table(DEGenes12h_0h, file="DEGenes_12h-0h.txt")
write.table(DEGenes24h_12h, file="DEGenes_24h-12h.txt")

#Exporting the expression values as CPM
hpi_counts_degobj_CPM<-cpm(hpi_counts_degobj,log=FALSE)
write.table(hpi_counts_degobj_CPM, file="Express_All_genelevel.CPM.tbl")

#Exporting the expression values as FPKM
hpi_counts_degobj_FPKM<-
rpkm(hpi_counts_degobj,log=FALSE,normalized.lib.sizes=TRUE,prior.count=0.25)
write.table(hpi_counts_degobj_FPKM, file="Express_All_genelevel.FPKM.tbl")

#End
sessionInfo()

R version 3.2.1 (2015-06-18)
Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit)
Running under: Windows 7 (build 7601) Service Pack 1

locale:
[1] LC_COLLATE=Portuguese_Brazil.1252 LC_CTYPE=Portuguese_Brazil.1252
[3] LC_MONETARY=Portuguese_Brazil.1252 LC_NUMERIC=C
[5] LC_TIME=Portuguese_Brazil.1252

attached base packages:
[1] stats  graphics  grDevices  utils  datasets  methods  base

other attached packages:
[1] edgeR_3.10.5  limma_3.24.15  TargetSearch_1.24.0  mzR_2.2.2
[5] Rcpp_0.12.3

```

loaded via a namespace (and not attached):

[1] ProtGenerics_1.0.0 parallel_3.2.1 tools_3.2.1 Biobase_2.28.0
 [5] splines_3.2.1 codetools_0.2-14 BiocGenerics_0.14.0 tcltk_3.2.1

ANEXO B - Lista dos 133 transcritos diferencialmente expressos na comparação 12h-0h

Tabela 1- Transcritos anotados e diferencialmente expressos em 12h-0h e 24h-12h

						(continua)
ID transcrito	Descrição/função putativa (Blast2go)	Tamanho (pb)	Log ₂ FC	PValue	FDR	
TRINITY_DN15094_c0_g1	Retrovirus-related Pol poly from transposon 412 GN=POL PE=4 SV=1	2039	-7,085	7,52E-13	7,94E-12	
TRINITY_DN7912_c0_g1	Family 1 polysaccharide lyase	1220	-4,854	3,10E-07	1,51E-06	
TRINITY_DN965_c0_g2	AP-2 complex subunit MU-1	454	-4,755	1,50E-09	1,04E-08	
TRINITY_DN18670_c1_g3	Retrotransposon poly	6319	-4,632	2,56E-187	1,06E-183	
TRINITY_DN3017_c0_g1	Thiazole biosynthetic enzyme, mitochondrial	1552	-4,232	7,16E-49	8,02E-47	
TRINITY_DN24166_c0_g1	Glutaminyl-tRNA synthetase	1739	-4,172	4,34E-08	2,38E-07	
TRINITY_DN4726_c0_g1	Fatty acid synthase subunit beta	3078	-4,152	2,58E-11	2,25E-10	
TRINITY_DN17138_c1_g2	UDP-glucose 4-epimerase 115 kDa in type-1 retrotransposable element R1DM	2671	-4,042	3,93E-16	6,07E-15	
TRINITY_DN19810_c0_g1	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	1140	-3,878	5,91E-10	4,30E-09	
TRINITY_DN13350_c0_g1	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	2961	-3,844	1,16E-11	1,05E-10	
TRINITY_DN10682_c0_g3	Prefoldin subunit 2	908	-3,726	0,010744	0,021524	
TRINITY_DN10779_c0_g2	ATP synthase subunit 8 (mitochondrion)	1327	-3,718	1,09E-10	8,77E-10	
TRINITY_DN16488_c0_g1	Putative permease	738	-3,623	7,59E-07	3,48E-06	
TRINITY_DN18409_c0_g1	Histone H4	1372	-3,505	5,53E-06	2,17E-05	
TRINITY_DN6568_c0_g1	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	1013	-3,471	3,32E-09	2,16E-08	
TRINITY_DN14208_c0_g1	Cytochrome b5	1065	-3,399	3,09E-75	7,76E-73	
TRINITY_DN10067_c0_g1	Neutral alkaline nonlysosomal ceramidase	1113	-3,366	1,06E-06	4,77E-06	
TRINITY_DN15565_c0_g1	Effector candidate	1165	-3,315	1,13E-07	5,83E-07	
TRINITY_DN18213_c1_g1	SPOSA6832_00186, partial	1865	-3,282	1,62E-18	3,11E-17	
TRINITY_DN2787_c0_g1	Poly (gag pol) of Ty1 Copia retrotransposon	564	-3,275	1,96E-06	8,29E-06	
TRINITY_DN7869_c0_g1	Importin beta-2 subunit mRNA binding post-transcriptional regulator (Csx1)	1975	-3,141	0,000493	0,001354	
TRINITY_DN10021_c0_g1	Uncharacterized mitochondrial g00810-like	2360	-3,105	5,98E-08	3,20E-07	
TRINITY_DN24301_c0_g1	Uncharacterized mitochondrial g00810-like	521	-3,102	2,15E-06	9,01E-06	
TRINITY_DN17895_c0_g1	Acyl- thioesterases 11	1985	-3,085	6,62E-21	1,59E-19	
TRINITY_DN16444_c0_g1	Cytochrome b5	1752	-3,065	4,75E-08	2,58E-07	
TRINITY_DN16013_c0_g6	CCR4-NOT complex subunit CAF16	965	-3,057	0,002748	0,006363	
TRINITY_DN15678_c0_g1	Fatty acid synthase subunit beta	2505	-3,004	2,56E-23	7,14E-22	
TRINITY_DN5964_c0_g1	Carotenoid ester lipase precursor	1110	-2,972	1,14E-08	6,86E-08	
TRINITY_DN3972_c0_g1	Mitochondrial 37S ribosomal MRP2	1323	-2,954	9,36E-07	4,24E-06	
TRINITY_DN5074_c0_g1	COPIA_DROME ame: Full=Copia ame: Full=Gag-int-pol Contains: ame: Full=Copia VLP Contains: ame: Full=Copia protease	1122	-2,944	4,22E-05	0,000142	
TRINITY_DN17437_c0_g1	Pleiotropic drug resistance ABC transporter	2285	-2,937	1,13E-07	5,83E-07	
TRINITY_DN17286_c1_g1	Beta-lactamase superfamily	2507	-2,931	1,54E-08	9,09E-08	
TRINITY_DN18701_c0_g3	TPA: transposase domain-containing	5044	-2,904	1,40E-108	8,92E-106	

Tabela 1- Transcritos anotados e diferencialmente expressos em 12h-0h e 24h-12h

(continuação)					
ID transcrito	Descrição/função putativa (Blast2go)	Tamanho (pb)	Log ₂ FC	PValue	FDR
TRINITY_DN2483_c0_g1	Family 24 glycosyltransferase	1379	-2,835	2,23E-05	7,89E-05
TRINITY_DN14419_c0_g1	Ketopantoate reductase	3133	-2,872	1,66E-15	2,43E-14
TRINITY_DN10894_c0_g3	Actin-like ATPase domain-containing	2017	-2,884	0,000125	0,000382
TRINITY_DN7933_c0_g1	Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	553	-2,870	1,55E-07	7,82E-07
TRINITY_DN15269_c0_g1	Nuclease HARBI1	1474	-2,868	1,26E-18	2,44E-17
TRINITY_DN10099_c0_g1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	1733	-2,797	3,39E-07	1,63E-06
TRINITY_DN17770_c0_g2	Thyroid receptor-interacting 13	2508	-2,796	2,99E-09	1,95E-08
TRINITY_DN24527_c0_g1	NADH dehydrogenase subunit 6, partial (mitochondrion)	637	-2,779	2,07E-07	1,03E-06
TRINITY_DN8660_c0_g1	ATP synthase subunit 6, partial (mitochondrion)	2492	-2,779	3,87E-08	2,15E-07
TRINITY_DN9172_c0_g1	Translation initiation factor eIF-3 subunit 7	1174	-2,723	9,28E-11	7,52E-10
TRINITY_DN7963_c0_g1	Secreted protein	919	-2,652	0,000302	0,000866
TRINITY_DN16921_c0_g6	Cyclin domain-containing , partial	611	-2,634	1,96E-08	1,14E-07
TRINITY_DN21962_c0_g1	Gag-pol fusion mitochondrial intermediate peptidase	892	-2,605	7,72E-05	0,000245
TRINITY_DN16283_c0_g2	Mitochondrial precursor	1795	-2,577	3,47E-09	2,25E-08
TRINITY_DN8864_c0_g1	Splicing factor 3B subunit 1	1776	-2,559	9,26E-05	0,00029
TRINITY_DN14891_c0_g1	Ion protease	1048	-2,554	7,20E-07	3,32E-06
TRINITY_DN9210_c0_g1	MTND_PUCGT ame: Full=1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase ame: Full=Acireductone dioxygenase (Fe(2+)-requiring) Short=ARD Short=Fe-ARD	626	-2,524	0,000107	0,000332
TRINITY_DN8981_c0_g1	Carotenoid ester lipase precursor	757	-2,494	3,98E-06	1,60E-05
TRINITY_DN11491_c0_g2	Apocytochrome B	1191	-2,491	2,36E-09	1,58E-08
TRINITY_DN16988_c0_g1	Cryptochrome DASH-like	1634	-2,462	1,92E-07	9,53E-07
TRINITY_DN12992_c0_g1	Membrane transporter	1968	-2,423	2,77E-08	1,57E-07
TRINITY_DN13573_c0_g1	Reverse transcriptase, partial	487	-2,407	3,68E-05	0,000125
TRINITY_DN17269_c2_g1	Zinc metalloprotease	5900	-2,392	1,10E-20	2,55E-19
TRINITY_DN8865_c0_g1	AAA family ATPase midasin	1113	-2,381	9,28E-05	0,00029
TRINITY_DN13220_c0_g1	Homoserine O-acetyltransferase	548	-2,380	0,00129	0,003234
TRINITY_DN17861_c0_g1	Retrotransposon , partial	1147	-2,367	9,23E-05	0,000289
TRINITY_DN17188_c1_g1	Family 76 glycoside hydrolase	3113	-2,336	7,50E-37	4,44E-35
TRINITY_DN11485_c0_g1	MC family mitochondrial carrier	722	-2,334	6,39E-07	2,96E-06
TRINITY_DN17153_c1_g1	Ribosomal- -alanine N-acetyltransferase	1291	-2,324	4,24E-05	0,000142
TRINITY_DN18298_c3_g1	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)	1311	-2,323	5,12E-12	4,84E-11
TRINITY_DN17586_c1_g1	Multicopper-oxidase laccase	3631	-2,319	8,87E-86	3,20E-83
TRINITY_DN18241_c2_g1	Glycoside hydrolase	2148	-2,304	6,32E-15	8,65E-14
TRINITY_DN11094_c0_g3	3-keto sterol reductase	1567	-2,301	2,77E-06	1,14E-05
TRINITY_DN8875_c0_g1	Guanine nucleotide-binding subunit beta	1900	-2,285	0,020661	0,038345
TRINITY_DN18239_c0_g1	Retrotransposon poly	1502	-2,275	4,97E-09	3,12E-08
TRINITY_DN13698_c0_g1	Delta24(24(1))-sterol reductase	1876	-2,272	3,49E-05	0,000119
TRINITY_DN16469_c0_g1	Dihydrofolate reductase	1456	-2,266	1,09E-05	4,07E-05
TRINITY_DN2242_c0_g1	Adenosinetriphosphatase	4413	-2,254	5,68E-17	9,38E-16
TRINITY_DN16386_c0_g1	Gpi anchored	4078	-2,242	1,12E-158	1,86E-155
TRINITY_DN17723_c2_g1	Vacuolar sorting-associated VPS13	1169	-2,204	5,71E-05	0,000186

Tabela 1- Transcritos anotados e diferencialmente expressos em 12h-0h e 24h-12h

(continuação)

ID transcrito	Descrição/função putativa (Blast2go)	Tamanho (pb)	Log ₂ FC	PValue	FDR
TRINITY_DN12410_c0_g1	Beta glucosidase precursor	1610	-2,137	9,56E-07	4,32E-06
TRINITY_DN17941_c4_g1	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16	1559	-2,134	1,05E-12	1,09E-11
TRINITY_DN6353_c0_g1	Poly (gag pol) of Ty1 Copia retrotransposon	530	-2,179	0,000635	0,001705
TRINITY_DN13293_c0_g1	Pre-mRNA-splicing factor CLF1	2041	-2,151	0,002538	0,005932
TRINITY_DN20435_c0_g1	Pre-mRNA-splicing factor CLF1	728	-2,146	0,000193	0,000573
TRINITY_DN18261_c2_g2	Atypical PIKK FRAP kinase	1789	-2,133	9,89E-10	6,98E-09
TRINITY_DN16789_c1_g1	SPOSA6832_01157, partial	685	-2,131	0,004442	0,009806
TRINITY_DN10209_c0_g1	DNA polymerase delta subunit 1	919	-2,129	0,010164	0,020465
TRINITY_DN5860_c0_g1	NADH dehydrogenase subunit 4	2228	-2,125	0,003309	0,007516
TRINITY_DN16162_c0_g1	Zinc-binding alcohol dehydrogenase	481	-2,123	0,001192	0,003008
TRINITY_DN18204_c5_g1	Gag-pol poly	975	-2,113	0,000144	0,000434
TRINITY_DN18246_c3_g3	Retrovirus-related Pol poly from transposon TNT 1-94	2732	-2,111	2,68E-20	6,03E-19
TRINITY_DN10425_c0_g1	26S protease subunit rpt4	1357	-2,110	0,000775	0,002043
TRINITY_DN16233_c0_g1	Membrane bound O-acyl transferase	1943	-2,097	2,33E-07	1,15E-06
TRINITY_DN16091_c0_g2	Sterol 3beta-glucosyltransferase	1450	-2,096	0,002584	0,006023
TRINITY_DN8262_c0_g1	ATP-dependent DNA helicase pif1-like	794	-2,095	3,97E-11	3,38E-10
TRINITY_DN20609_c0_g1	Chitin synthase	316	-2,092	0,003707	0,00831
TRINITY_DN18339_c1_g1	Family 18 glycoside hydrolase	3346	-2,092	5,85E-26	1,90E-24
TRINITY_DN13158_c0_g1	Alpha beta-hydrolase	2350	-2,088	4,27E-07	2,03E-06
TRINITY_DN10569_c0_g1	Carboxypeptidase S1	1858	-2,083	8,38E-11	6,87E-10
TRINITY_DN17939_c1_g2	Carboxypeptidase KEX1 precursor	1923	-2,074	2,26E-05	7,99E-05
TRINITY_DN7798_c0_g1	AarF, partial	932	-2,073	6,34E-07	2,94E-06
TRINITY_DN14261_c0_g1	Related to allantoate permease	2235	-2,068	1,58E-10	1,24E-09
TRINITY_DN12360_c0_g2	Serine threonine phosphatase 2C	1972	-2,064	0,000822	0,002151
TRINITY_DN12852_c0_g1	Phosphoglycerate mutase family ,	2180	-2,061	6,99E-50	8,40E-48
TRINITY_DN10725_c0_g1	Tryptophanyl-tRNA synthetase	1810	-2,051	0,002494	0,005834
TRINITY_DN4067_c0_g2	Nucleolar GTP-binding 1	3182	-2,043	9,98E-12	9,15E-11
TRINITY_DN13575_c0_g1	Phosphomethylpyrimidine kinase	2396	-2,041	8,94E-08	4,69E-07
TRINITY_DN13637_c0_g2	Ribosomal L36	438	-2,040	0,008206	0,016934
TRINITY_DN14476_c1_g1	CDK-activating kinase assembly factor MAT1	2472	-2,040	9,73E-15	1,29E-13 9,75E-106
TRINITY_DN16143_c0_g1	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic	1894	-2,034	1,65E-108	106
TRINITY_DN17134_c1_g2	Ribosomal S18	1930	-2,026	3,31E-10	2,50E-09
TRINITY_DN16625_c1_g1	D-lactaldehyde dehydrogenase	2366	-2,022	3,24E-64	5,97E-62
TRINITY_DN17658_c1_g1	Acetyl- synthetase	4739	2,021	6,90E-50	8,40E-48
TRINITY_DN7646_c0_g1	Phosphatidylserine decarboxylase	1063	2,050	1,27E-94	5,87E-92
TRINITY_DN6524_c0_g1	26S proteasome	841	2,080	9,30E-13	9,70E-12
TRINITY_DN13700_c0_g1	Rust transferred	1273	2,169	5,00E-06	1,98E-05
TRINITY_DN16744_c0_g1	DNA-directed RNA polymerase III subunit C1	2145	2,174	1,52E-05	5,55E-05
TRINITY_DN17121_c2_g5	Retrotransposon , , Ty1-copia subclass	319	2,222	0,000381	0,00107
TRINITY_DN11602_c0_g1	Oligopeptide transporter	3187	2,233	8,69E-05	0,000274
TRINITY_DN17138_c0_g1	UDP-glucose 4-epimerase	1945	2,262	1,26E-74	2,99E-72
TRINITY_DN3846_c0_g1	Molecular chaperone	2102	2,441	1,90E-05	6,82E-05
TRINITY_DN17590_c0_g2	Homeobox cut like-	1166	2,581	0,000207	0,00061

Tabela 1- Transcritos anotados e diferencialmente expressos em 12h-0h e 24h-12h

ID transcrito	Descrição/função putativa (Blast2go)	Tamanho (pb)	Log ₂ FC	(conclusão)	
				PValue	FDR
TRINITY_DN10167_c0_g3	Retrovirus-related Pol poly from transposon TNT 1-94	3929	2,814	5,62E-06	2,20E-05
TRINITY_DN2615_c0_g1	Argininosuccinate lyase	1729	2,816	1,72E-05	6,20E-05
TRINITY_DN18071_c2_g2	Retrovirus-related Pol poly from transposon TNT 1-94, partial	4354	2,917	1,66E-62	2,80E-60
TRINITY_DN19841_c0_g1	Molecular chaperone	988	2,993	0,001326	0,00331
TRINITY_DN8175_c0_g1	Copia , partial	539	3,002	9,93E-12	9,11E-11
TRINITY_DN10964_c0_g1	S00954pol poly - fruit fly (Drosophila Melanogaster) transposon 1731	790	3,039	5,62E-17	9,30E-16
TRINITY_DN7269_c0_g2	Sterol 24-C-methyltransferase	1554	3,049	0,010446	0,020978
TRINITY_DN13313_c0_g2	Anthranilate para-aminobenzoate synthase component II	384	3,418	0,000623	0,001676
TRINITY_DN11277_c0_g2	Subtilisin protease	3540	3,631	9,67E-43	8,18E-41
TRINITY_DN15413_c0_g1	Copper zinc superoxide dismutase	1459	3,687	6,11E-32	2,77E-30
TRINITY_DN15737_c0_g1	Family 7 glycoside hydrolase	1919	3,972	2,94E-20	6,60E-19
TRINITY_DN7399_c0_g3	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavo 2	1013	4,340	0,000215	0,000634
TRINITY_DN7431_c1_g2	Membrane bound O-acyl transferase probable Identified by gene-trapping, Microarray-based expression analysis	854	4,690	0,003738	0,008375
TRINITY_DN12615_c0_g2		312	4,704	1,36E-05	5,00E-05
TRINITY_DN13846_c0_g1	Lipase, class 3	2489	4,865	3,50E-11	3,01E-10
TRINITY_DN16876_c0_g1	Histone H3	512	4,900	0,0002	0,000592

ANEXO C - Lista dos 12 transcritos diferencialmente expressos e anotados na comparação 24h-12h

Tabela 1- Transcritos anotados e diferencialmente expressos em 24h-12h

ID transcrito	Descrição/função putativa (Blast2go)	Tamanho (pb)	Log ₂ FC	PValue	FDR
TRINITY_DN7963_c0_g1	Secreted protein	919	-6,043	1,71E-06	4,26E-05
TRINITY_DN13313_c0_g1	Anthranilate para-aminobenzoate synthase component II	515	-4,982	0,000219	0,002638
TRINITY_DN4752_c0_g2	Molecular chaperone	1349	-3,107	0,000725	0,006972
TRINITY_DN14077_c0_g2	STE STE11 CDC15 kinase	592	-2,918	9,74E-06	0,000192
TRINITY_DN16636_c1_g1	Family 13 glycoside hydrolase	2637	-2,105	5,81E-06	0,000121
TRINITY_DN18372_c0_g1	Secreted protein	1317	-2,089	1,07E-05	0,000203
TRINITY_DN13293_c0_g1	Pre-mRNA-splicing factor CLF1	2041	2,100	0,003207	0,022659
TRINITY_DN7269_c0_g4	Sterol 24-C-methyltransferase	2073	2,192	1,49E-11	1,38E-09
TRINITY_DN17437_c0_g1	Pleiotropic drug resistance ABC transporter	2285	2,286	6,57E-05	0,000969
TRINITY_DN17742_c0_g1	Secreted protein	2800	2,867	2,66E-16	6,12E-14
TRINITY_DN16013_c0_g6	CCR4-NOT complex subunit CAF16	965	3,379	0,000928	0,008553
TRINITY_DN18952_c0_g1	Secreted	968	4,640	1,74E-48	7,20E-45

ANEXO D - Lista dos 100 metabólitos obtidos por GC-MS e Identificados

Tabela 1- Metabólitos presentes nos extratos clorofórmicos, de folhas de *E. grandis* e de azeite de oliva, identificados pela biblioteca GMD (*Golm Metabolome Database*).

(Continua)

GMD ID	Metabólito	Classe	IR Biblioteca	IR Amostra	Mass count	Score	KEGG
31	Glycolic acid	α-hidroxi ácido	1062,88	1064,65	3	706	C00160
47	Benzaldehyde	Benzenoide	1102,95	1101,97	6	691	C00261
54	Oxalic acid	Ácido carboxílico	1118,32	1115,76	7	654	not found
58	Valeric acid, 2-oxo-	Ácido carboxílico (ceto)	1131,57	1129,49	3	738	C06255
99	Succinic-acid_methylester	Ácido carboxílico (di) (éster)	1168,56	1169,83	4	958	not found
102	Succinic semialdehyde	Ácido graxo (acil)	1182,03	1182,03	3	798	C00232
106	3-Methyl-2-oxopentanoic-acid	Ácido carboxílico (ceto)	1172,22	1171,05	5	872	C00671
112	Leucine, cyclo-	Ácido carboxílico	1194,57	1196,04	3	755	not found
114	3-Methyl-2-oxopentanoic-acid	Ácido graxo (ceto)	1189,12	1189,27	13	672	C00671
138	1,3-Dihydroxyacetone	Carboidrato	1242,06	1243,68	3	978	C00184
176	Benzoic acid	Ácido benzoico	1251,31	1253,07	8	847	C00180
187	Glycerol	Carboidrato (Sugar acohol)	1262,29	1261,15	7	627	C00116
217	Threonine	Ácido graxo (acil)	1290,45	1288,17	10	660	C00188
244	Putrescine	Amina	1344,21	1346,65	13	605	C00134
247	2,5-Piperazinedione,3,6-dimethyl-	Diazinanes	1343,14	1345,21	5	759	not found
254	Succinic acid, 2,3-dimethyl-	Ácido carboxílico (di) (éster)	1356,96	1353,88	6	685	not found
259	similar to Lumichrome	Pteridina	1332,55	1334,73	3	781	C01727
263	Geraniol	Glicerolípídeos	1361,15	1363,84	4	770	not found
274	Thiazole, hydroxyethyl- 4-methyl-5-	Alcaloide	1375,95	1374,23	12	786	C04294
282	Nonanoic acid	Ácido graxo (acil)	1360,69	1364,06	9	917	C01601
291	Nicotine	Alcaloide	1369,30	1370,55	3	800	C00745
308	Threonine	Ácido graxo (acil)	1377,23	1374,04	3	885	C00188
318	Perillyl alcohol	Monoterpenoide	1405,51	1406,98	8	607	C02452
352	2,5-Diketopiperazine	<i>Diazinanes</i>	1424,08	1422,14	6	774	not found
370	Glycinamide	Amida	1433,85	1432,52	3	965	not found

Tabela 1- Metabólitos presentes nos extratos clorofórmicos, de folhas de *E. grandis* e de azeite de oliva, identificados pela biblioteca GMD (*Golm Metabolome Database*)

							(continuação)
GMD ID	Metabólito	Classe	IR Biblioteca	IR Amostra	Mass count	Score	KEGG
446	Glutamine [-H2O]	Ácido carboxílico	1469,31	1469,23	6	770	C00064
382	Acetamide, 2-phenyl-	Benzenoide	449,32	1450,26	7	665	not found
	Pentadecane, n-	Alcano	1500,00	1500,45	12	915	C08388
479	Sorbitol, 1,4:3,6-dianhydro-	Isosorbide	1504,91	1504,78	6	799	not found
483	3-Hydroxyundecan-4-one	Cetona	1504,44	1504,78	4	687	not found
523	Homoserine lactone, butanoyl-	Lactona	1532,89	1534,62	3	712	not found
524	Homoserine lactone, butanoyl-	Lactona	1536,50	1534,55	6	658	not found
566	Cis,cis-Muconic-acid	Ácido graxo (acil)	1551,57	1554,38	3	835	not found
618	Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid, trans-	Ácido carboxílico (di)	1605,55	1605,71	5	771	not found
620	3-Hydroxydodecan-4-one	Cetona	1601,76	1600,38	7	698	not found
661	Benzoic acid, 4-hydroxy-	Ácido benzoico	1633,29	1636,21	4	659	C00180
676	Acetamidopentanoic-acid	Ácido graxo (acil)	1634,91	1637,35	14	716	not found
695	Dodecanoic acid	Ácido graxo (acil)	1654,10	1656,14	6	867	not found
703	Trans-1,2-0-benzylidene-D-glycerol	Glicerolipídeos	1667,77	1666,95	9	808	not found
776	Benzaldehyde, 2,5-dihydroxy-	Benzenoide	1709,76	1710,76	3	921	not found
815	Tetradecanoic acid methyl ester	Ácido graxo (ester)	1729,57	1730,54	3	788	not found
852	Glutamine, N-gamma-ethyl-	Ácido carboxílico	1757,43	1756,33	10	697	C00064
884	Ribonic acid	Carboidratos	1750,73	1751,88	3	827	not found
927	Arabinonic acid	Carboidrato	1764,84	1765,16	4	789	not found
942	similar to Fructose Derivate	Carboidrato	1789,22	1790,79	4	982	not found
945	Octadecane, n-	Alcano	1799,99	1799,54	10	755	not found
954	Indole-3-acetaldehyde	Indole	1802,74	1801,26	10	731	C00637
1042	2-Hydroxytetradecanoic_acid	Ácido graxo (acil)	1837,32	1838,56	15	618	C06424
1062	Gulonic acid, 2-oxo-	Ácido carboxílico	1872,17	1871,92	3	880	not found
1069	Sorbose	Carboidrato	1852,53	1855,32	5	706	C00247
1102	Pyridoxal	Piridinas	1874,57	1872,84	5	868	C00250
1125	Indole-3-acetonitrile	Indol	1889,19	1889,27	4	943	C02938
1127	Hydantoin, 5-propionate-	Azolidina	1887,09	1887,68	4	600	C05565
1133	Chorismic-acid	Ácido carboxílico (di)	1880,97	1881,01	5	842	C00251
1178	Galactose	Carboidrato	1902,42	1903,65	4	702	C00124

Tabela 1- Metabólitos presentes nos extratos clorofórmicos, de folhas de *E. grandis* e de azeite de oliva, identificados pela biblioteca GMD (*Golm Metabolome Database*)

								(continuação)
GMD ID	Metabólito	Classe	IR Biblioteca	IR Amostra	Mass count	Score	KEGG	
1204	Arabinoheptulosonic acid enol, 3-deoxy-		1926,64	1926,57	6	712	not found	
1214	Hexadecanoic acid methyl ester	Ácido graxo (éster)	1928,52	1928,58	4	956	not found	
1244	Swainsonine	Alcaloide	1944,61	1942,58	8	851	C10173	
1248	Glucuronic acid	Carboidrato	1938,08	1939,82	3	778	C00191	
1259	Homoserine lactone, N-octanoyl-	Lactona	1957,34	1958,93	10	677	not found	
1330	Eicosane, n-	Alcano	2002,55	2000,18	11	861	not found	
1349	Hexadecenoic acid, n-	Cetona	2021,55	2023,66	9	924	not found	
1357	Phenoxyacetic acid, hydroxymethyl-3-methoxy-	4-Ácido fenoxiacético	2024,62	2024,30	18	609	not found	
1362	Hexadecenoic acid, 9-(Z)-	Ácido graxo (acil)	2029,67	2029,60	21	914	C08362	
1371	Chalcone methoxyamine	calcona (cetona aromática)	2028,58	2029,24	15	603	not found	
1447	Prephenic acid	Ácido carboxílico (ceto)	2066,59	2067,43	10	716	C03776	
1462	Octadecadienoic acid methyl ester, 9,12-(Z,Z)-, n-	Ácido graxo (éster)	2089,16	2088,72	15	609	not found	
1463	Heneicosane, n-	Alcano	2102,80	2101,51	4	926	not found	
1480	Octadecenoic acid methyl ester, 9-(E)-,n-	Ácido graxo (éster)	2102,34	2105,21	21	894	not found	
1516	Glucoheptose	Carboidrato	2139,92	2137,60	18	616	not found	
1558	Homoserine lactone, N-decanoyl-	N-Lactona	2170,45	2170,53	8	610	not found	
1607	Octadecenoic acid, 9-(E)-	Ácido graxo	2225,44	2224,37	20	832	not found	
1632	Glucoheptonic acid-1,4-lactone	Carboidrato	2114,69	2115,81	20	605	not found	
1643	Muramic acid, N-acetyl-	Carboidrato	2261,12	2262,11	5	729	C06470	
1660	Tetradecane-1,14-dioic acid	Ácido graxo (acil)	2282,49	2281,18	19	708	not found	
1672	Tricosane, n-	Alcano	2301,60	2301,80	16	814	C17433	
1689	Galacturonic acid-1-phosphate	Carboidrato	2376,58	2377,93	3	650	not found	
1692	Glucose-6-phosphate	Carboidrato	2307,34	2307,76	5	775	C00092	
1723	Alanine, N-(3-indolylacetyl)-	Indol	2371,97	2369,77	19	639	not found	
1745	Tetracosane, n-	Alcano	2400,50	2400,11	8	941	not found	
1749	Senecionine	Alcaloide	2406,06	2406,79	3	808	C06176	
1825	Tryptamine, N-acetyl-5-hydroxy-	Alcaloide	2504,72	2501,83	20	703	not found	

Tabela 1- Metabólitos presentes nos extratos clorofórmicos, de folhas de *E. grandis* e de azeite de oliva, identificados pela biblioteca GMD (*Golm Metabolome Database*)

GMD ID	Metabólito	Classe	IR Biblioteca	IR Amostra	Mass count	Score	(conclusão)
							KEGG
1894	Hexacosane, n-	Alcano	2605,36	2602,56	20	805	not found
1921	Docosanoic acid	Ácido graxo	2650,64	2652,18	3	841	C08281
1980	Zeatin, trans-	Imidazopirimidina	2423,17	2421,51	7	803	C16430
1839	Docosenoic acid methyl ester, 13-(Z)-	Ácido graxo (acil)	2527,45	2526,90	22	647	C08316
1982	Turanose	Carboidrato	2707,24	2707,61	20	681	C19636
2069	similar to Octadecanoic acid-2,3-dihydroxypropylester	Ácido graxo (éster)	2773,72	2774,43	9	792	C01530
2090	Octacosane, n-	Alcano	2800,02	2798,95	20	762	not found
2104	Squalene, all-trans-	Terpenoide (tri)	2824,66	2826,37	3	915	C00751
2146	Daidzein	Flavonoide (Iso)	2933,42	2932,71	6	617	C10208
2160	Hesperetin	Flavonoide	3031,71	3030,97	4	663	C01709
2202	Morin	Flavonoide	2922,82	2924,13	13	623	C10105
2205	Deoxyuridine	Nucleosídeo pirimídico	2912,96	2912,25	6	733	C00526
2277	Hexacosanoic acid	Ácido graxo (acil)	3036,31	3038,31	21	869	C00249
2285	Acacetin	Flavonoide	3055,54	3056,09	4	713	C01470
2297	Adenosine-5-monophosphate	Nucleotídeos purínicos	3051,07	3050,31	3	889	not found
2368	Quinic acid, 5-caffeoyl-, trans-	Fenilpropanoide	3177,08	3174,00	5	636	C00852
2383	Nonacosanoic acid	Ácido graxo	3332,18	3331,47	5	669	C16535