

CARLA CRISTINA GONÇALVES ROSADO

**EXPRESSÃO GÊNICA DA RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS DE *Eucalyptus grandis* À INFECÇÃO POR *Puccinia psidii***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

R788e  
2013

Rosado, Carla Cristina Gonçalves, 1984-  
Expressão gênica da resposta de defesa de plantas de  
*Eucalyptus grandis* à infecção por *Puccinia psidii* / Carla  
Cristina Gonçalves Rosado. – Viçosa, MG, 2013.  
viii, 38f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.34-38.

1. Ferrugem-do-eucalipto. 2. Expressão gênica. 3. Plantas -  
Resistência a doenças e pragas. 4. Eucalipto - Doenças e pragas.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento. II. Título.

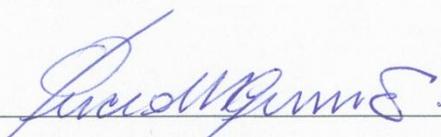
CDD 22 ed. 632.3

CARLA CRISTINA GONÇALVES ROSADO

**EXPRESSÃO GÊNICA DA RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS DE *Eucalyptus grandis* À INFECÇÃO POR *Puccinia psidii***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

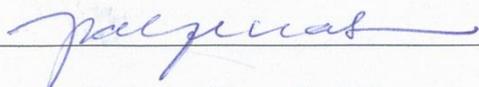
APROVADA: 12 de abril de 2013



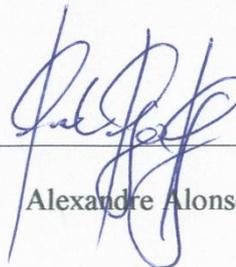
Lúcio Mauro da Silva Guimarães  
(Coorientador)



Cosme Damião Cruz



Poliane Alfenas Zerbini



Alexandre Alonso Alves



Acelino Couto Alfenas  
(Orientador)

Aos meus pais,

Paulo Afonso da Silva Rosado

Maria Elizabete Gonçalves Rosado

Aos meus irmãos,

Carlos Antônio Gonçalves Rosado

Paulo Henrique Gonçalves Rosado

**Ofereço.**

Ao meu esposo

Marcos Gomide de Andrade

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por iluminar sempre o meu caminho.

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo aporte de recursos empregados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Acelino Couto Alfenas, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelos conselhos, ensinamentos, pela compreensão em momentos difíceis, pelas críticas e sugestões, além do apoio durante a realização deste trabalho.

À Suzano Papel e Celulose pela concessão dos clones e à Clonar Resistência a Doenças Florestas pela produção das mudas e condução das plantas empregadas.

Ao Dr. Matias Kirst pela coorientação, pelas críticas e sugestões a este trabalho e pela disposição em me ajudar sempre que foi necessário durante o período em que estive em Gainesville, Florida.

Ao Dr. Lúcio Mauro Silva Guimarães pela coorientação, pela amizade e pelas inúmeras revisões e críticas a este trabalho.

À Dra. Poliane Alfenas Zerbini pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Ao Professor e conselheiro Cosme Damião Cruz pelo exemplo como pessoa e profissional, pelo apoio incondicional no meu desenvolvimento acadêmico.

À Dra. Tatiana Rosado, pela amizade, pelos conselhos, pelas críticas e sugestões na realização a este trabalho.

Ao Dr. Alexandre Alonso Alves, pelos conselhos, pelas críticas e sugestões na realização a este trabalho.

Ao Professor Fabyano Fonseca e aos doutorandos Otávio Brustolini e Talles Maciel pela ajuda nas análises de dados dos microarranjos.

À Márcia Brandão pela amizade, pelo carinho e por ter sido sempre tão eficiente.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno – BIOAGRO/UFV pela agradável convivência, em especial Nicolle Campos, Camila Freitas, Daniele Arriel, Natália Risso, Denise Valdetaro, Blanca Betancourth, Mara Cândido e Regiane Pereira.

Aos colegas da Universidade da Flórida, por terem me apoiado e muito me ensinado durante o período em que estive em Gainesville, Florida, em especial a Márcio Resende Jr., Leandro Gomide, Kelly Mayrink, Cíntia Ribeiro, Annette Fahrenkrog, Juan José e Chris Dervinis.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFV.

Aos meus avós, tios, padrinhos e queridos primos, pelo carinho, orações e torcida.

Aos meus pais Paulo Afonso e Maria Elizabete e meus irmãos Carlos Antônio e Paulo Henrique, pela amizade, compreensão, pelo estímulo e por tantas outras coisas inumeráveis.

Aos meus sobrinhos Alexandre Sayegh Arreguy Rosado, Elisa Sayegh Arreguy Rosado, Luiza Gomide de Andrade Azevedo e meu afilhado Miguel Gomide de Andrade, que mesmo tão pequenos me proporcionam momentos de muita alegria.

Às minhas cunhadas, Cristiana Barbosa e Paloma Sayegh Arreguy Rosado, pela amizade.

Ao meu esposo e grande amor, Marcos Gomide de Andrade, por tudo que vivemos juntos, pela nossa cumplicidade, pelo amor incondicional e por sempre acreditar em mim.

Aos meus amigos, que graças a Deus são muitos, que de alguma maneira contribuíram para a realização desta conquista. Em especial à Wellington Gomes, Gilson da Silva e Cássia Soares, por sempre torcerem por mim e me apoiarem nas minhas decisões e à Flaviana Reis Milagres, companheira de longos anos.

## **BIOGRAFIA**

Carla Cristina Gonçalves Rosado filha de Paulo Afonso da Silva Rosado e Maria Elizabete Gonçalves Rosado nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 05 de maio de 1984.

Iniciou o ensino fundamental em 1990 na Escola Estadual Effie Rolfs, onde concluiu o ensino fundamental no ano de 1998 e também o ensino médio em 2001.

Em maio de 2002, ingressou no curso de Engenharia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), no qual foi bolsista de iniciação científica, sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas. Graduou-se em 16 de março de 2007, obtendo o título de Engenheira Florestal.

Em seguida, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Professor Acelino Couto Alfenas, concluindo-o em 17 de fevereiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa (UFV), com período sanduíche na Universidade da Flórida, EUA, submetendo-se à defesa de tese em 12 de abril de 2013.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1	O GÊNERO <i>EUCALYPTUS</i> .....	3
2.2	IMPORTÂNCIA DO <i>EUCALYPTUS</i> NO BRASIL .....	4
2.3	A FERRUGEM DO EUCALIPTO .....	6
2.4	INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO .....	7
2.5	GENÔMICA FUNCIONAL E A TÉCNICA DE MICROARRANJO .....	10
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
3.1	MATERIAL VEGETAL .....	12
3.2	GENOTIPAGEM DAS PLANTAS .....	12
3.3	ISOLADO DE PUCCINIA PSIDII .....	13
3.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	13
3.5	INOCULAÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS FOLIARES .....	14
3.6	LIOFILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL .....	15
3.7	LÂMINAS DE MICROARRANJO .....	15
3.8	MARCAÇÃO DAS SONDAS DE cDNA COM FLUORÓCROMOS Cy3 E Cy5 .....	16
3.9	HIBRIDIZAÇÃO EM LÂMINAS DE VIDRO .....	16
3.10	PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS .....	17
3.11	ANÁLISE DOS DADOS .....	17
4.	RESULTADOS .....	19
4.1	GENOTIPAGEM DAS PLANTAS .....	19
4.2	INOCULAÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS FOLIARES .....	19
4.3	EXTRAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL .....	21
4.4	MARCAÇÃO DAS SONDAS DE cDNA COM FLUORÓCROMOS Cy3 E Cy5 .....	21
4.5	PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS .....	22
4.6	ANÁLISE DOS DADOS - IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS .....	22
5.	DISCUSSÃO .....	27
6.	CONCLUSÕES .....	33
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

## RESUMO

ROSADO, Carla Cristina Gonçalves. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Expressão gênica da resposta de defesa de plantas de *Eucalyptus grandis* à infecção por *Puccinia psidii*.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Lúcio Mauro da Silva Guimarães e Matias Kirst.

Nos últimos anos, tem havido grande expansão das plantações de eucalipto para suprir a crescente demanda mundial de matéria-prima para as indústrias de base florestal. Paralelamente à expansão das áreas plantadas, tem aumentado concomitantemente a incidência e severidade de doenças na cultura. Dentre essas a ferrugem, causada por *Puccinia psidii*, destaca-se como uma das mais frequentes e com maior potencial de perdas. A melhor alternativa de controle da doença é o plantio de genótipos resistentes, mas pouco se sabe sobre a base genética da resistência. Este trabalho objetivou obter informações a cerca da arquitetura genética da resposta de defesa de plantas de eucalipto à ferrugem a fim de embasar a obtenção de genótipos resistentes e minimizar riscos de perdas pela doença. Foram utilizadas mudas de dois clones, G21 e G33, resistente e suscetível à ferrugem, respectivamente. A identidade das mudas de cada clone foi confirmada por meio de marcadores microssatélites. O experimento foi em delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) no esquema de Parcelas Sub-divididas, contendo os clones R e S inoculados e não inoculados. Utilizou-se o isolado monopustular UFV-2 de *P. psidii*, pertencente à raça 1. Foram coletados três ramos apicais (~6 folhas) nos tempos 0 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h e 48 h após inoculação. Para cada um dos seis tempos foram inoculadas oito plantas de cada genótipo. Seis lâminas de microarranjo foram produzidas somando um total de 48 câmaras. Em cada câmara foram representados 46.274 genes. Os cRNA foram marcados com os fluoróchromos Cy3 e Cy5. O RNA extraído e a incorporação dos fluoróchromos apresentaram-se de boa qualidade. Foram encontrados 43 genes diferencialmente expressos com razão G21/G33 de *foldchange* maiores que 1,5 e **probabilidade corrigida maior que 0,01. Dentre esses, 22 foram induzidos e 21 foram reprimidos.** Ambos os clones possuem genes relacionados diretamente com resposta a estresses bióticos e abióticos, sendo que o clone G21 possui genes com domínio LRR, proteína MLO, sulfotransferase 2A, U3 ubiquitina capazes de intermediar o reconhecimento da infecção de *P. psidii* e ativar eficientemente os mecanismos que restringem a colonização do patógeno nos tecidos da planta. Os resultados obtidos servem para direcionar futuras investigações sobre o patossistema *Eucalyptus-Puccinia* e auxiliar na identificação de alvos para o controle da doença em nível de campo.

## ABSTRACT

ROSADO, Carla Cristina Gonçalves. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2013. **Gene expression of defense response of *Eucalyptus grandis* to infection by *Puccinia psidii*.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-advisors: Lúcio Mauro da Silva Guimarães e Matias Kirst.

In recent years, there has been great expansion in eucalyptus plantations to meet the growing world demand for raw material for forest-based industries. Concurrently, the expansion of planted areas has concomitantly increased the incidence and severity of diseases in plantations. Among these, eucalyptus rust, caused by *Puccinia psidii*, is one of the most frequent and has the greatest potential losses. The best option for disease control is planting of resistant genotypes, but little is known about the genetic basis of resistance. This work aimed to obtain information about the genetic architecture of the defense response of eucalyptus plants to eucalyptus rust in order to obtain resistant genotypes and minimize the risk of loss to disease. Utilized were rooted cuttings of two clones, G21 and G33, one resistant and the other susceptible to eucalyptus rust, respectively. The identity of the cuttings of each clone was confirmed by microsatellite markers. The experiment was in completely randomized design (CRD) in the Split-Plots layout, containing inoculated and not inoculated cuttings of both clones. The single pustule isolate UFV-2 (race 1) of *P. psidii* was used. Three apical branches (~6) were collected at 0 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, and 48 h after inoculations. For each of the six times eight plants from each genotype were inoculated. Six microarray slides were produced for a total of 48 chambers. In each chamber 46.274 genes were represented. The cRNA was marked with the fluorochromes Cy3 and Cy5. The RNA extracted and the incorporation of the fluorochromes showed themselves to be of good quality. Forty three genes differentially expressed with the ratio G21/G33 of foldchange greater than 1.5 and corrected probability greater than 0.01 were found. Of these, 22 were up-regulated and 21 were down-regulated. Both clones possessed genes directly related to biotic and abiotic stress response, whereas G21 possesses genes called LRR, protein MLO, sulfotransferase 2A, U3 ubiquitin able to intermediate the recognition of the *P. psidii* infection and efficiently activate the mechanisms that restrict the colonization of the pathogen in the plant material. The results obtained serve to direct future investigations about the pathosystem *Eucalyptus-Puccinia* and aid in the identification of targets for the control of the disease in the field.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o líder mundial em áreas plantadas e em produtividade de eucalipto no mundo, ocupando cerca de 4,9 milhões de hectares (ABRAF, 2012). O gênero *Eucalyptus* possui vantagens quando comparado a outras essências florestais como o rápido crescimento, alta capacidade de rebrota após a colheita, grande incremento de matéria seca, alta capacidade de produção de celulose, cobertura de solo para áreas inclinadas, produção de óleos essenciais e ainda conta com um eficiente modo de propagação clonal (SBS, 2009).

As espécies de eucalipto possuem capacidade de adaptação às diferentes condições edafo-climáticas e ampla variabilidade genética. No entanto, as condições climáticas das principais regiões eucaliptocultoras no Brasil são também altamente favoráveis à ocorrência de doenças. Dentre essas, a ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii* Winter, constitui, atualmente, uma das mais importantes doenças da eucaliptocultura mundial (Coutinho et al., 1998; Glen et al., 2007; Alfenas et al., 2009; Booth e Jovanovic, 2012). A doença incide em mudas no viveiro e em plantas jovens no campo (até dois anos de idade) e em brotações após o corte raso. O patógeno ocorre, preferencialmente, em folhas jovens e terminais de galhos, causando deformações dos órgãos, perda de dominância apical, redução de crescimento e, eventualmente, a morte da planta (Ferreira, 1983 e Alfenas et al., 2009).

Uma vez que o melhoramento do eucalipto é um processo realizado em longo prazo, algumas estratégias têm sido propostas para acelerar a obtenção de plantas resistentes à ferrugem. Para embasar tais metodologias é fundamental se conhecer as bases genéticas da resistência assim como a arquitetura genética das respostas de defesa. Neste sentido em um trabalho pioneiro, Junghans et al., (2003) verificaram que parte da variação fenotípica da resposta de defesa à ferrugem em várias famílias de *E. grandis* é controlada por um gene dominante com penetrância incompleta e/ou expressividade variável dependendo do *background* genético (genes de efeito secundário e modificadores). Utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), esses mesmos autores mapearam este gene de efeito principal para resistência à ferrugem, denominado *Ppr1* (*Puccinia psidii* resistance gene 1) em uma família de irmãos completos de *E. grandis*. O locus *Ppr1* foi posicionado no mapa de referência genética de *Eucalyptus* sobre o grupo de ligação 3 (GL) e validado em duas progênes não relacionadas, confirmando a hipótese que *Ppr1* controla grande parte da variação da resistência à ferrugem (Mamani et

al., 2010 e Rosado, 2010). Recentemente, Alves et al. (2011) confirmaram a existência de um QTL de efeito maior no GL3.

As técnicas biotecnológicas de genômica, transcriptômica, proteômica e bioinformática apresentam um grande potencial no setor florestal e estão revolucionando o conhecimento científico e o desenvolvimento econômico nesta área. Acredita-se que esta interação entre essas áreas do conhecimento permitirá a descoberta de novos genes, surgimento de novas perspectivas sobre a estrutura e função de genes e proteínas e a formulação de novas hipóteses sobre o funcionamento de respostas multigênicas complexas (Grattapaglia et al., 2009 e Grattapaglia et al., 2012).

Métodos globais para análises de expressão gênica como SAGE (“*Serial Analysis of Gene Expression*” ou Análise em Série de Expressão Gênica), microarranjos (de cDNA e de oligonucleotídeos) e RNAseq (seqüenciamento do RNA) representam um avanço significativo no entendimento das bases moleculares envolvidas nas respostas do mecanismo de defesa das plantas a patógenos. Em geral, essas técnicas comparam padrões de expressão entre plantas resistentes e suscetíveis, ou plantas inoculadas com distintos patógenos e permitem determinar elementos potencialmente envolvidos na resistência a um dado patógeno ou que fazem parte de uma rota específica de defesa (Lau et al., 2007).

Nesse contexto, a análise de microarranjos (*microarrays*) tem sido utilizada para a identificação de genes diferencialmente expressos em interações planta-patógeno, genes co-regulados, sistemas regulatórios associados às respostas de defesa e para revelar interações entre diferentes rotas de sinalização (Schulze e Downward, 2001). Além disso, a técnica permite monitorar quantitativamente a dinâmica (natureza, tempo e intensidade) da regulação gênica e definir em quais momentos e tecidos ou locais da célula esses genes são importantes (cinética temporal e espacial) (Kagnoff e Eckmann, 2001 ; Kazan et al., 2001 ; Schenk et al., 2008).

Apesar de ser possível monitorar a expressão de milhares de genes simultaneamente em diferentes tempos da resposta de defesa de plantas a patógenos, até o presente, poucos estudos têm sido realizados para o patossistema *Eucalyptus-Puccinia psidii*. Neste contexto, é importante a identificação de genes potencialmente envolvidos nesse patossistema. Assim, este trabalho visou obter informações a cerca da arquitetura genética das respostas de defesa à ferrugem pela análise da expressão gênica de plantas de eucalipto resistentes e suscetíveis a *P. psidii* por meio da análise de microarranjos. Estas informações servem para direcionar futuras investigações sobre o patossistema citado e auxiliar na identificação de alvos para o controle da doença em nível de campo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* L'Herit pertence à família *Myrtaceae*, sendo composto por mais de 700 espécies. São descritos dentro do gênero *Eucalyptus* 10 subgêneros, sendo o principal o *Symphomyrtus*, com mais de 470 espécies, dentre as quais estão as mais plantadas para fins comerciais *E. grandis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. calmadulensis*, *E. saligna* e *E. tereticornis* (Eldridge et al., 1994; Brooker, 2000 ; Poke et al., 2005; Grattapaglia et al., 2012). O *Eucalyptus* é endêmico da Austrália, com a exceção de *E. deglupta*, *E. orophila*, *E. urophylla* e *E. wetarensis* que são naturais da Indonésia, Filipinas e Papua Nova Guiné (Grattapaglia et al., 2012). Ele adaptou-se muito bem à imensa diversidade de hábitat resultantes das grandes diferenças climáticas desse continente (Grattapaglia et al., 2012). Assim, este gênero apresenta grande diferenciação e ampla variabilidade genética, o que fornece a base para programas de melhoramento de espécies adaptadas a um amplo espectro de ambientes, inclusive no Brasil. Árvores de eucalipto são hermafroditas e protândricas, apresentando fecundação, preferencialmente, alógama podendo ainda se reproduzir por autofecundação, embora haja forte depressão por endogamia (Williams e Woinarski, 1997). O eucalipto é diplóide com o genoma variando entre 600 e 700 milhões de pares de bases, distribuídos em 22 cromossomos ( $2n=2x=22$ ) (Grattapaglia et al., 2012).

Espécies de *Eucalyptus* são reconhecidas pelo seu rápido crescimento, boa qualidade de madeira, grande adaptabilidade aos mais diversos climas e solos e facilidade de manejo por plantio direto e rebrota (Eldridge et al., 1994; Potts, 2004). A partir do século 18, diversas espécies do gênero *Eucalyptus* foram introduzidas em países como Índia, França, Chile, Brasil, África do Sul e Portugal onde apresentaram boa adaptação climática, sucesso reprodutivo e índices produtivos elevados (Potts, 2004). Na década de 1960, com os desenvolvimentos de métodos industriais de processamento das fibras curtas do eucalipto, as plantações de espécies do gênero começaram a apresentar importância comercial crescente e os programas de melhoramento tiveram início em países como Estados Unidos (*E. grandis*) e Portugal (*E. globulus*) (Eldridge et al., 1994). Em 1970 iniciaram as plantações clonais no Congo e no Brasil com destaque para a espécie *E. urophylla* principalmente em função da maior facilidade de propagação vegetativa desta espécie. A partir de 1980 populações base de melhoramento foram formadas, envolvendo

principalmente as espécies *E. grandis*, *E. tereticornis* e *E. viminalis* (Eldridge et al., 1994). No começo da década de 1990, o Brasil já era o país com maior acervo genético de *Eucalyptus* spp, atrás somente da Austrália e Indonésia (Ferreira, 1992). Isto evidencia o interesse pelos recursos naturais oferecidos por este gênero por parte das Indústrias de Celulose e Siderúrgica, o que envolve esforços no planejamento de programas de melhoramento permitindo obter com a maior eficácia produtos derivados da madeira para abastecer a grande demanda nacional. Atualmente o eucalipto é plantado em mais de 90 países onde são utilizados para diversos produtos florestais tais como madeira sólida, postes, energia, celulose, carvão vegetal, óleos essenciais e tanino bem como para sombra em parques e jardins (Grattapaglia et al., 2012).

## **2.2 Importância do Eucalyptus no Brasil.**

As florestas plantadas possuem importância comercial, social e ambiental, despertando interesse quanto à produção de madeira, uma vez que representam importante fonte de biomassa capaz de atender a demanda e a necessidade global de recursos renováveis, bem como produção de celulose.

Em 2011, a área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* e *Pinus* no Brasil totalizou 6.5 milhões de ha, sendo 74,8% correspondente à área de plantios de *Eucalyptus*, ou seja, 4.873.952 ha, representando crescimento de 2,5% (119.617 ha) frente ao indicador de 2010. O principal fator que alavancou esse crescimento foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda futura dos projetos industriais do segmento de Papel e Celulose (ABRAF, 2012).

Os plantios de eucalipto estão espalhadas pelo território nacional, principalmente, nos estados de Minas Gerais (28,8%), São Paulo (21,2%), da Bahia (12,5%), do Mato Grosso do Sul (9,8%), Rio Grande do Sul (5,7%), Espírito Santo (4,1%) e Paraná (3,9%) (ABRAF, 2012). O uso múltiplo de sua madeira como carvão vegetal, madeira serrada, energia, celulose e papel tem estimulado não somente o desenvolvimento da cultura no país, mas também do setor florestal como um todo (SBS, 2009). O segmento de papel e celulose concentra 71,2% da área plantada, seguido pelos segmentos de siderurgia a carvão vegetal (18,4%), painéis de madeira industrializada (6,8%) e produtores independentes (3,6%) (ABRAF, 2012).

No período 2005-2011, o crescimento acumulado da área plantada foi de 27,9%, ou seja, 3,0% ao ano. A expansão dos plantios florestais em 2011, pode ser considerada modesta, quando comparada com o período 2005-2009 (4,5% ao ano ou 19,2% no período) (ABRAF, 2012). Este amplo crescimento da área plantada com este gênero é consequência da necessidade de suprir a demanda de madeira para produção de celulose e carvão vegetal para indústria siderúrgica, além de outros derivados da madeira, para móveis e construção, papelão, óleos e outros (Mora e Garcia, 2000). A utilização de florestas plantadas permite diminuir, em grande medida, a pressão sobre as espécies autóctones em procura de madeira, contribuindo assim diretamente na conservação ambiental e de espécies nativas. Isto, em conjunto com a necessidade de abastecer tanto ao mercado interno como ao externo, têm sido apontados como os fatores principais que levaram à busca de espécies de rápido crescimento e ao desenvolvimento de tecnologias apropriadas para responder às inquietudes das indústrias. O papel central das florestas plantadas na economia de base florestal é reconhecido mundialmente (Mora e Garcia, 2000).

Para a economia brasileira e para a sociedade em geral, o setor florestal contribui com uma parcela importante da geração de produtos, tributos, divisas, empregos e renda. Estima-se que a contribuição tributária do setor florestal foi de R\$ 7,6 bilhões em 2011, representando 0,51% do total arrecadado no país. Em 2011, o Valor Bruto da Produção Floresta (VBPF) estimado para o setor de florestas plantadas correspondeu a R\$ 53,9 bilhões. O segmento de celulose e papel destacou-se como o setor que mais contribuiu para o VBPF nacional com 57,1%. No mercado internacional, o país é o líder entre os produtores de celulose que comercializam o produto no mercado (BRACELPA, 2011). As exportações brasileiras atingiram o montante de US\$ 7,97 bilhões (3,1% do total das exportações do Brasil), um crescimento de 5,2% em relação a 2010. O saldo da balança comercial florestal totalizou US\$ 5,73 bilhões, representando 19,2% do saldo global do país (ABRAF, 2012).

O setor de florestas gera 4,7 milhões de empregos, incluindo empregos diretos, indiretos e resultantes do efeito-renda, gerando 600.000 novos postos de trabalho nos últimos cinco anos, o que manifesta a importância deste mercado como suporte na criação de fontes de emprego no Brasil (ABRAF, 2012).

Produtividades florestais crescentes e refinamentos na qualidade dos produtos de madeira por meio de melhoramento genético tornar-se-ão cada vez mais estratégicos para a indústria florestal, independentemente do uso final da madeira ser para energia, fibra,

celulose ou produtos estruturais de madeira sólida. Os programas de melhoramento genético e de silvicultura clonal foram os responsáveis pela obtenção de ganhos significativos em produção e de qualidade da madeira (Golle et al., 2009). Ferramentas moleculares baseadas na identificação de polimorfismos no DNA, envolvidos no controle genético de fenótipos de interesse, prometem fornecer novas oportunidades para a seleção de características de crescimento, adaptabilidade a novas condições climáticas e propriedades da madeira de árvores cultivadas (Grattapaglia et al., 2009).

### 2.3 *A ferrugem do eucalipto*

O eucalipto era considerado livre de doenças de grande importância até meados dos anos 1970. Entretanto, o avanço das áreas plantadas, a utilização de espécies ou clones em grandes áreas de plantio sem o conhecimento prévio da resistência a doenças e a mudança das técnicas de manejo da cultura criaram condições favoráveis à ocorrência de doenças. Dentre elas, a ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter é uma das enfermidades mais limitantes no estabelecimento de novos plantios e da condução de brotações para o eucalipto no Brasil e pode causar infecções tanto em condições de viveiro quanto em campo (Ferreira, 1989; Alfenas et al., 2009)

O primeiro relato de ferrugem em eucalipto no país foi em 1944, incidindo em mudas de *Corymbia citriodora* no estado do Rio de Janeiro (Joffily, 1944). Após esta primeira descrição, a doença permaneceu sem destaque por um longo período de tempo, até que em 1973 cerca de 400 mil mudas de *E. grandis* (procedência da África do Sul) foram descartadas em consequência da doença no Espírito Santo (Ferreira, 1983). Além do eucalipto, *P. psidii* já foi relatado em mais de 129 espécies de plantas, todas pertencentes à família *Myrtaceae* (Carnegie e Lidbetter, 2012). O fungo está amplamente distribuído na América do Sul e Central, nas ilhas do Caribe (Glen et al., 2007), e encontra-se em ampla dispersão mundial, já tendo sido registrado nos estados da Florida, Califórnia e Havaí nos EUA (Mellano, 2006; Uchida et al., 2006), no Japão (Kawanishi et al., 2009), na China (Zhuang e Wei 2011) e na Austrália (Carnegie e Lidbetter, 2012), onde a doença foi primeiramente atribuída a *Uredo rangeli* (Carnegie et al., 2010).

*Puccinia psidii*, sob condições de ambiente favorável, infecta órgãos tenros da parte aérea de mudas em viveiro e plantas jovens no campo até o estágio fenológico B (Ferreira, 1983), cerca de 2 m de altura, podendo causar redução de crescimento e perda de dominância apical, além da morte de brotações após o corte raso, bem como a morte e o

refugio de mudas para plantio. Em genótipos altamente suscetíveis pode causar ainda deformações, necroses, hipertrofia, minicrâncos e morte das porções terminais de crescimento (Alfenas et al., 2009).

A estratégia mais eficiente e econômica para o controle da doença é o uso de genótipos resistentes. Essa estratégia se torna mais relevante para espécies florestais nas quais é inviável utilizar técnicas como a rotação de cultura e onde a aplicação de fungicidas deve ser evitada, embora já exista pelo menos um produto registrado para a cultura do eucalipto a base de tebuconazol + trifloxistrobina (AGROFIT, 2013). Como o melhoramento de eucalipto é um processo de longo prazo, diversas estratégias têm sido propostas para acelerar a obtenção de plantas resistentes à ferrugem. Para embasar tais metodologias é fundamental se conhecer as bases genéticas da resistência assim como a arquitetura genética das respostas de defesa (Lau et al., 2007; Alfenas et al., 2009).

Neste sentido, um trabalho pioneiro, Junghans et al., (2003) verificaram que parte da variação fenotípica da resposta de defesa à ferrugem em várias famílias de *E. grandis* é controlada por um gene dominante com penetrância incompleta e, ou expressividade variável dependendo do *background* genético. Utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*), esses mesmos autores mapearam este gene de efeito principal para resistência à ferrugem, denominado *Ppr1* (*Puccinia psidii resistance gene 1*) em uma família de irmãos completos de *E. grandis*. Posteriormente, o locus *Ppr1* foi posicionado no mapa de referência genética de *Eucalyptus* sobre o grupo de ligação 3 (GL) e validado em duas progênes não relacionadas, confirmando a hipótese que *Ppr1* controla grande parte da variação da resistência à ferrugem (Mamani et al., 2010; Rosado et al., 2010). Recentemente, Alves et al. (2011) confirmaram a existência de um QTL de efeito maior no GL3, corroborando o trabalho de Mamani et al. (2010).

#### **2.4 Interação planta-patógeno**

As interações entre a planta e seus patógenos envolvem uma comunicação de duas vias. Não só a planta deve ser capaz de reconhecer e defender-se contra um potencial agente patogênico, mas este deve também ser capaz de manipular e suplantar os mecanismos de defesa da planta para criar um ambiente adequado para o seu crescimento e reprodução. Para que essa comunicação ocorra, um conjunto de genes coevoluiu nas plantas e patógenos (Boyd et al., 2013; Monahan et al., 2012).

Resistência e suscetibilidade das plantas dependem de uma complexa troca de sinais e mecanismos elaborados, desenvolvidos durante a co-evolução patógeno-hospedeiro. Estes mecanismos determinam o estabelecimento da compatibilidade (suscetibilidade) ou incompatibilidade (resistência) durante a interação (Kazan et al., 2001). As interações incompatíveis são caracterizadas pelo desenvolvimento de uma HR e pelo não desenvolvimento da doença (Zurbriggen et al., 2010). Nas interações compatíveis, a HR não ocorre e o patógeno pode desenvolver-se sem restrições, induzindo o desenvolvimento da doença (Mehdy, 1994).

A resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e, ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (Schenk et al., 2000). A diferença fundamental entre plantas resistentes e suscetíveis consiste no reconhecimento do patógeno invasor e na ativação rápida e eficaz dos mecanismos de defesa do hospedeiro, que é iniciado pelo reconhecimento de moléculas elicitoras do patógeno (Dangl e Jones, 2001). A resistência pós-penetração à ferrugem do eucalipto está associada ao desencadeamento da resposta de hipersensibilidade (HR - *Hypersensitive response*), caracterizada por necrose celular no sítio de penetração do patógeno (Xavier et al., 2001). Postula-se que *Ppr1*, a exemplo do que ocorre com outros genes de resistência, codifica para uma proteína que reconheça direta ou indiretamente o patógeno e desencadeia o processo de defesa.

A indução das respostas de defesa nas plantas é ativada após a detecção do patógeno, com uma subsequente transmissão de sinais e eventos celulares sincronizados, cujo objetivo é eliminá-lo e impedir seu estabelecimento. Esta ativação da sinalização das vias de defesa não é linear, ao contrário, forma redes complexas onde ocorre comunicação cruzada (Thatcher et al., 2005). Segundo Jones e Dangl (2006) a ativação das respostas de defesa das plantas operam em dois níveis. A primeira linha de ativação da defesa da planta envolve o reconhecimento dos padrões moleculares associados à patógenos), PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns), que desencadeiam respostas de defesa da planta gerais referidos como PTI (*PAMP Triggered Immunity*). Em contrapartida, o agente patogênico é capaz de suprimir os diferentes componentes da PTI por proteínas efetoras entregues na planta. A segunda linha de envolve o reconhecimento de efetores específicos conhecidos como proteínas de avirulência por meio de genes de resistência (R) da planta, provocando uma resposta de resistência específica e sistemática conhecida como Imunidade Disparada por Efetores (*ETI-Effector-triggered immunity*). Este reconhecimento R / Avr-gene foi denominado *Resistência gene a gene* de Flor (Flor,

1942), mecanismo muito importante para patógenos biotróficos, que está associado a ativação da sinalização de SA-dependente (Ácido Salicílico dependente) e SAR (*Systemic Acquired Resistance*- Resistência sistêmica adquirida) (Glazebrook, 2005).

A interação dos elicitores do patógeno com os receptores do hospedeiro ativa uma cascata de transdução de sinal que resulta em respostas locais e sistêmicas. Tanto os elicitores primários, quanto sinais endógenos secundários do patógeno podem desencadear uma gama diversificada de genes relacionados a defesa da planta que codificam para proteínas da parede celular, enzimas hidrolíticas, peroxidases, proteínas relacionadas a patogênese (proteínas PR) e biossíntese de fitoalexinas (Dangl e Jones, 2001). A cascata de transdução de sinal inicia-se com uma explosão oxidativa, que é uma resposta da planta à presença do patógeno. Esta resposta produzirá diversos compostos denominados espécies reativas de oxigênio ou também chamadas de ROS - *Reactive Oxygen Species* (Resende et al., 2003). Após essa explosão oxidativa a célula sofre fluxos iônicos, síntese de óxido nítrico, uma reprogramação transcricional, síntese de quinases, fosfatases e fatores de transcrição (Dangl e Jones, 2001). Após a reprogramação metabólica na célula ocorre a síntese de ácido salicílico e etileno, o fortalecimento da parede celular, síntese de componentes antimicrobianos e por último a resposta hipersensível. A reação de hipersensibilidade (HR) em plantas é definida como a morte de células do hospedeiro, no local ou ao redor do ponto de infecção, após poucas horas do contato com o patógeno, envolvendo o aumento da expressão de genes de defesa (genes PR) e morte celular programada, destinado a restringir o desenvolvimento do microorganismo (Zurbriggen et al., 2010).

Diversos genes de resistência (R) foram clonados e caracterizados. A localização celular e a estrutura das proteínas codificadas por esses genes indicam que essas proteínas atuam no reconhecimento do patógeno e na sinalização celular, ligando-se diretamente à proteína de avirulência ou monitorando ações do patógeno, que resulta na ativação de repostas de defesa. Entre esses domínios presentes nessas proteínas estão: quinases, repetições ricas em leucina (*leucine rich repeats* – LRR), sítios para ligação de nucleotídeos trifosfatados (*nucleotide binding site* – NBS), zíperes de leucina, sequência *coiled-coil* (CC) e domínios similares à proteína Toll (Bent, 1996 ; Dangl e Jones, 2001; Martin et al., 2003, Sharma et al., 2011). Os LRRs possuem um papel importante para a especificidade de reconhecimento e estes domínios estão presentes na maioria das proteínas R (Monahan et al., 2012)

A identificação de genes de hospedeiros envolvidos em resposta de defesa torna-se um importante passo para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. A seleção diferencial e análise de expressão gênica global produzida a partir de mRNAs isolados de plantas inoculadas com o patógeno ou tratadas com indutores de resistência, tem sido utilizada para identificar genes relacionados à defesa em muitas interações hospedeiro-patógeno (Schenk et al., 2000; Schulze e Downward, 2001; Kazan et al., 2001).

### **2.5 Genômica funcional e a técnica de microarranjo**

Diante da importância econômica mundial da cultura de eucalipto, a expansão das áreas afetadas pela ferrugem e o alto risco que esta representa para países com climas tropicais e sub-tropicais (Coutinho et al., 1998; Booth e Jovanovic, 2012), torna necessária uma avaliação aprofundada das bases genéticas da ferrugem no eucalipto. A genômica funcional apresenta uma série de ferramentas que permitem uma avaliação mais apurada de como se comportam os tecidos das plantas resistentes frente a esta doença. Neste contexto, a disponibilidade do sequenciamento completo dos genomas de forma rápida e eficiente permitiu o entendimento da interação existente entre genótipo e fenótipo (Kagnoff e Eckmann, 2001), e trouxe a possibilidade de reconhecer os genes relacionados às doenças, bem como o estudo da interação genética planta-patógeno (Schulze e Downward, 2001).

A informação das sequências gênicas codificantes apresenta a possibilidade de identificação e mensuração, em paralelo e em larga escala, o nível de expressão dos mRNAs, em diferentes condições e organismos, para a caracterização da expressão gênica. Essa caracterização é um passo lógico para o entendimento da função biológica de um determinado gene. O desenvolvimento da metodologia de SAGE (*serial analysis of gene expression*) e microarranjos permitiram que este passo fosse concretizado, numa perspectiva de análise ampla (Schena et al., 1995).

A técnica de microarranjo de DNA, desenvolvida por Schena et al. (1995), permite avaliar simultaneamente o nível de expressão de milhares de genes em um único ensaio de hibridização, sendo um veículo simples para explorar o genoma de forma sistemática e abrangente. O princípio básico da técnica consiste na complementaridade altamente específica e sensível de uma solução de moléculas marcadas de ácido nucleico, ou seja, a capacidade de um DNA/RNA se hibridizar especificamente a uma fita de DNA segundo sua sequência de nucleotídeos (Schena et al., 1995). Os microarranjos são desenvolvidos,

inicialmente, a partir da seleção das sondas específicas de nucleotídeos e posterior distribuição ordenada das sondas selecionadas em cima de uma lâmina, por meio de um sistema automatizado eficiente. Uma técnica utilizada para a fabricação de lâminas deste tipo usa uma metodologia similar à das impressoras de jato de tinta, onde quatro cartuchos contendo as quatro bases nucleotídicas (adenina, citosina, guanina e tirosina) são carregados em uma cabeça de impressão que injeta cada base necessária em áreas específicas da lâmina à medida que a cabeça de impressão se move ao longo da mesma. O processo todo é repetido até que todos os fragmentos de interesse são construídos base por base (*Agilent Technologies*). A expressão gênica global é comparada a partir da marcação das amostras de cDNA marcado com fluoróforos distintos (ex: *Cyanine-3* (Cy3) e *Cyanine-5* (Cy5), provenientes de duas condições experimentais (resistente e suscetível ou controle e tratamento) e então misturadas em quantidades equimolares e submetidas à hibridação com os biochips. Após a lavagem, estas lâminas são submetidas à leitura em um scanner óptico, onde são excitados em diferentes comprimentos de onda e as imagens de fluorescência após a hibridização são geradas para cada fluoróforo independentemente (Rosa et al., 2007). Softwares que quantificam as intensidades de emissão de luz em cada amostra, transformando-as em um montante de dados estatísticos os quais devem ser integrados e avaliados de forma organizada para a análise da expressão gênica global, e para isso são utilizados pacotes de programas computacionais especializados, adaptados ao tratamento de quantidades maciças de dados.

O desenvolvimento dessa tecnologia representou um novo e poderoso conjunto de ferramentas que possibilitou o entendimento de sistemas biológicos e organismos de maneira ampla, uma vez que permitiu a quantificação do nível de expressão de milhares de genes simultaneamente, de uma maneira compreensível e sistemática, vinculando o teste de hipóteses a resultados observados (Kazan et al., 2001 ).

Entre suas aplicações, o microarranjo tem sido empregado no estudo da expressão e regulação de genes, no estudo da comparação de genomas e na detecção de microrganismo no ambiente, inferindo a diversidade microbiana daquele ambiente ou diagnosticando doenças em plantas (Schulze e Downward, 2001). Em interações planta-patógeno, essa técnica tem sido usada em patossistemas que incluem fungos, nematóides, bactérias e vírus (Schenk et al., 2000; Schulze e Downward, 2001; Kazan et al., 2001 ; Schenk et al., 2008).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 *Material vegetal*

Foram utilizados dois clones de *Eucalyptus grandis*, G21 e G33, previamente classificados como resistente (Junghans et al., 2003) e suscetível (Edival A.V. Zauza, informação pessoal, 2011) à ferrugem do eucalipto, respectivamente. Quarenta e oito mudas de cada clone com 90 dias de idade foram transplantadas para vasos de 2 L de capacidade, com substrato MecPlant<sup>®</sup> enriquecido com 1,3Kg de fosfato super simples e 600 g de Osmocote<sup>®</sup> (19N-6P-10K) para cada 100 Kg de substrato. No momento do transplante as mudas foram tratadas com 100 mL de uma solução de MAP<sup>®</sup> e após foram mantidas em condição de casa de vegetação até o momento da inoculação.

#### 3.2 *Genotipagem das plantas*

Para confirmar a identidade das mudas dos clones G21 e G33, foi realizada a genotipagem de todas as réplicas clonais antes do experimento e análise da expressão gênica. Para isso, cerca de 50 mg de folhas de cada clone foram coletadas e utilizadas para extração de DNA genômico total conforme protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com as seguintes modificações na preparação do tampão de extração: acréscimo de PVP (2%) e  $\beta$ -mercaptoetanol (0,4%). O DNA extraído foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro Smart Spec<sup>™</sup> 3000 (BioRad) e ajustado para 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . As reações de microssatélites (SSRs) foram realizadas em placas de PCR, sendo o volume total da reação de 15  $\mu\text{L}$ , contendo: 3  $\mu\text{L}$  de tampão 5X GoTaq<sup>®</sup> (Promega), 0,75  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1,2  $\mu\text{L}$  dNTPs (2,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo), 1,5  $\mu\text{L}$  de *primer* (forward e reverse) (10  $\mu\text{M}$   $\mu\text{L}^{-1}$ ), 0,15  $\mu\text{L}$  de GoTaq<sup>®</sup> DNA polimerase (Promega), 2  $\mu\text{L}$  de DNA molde e as seguintes condições de amplificação: desnaturação a 94 °C por 5 min, seguidos de 40 ciclos com uma etapa de desnaturação (94 °C por 1 min), uma de anelamento do *primer* (57°C por 1 min) e uma de extensão (72°C por 1 min), finalizando com uma etapa única de extensão final a 72 °C por 7 min. Foram utilizados os *primers* (EMBRA8, EMBRA10, EMBRA20, EMBRA27 e EMBRA28) de microssatélites de eucalipto desenvolvidos por Brondani et al. (2006).

A separação dos fragmentos amplificados foi realizada por eletroforese vertical em gel nativo de poliacrilamida a 10% (p/v) com acrilamida/bis-acrilamida na proporção de

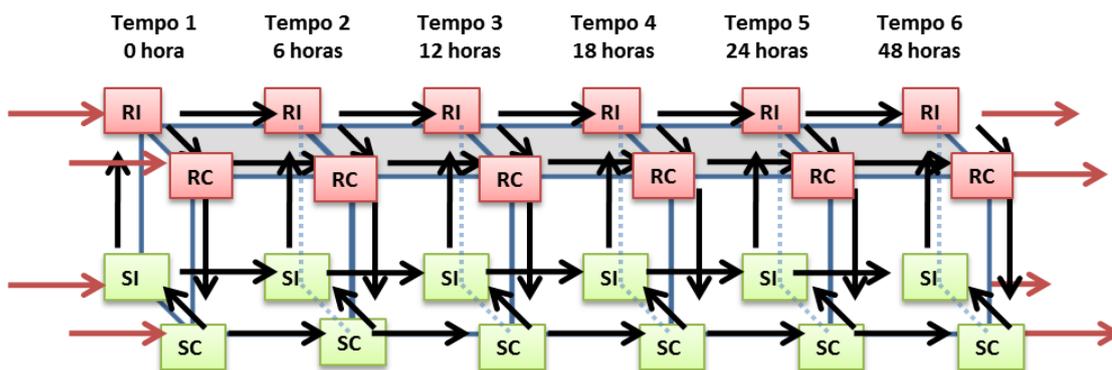
29:1. Foram utilizadas cubas verticais (BioRad), onde as amostras nos géis foram submetidas a um campo elétrico com voltagem constante de 110 Volts. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  e fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de captura de imagem L-PIX<sup>®</sup> (Loccus Biotecnologia).

### **3.3 *Isolado de Puccinia psidii***

Utilizou-se o isolado monopustular UFV-2 de *P. psidii*, pertencente à raça 1 e predominante nas diferentes regiões do Brasil (Junghans et al., 2003). O isolado foi mantido em mudas de jambeiro (*Syzygium jambos*), mediante reinoculações periódicas a cada 20 dias e também em ultrafreezer (-80°C).

### **3.4 *Planejamento experimental***

O perfil de transcrição do genoma completo foi desenvolvido segundo o planejamento experimental do tipo gaiola (*cage*) conforme esquema ilustrado na Figura 1. Cada seta representa um experimento de microarranjo onde a origem representa que a amostra foi marcada com Cy5 e a extremidade de chegada representa que a amostra foi marcada com Cy3, contemplando todas as amostras. Para cada um dos seis tempos foram inoculadas oito plantas de cada genótipo (resistente – Clone G21 e suscetível – Clone G33), sendo que quatro plantas foram inoculadas com *P. psidii* (I) e as outras quatro inoculadas com água e tween (N), totalizando 48 plantas por genótipo.



**Figura 1.** Planejamento experimental do tipo gaiola (*Cage*) para o perfil de expressão do genoma completo. As setas representam uma lâmina de microarranjo onde as extremidades de origem e de chegada das setas representam marcação da amostra com Cy5 e Cy3, respectivamente. RI – Clone G21 (*Eucalyptus grandis*) resistente à ferrugem inoculado; RC - resistente controle (sem inoculação); SI Clone G33 (*E. grandis*) suscetível inoculado e SC - suscetível controle (sem inoculação).

### 3.5 Inoculação e coleta de amostras foliares

A inoculação de *P. psidii* foi realizada conforme descrito por Xavier et al. (2001). A suspensão de inóculo foi previamente ajustada para concentração de  $2 \times 10^5$  urediniosporos  $\text{mL}^{-1}$ , acrescida de Tween 80 (0,05%), com ajuda de um microscópio óptico e uma câmara de Neubauer. A inoculação foi realizada mediante o uso de uma pistola de baixa pressão, acionado por um compressor elétrico modelo Chiaperini® Ar Direto G3. O inóculo foi atomizado em ambas as faces das folhas mais novas e nas gemas dos terminais de ramos situados no terço médio superior de cada muda. Após a inoculação, as plantas foram mantidas no escuro, em câmara de nevoeiro, a  $25 \pm 2$  °C. Depois de 24 h de incubação, elas foram transferidas para casa-de-vegetação, na mesma faixa de temperatura e mantidas até o aparecimento dos sintomas da doença no clone suscetível G33. As avaliações foram realizadas aos 20 dias após a inoculação apenas como controle experimental seguindo a escala de notas descrita por Junghans et al., 2003b. Para garantir a uniformidade na inoculação e validar a viabilidade do inóculo, duas plantas de *Syzygium jambos* foram utilizadas como controle de suscetibilidade.

Para análise da expressão gênica foram selecionados os três ramos apicais contendo o primeiro, segundo e terceiro par de folhas, totalizando 6 folhas. As amostras foram coletadas nos tempos, determinados a partir dos experimentos realizados por Xavier et al. (2001): 0 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h e 48 h após inoculação. As amostras foliares foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ . As etapas de inoculação, avaliação e coleta foram realizadas nas dependências da empresa Clonar Resistência a Doenças Florestais.

### **3.6 *Liofilização das amostras e extração do RNA total***

As amostras coletadas foram liofilizadas no Chamber Thermo Savant por 72 h e armazenadas em microtubos de 2 mL tipo *Eppendorf*. Para a extração do RNA total de cada amostra empregou-se o tampão de extração CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio) (Chang et al., 1993).

Para experimentos de análise de expressão gênica é importante que o RNA esteja livre de impurezas e contaminantes, como moléculas de DNA e compostos protéicos. Portanto, após a extração, as amostras foram tratadas com *Rnase-free* Dnase (Promega) e purificadas utilizando o Kit *RNeasy® Mini* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA extraído e a sua quantificação foi realizada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e análise em gel de agarose (1%). A qualidade de algumas amostras, tomadas aleatoriamente, foi verificada pela tecnologia *Agilent Bionalyser 2100* (*Agilent Technologies*), que realiza eletroforese capilar de alta tensão utilizando as amostras de RNA e a integridade das amostras foi avaliada com o software *2100 Expert* (Agilent).

### **3.7 *Lâminas de microarranjo***

Um total de seis lâminas de microarranjo foram produzidas pela empresa Agilent com configuração 8x60k, somando um total de 48 câmaras. As lâminas foram confeccionadas utilizando o programa *eArray* (Agilent) com base na anotação versão 1.1 do genoma sequenciado de *E. grandis*. Em cada câmara foram representados todos os genes com sequências disponíveis, totalizando 46.274 genes, distribuídos em 384 linhas x 164 colunas. As informações das sequências dos genes estão disponíveis no site <http://www.phytozome.net/eucalyptus.php>.

### 3.8 *Marcação das sondas de cDNA com fluoróchromos Cy3 e Cy5*

Para cada uma das 96 amostras 200ng de RNA total foram convertidas a cDNA e marcadas utilizando o kit *Two-Color Quick Amp Labeling* (Agilent) tomando-se como base as instruções do fabricante. Todos os passos do processo de marcação das sondas, bem como, o controle da qualidade das amostras foram desenvolvidos exatamente como descrito no protocolo do Kit (*Agilent Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol*) (Version 6.6, setembro de 2012). Após marcação das sondas, as amostras foram submetidas à purificação para a eliminar os *CyDye* não incorporados, utilizando-se o *Kit RNeasy® Mini* (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Após a purificação do cDNA marcado, realizou-se o monitoramento da incorporação dos fluoróchromos através da leitura em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000). Para determinar o rendimento de cRNA e atividade específica (pmol/µg cRNA) do fluoróchromo em cada amostra foi utilizada a seguinte expressão:

$$\text{Rendimento em } \mu\text{g de cRNA} = \frac{(\text{Concentração do cRNA}) \times 30\mu\text{L (volume de eluição)}}{1000}$$

$$\text{Atividade Específica em pmol/}\mu\text{g cRNA} = \frac{(\text{Concentração de Cy3 ou Cy5})}{(\text{Concentração do cRNA})}$$

### 3.9 *Hibridização em lâminas de vidro*

Para a hibridização foram misturados 300ng de cada amostra de cRNA marcado com fluoróchromos (Cy3 ou Cy5). Os pares de amostras a serem hibridizados juntos foram definidos seguindo o planejamento experimental do tipo gaiola conforme descrito no item 3.4 e esquematizado na Figura 1. Após a hibridização, as lâminas foram escaneadas utilizando *SureScan Microarray* (Agilent). O programa *Feature Extraction* (Agilent) foi utilizado para a extração dos dados, normalização do efeito do corante, quantificação e correção de *background*. As etapas de hibridização, escaneamento e extração dos dados foram executadas pela empresa ICBR (*Interdisciplinary Center for Biotechnology Research*) na Universidade da Flórida.

### 3.10 *Pré-processamento dos dados*

Os dados brutos de intensidade de sinal de todas as hibridizações foram normalizados a fim de tornar os dados das lâminas comparáveis, reduzir artefatos experimentais introduzidas pela técnica e distinguir melhor as diferenças biológicas. Foi utilizado o método de normalização intra-lâmina denominado quantil (*Quantile-normalized*) (Bolstad et al., 2003), disponível no pacote *preprocessCore* do programa R (R Development Core Team 2010).

### 3.11 *Análise dos dados*

Duas análises de dados foram realizadas. A primeira contempla todas as combinações entre genótipo, inoculação e tempo seguindo um modelo estatístico. A pertinência do resultado obtido por esta análise depende diretamente da ativação eficiente dos mecanismos de defesa da planta por meio de inoculação controlada. A segunda análise compara, de forma independente, as combinações desejadas, sendo assim, não depende diretamente dos resultado da inoculação, uma vez que é possível selecionar quais tratamentos testar.

O modelo foi ajustado aos dados de *log2 fold change* de forma independente para cada um dos 46.274 genes dispostos no *array*. Para tanto, foi utilizado o *Proc Mixed* do SAS<sup>®</sup> 9.3, de forma que os parâmetros do modelo foram estimados por meio do método da Máxima Verossimilhança. O modelo descrito abaixo representa um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) no esquema de Parcelas Sub-divididas (*Split-plot*) com fatorial (genótipo x inoculação) na parcela. O modelo em questão é dado por:

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + I_j + GI_{ij} + \varepsilon_{ijk} + T_l + TG_{il} + TI_{jl} + TGI_{ijl} + \varepsilon_{ijkl}$$

em que:

$y_{ijkl}$ : *log2 fold change*;

$\mu$ : média da população;

$G_i$ : efeito do genótipo  $i$  ( $i=1,2$ );

$I_j$ : efeito da inoculação  $j$  ( $j=1,2$ );

$GI_{ij}$ : efeito da interação genótipo  $i$  e inoculação  $j$ ;

$\varepsilon_{ijk}$ : erro A, erro de parcela ( $k=1,\dots,4$ );

$T_l$ : efeito do tempo  $l$  ( $l=1,2,\dots,6$ );

$TG_{il}$ : efeito da interação entre o tempo  $l$  e genótipo  $i$ ;

$TI_{jl}$ : efeito da interação tempo  $l$  e inoculação  $j$ ;

$TGI_{ijl}$ : efeito da interação tempo  $l$ , genótipo  $i$  e inoculação  $j$ ;

$\varepsilon_{ijkl}$ : erro B, erro de subparcela;

Após o ajuste do modelo, os níveis de significância para cada um dos parâmetros (efeitos dos fatores e de suas interações), em cada teste, foram corrigidos pelo procedimento FDR (*False-discovery rate*) a fim de garantir o nível global de significância assumido nos testes de hipótese (F - ANOVA). Para tanto, os *p-values* foram extraídos da análise no *Proc Mixed* por meio do comando ODS e então exportados para o software R no qual a função *q-value* (Q-VALUE 1.0) foi utilizada para obter os *p-values* corrigidos.

A segunda análise dos dados foi realizada no ambiente estatístico R (R Development Core Team 2010), com o auxílio dos pacotes *Limma* do projeto *Bioconductor* (Smyth, 2005). O método estatístico de Bayesiana Empírica (B-test) foi utilizado para a detecção dos genes diferencialmente expressos (Smyth, 2005) e para controlar a taxa de falsos positivos utilizou-se o critério FDR (0.01). Foram considerados como diferencialmente expressos aqueles genes cuja razão do valor de *Fold change* (G21/G33) foi igual ou maior que 1.5 vezes e *p-value* corrigido menor que 0,01. Os genes diferencialmente expressos foram classificados em induzidos (*up-regulated*) (+) ou suprimidos (*down-regulated*) (-).

Após detectar os genes diferencialmente expressos, as sequências foram submetidas ao BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) por meio da ferramenta BLAST2GO no programa *CLCGenomicsWorkbench*.

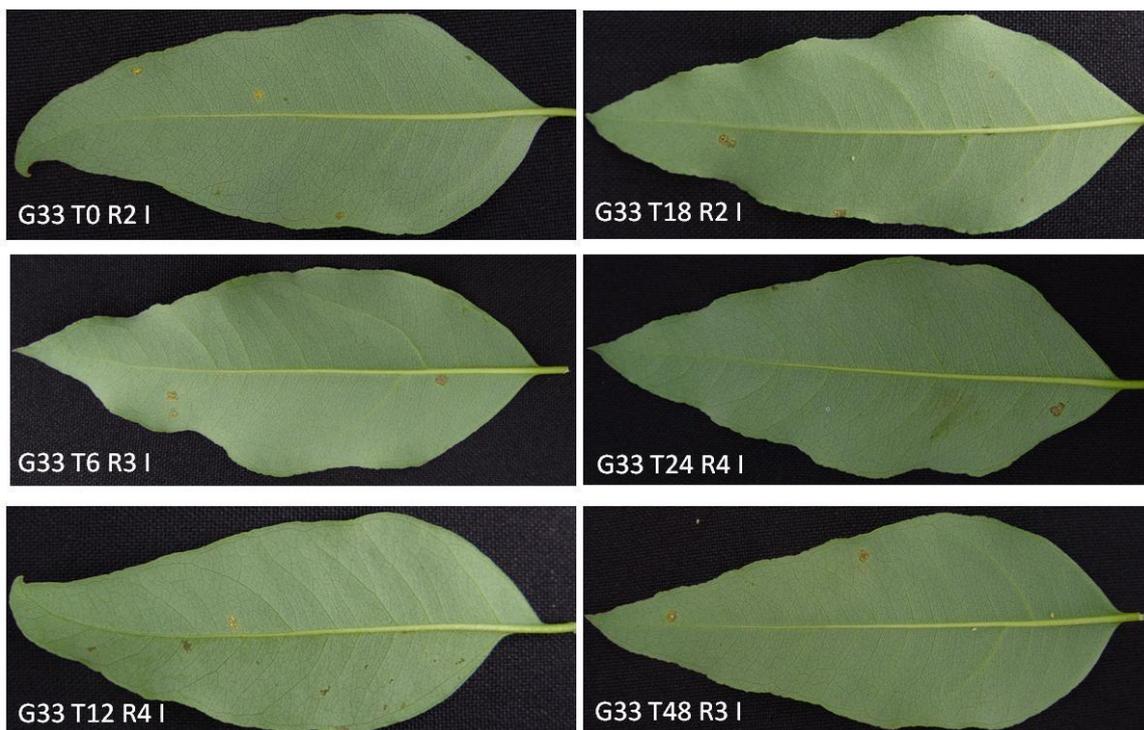
## 4. RESULTADOS

### 4.1 *Genotipagem das plantas*

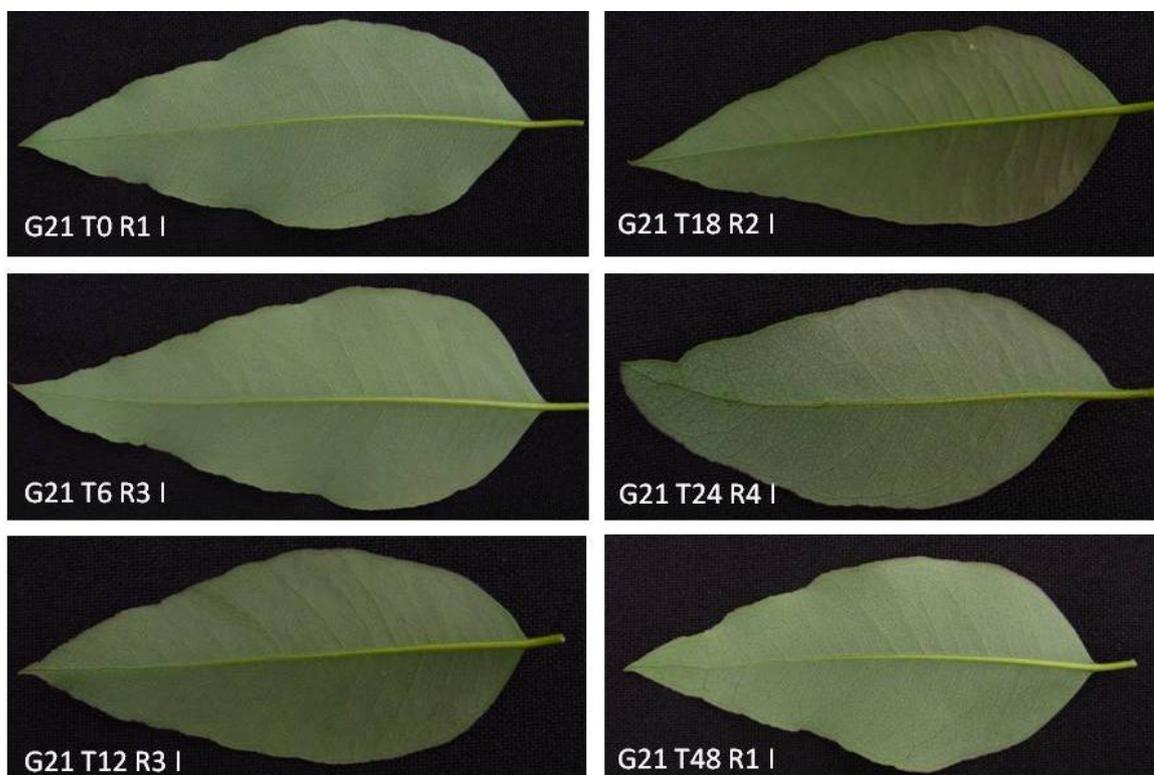
Pela análise do tamanho dos fragmentos de DNA em géis de poliacrilamida, gerados com marcadores SSR verificou-se que todas as mudas do clone G21 possuem o mesmo genótipo (dados não mostrados). O mesmo também ocorreu com o clone G33 (dados não mostrados). A partir da confirmação da identidade das mudas oriundas de réplicas clonais, foi possível conduzir o experimento com maior confiabilidade de ausência de misturas.

### 4.2 *Inoculação e coleta de amostras foliares*

As plantas foram inoculadas e coletadas em cada um dos tempos em estudo, 0, 6, 12, 18, 24 e 48 horas. Após a coleta das folhas, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 20 dias para avaliação de severidade e verificou-se que para o genótipo G33 previamente classificado como suscetível, a inoculação não foi eficiente ocasionando o aparecimento de poucas pústulas puntiformes (Figura 2). Nas plantas do genótipo resistente G21 foi possível confirmar a ausência de sintomas (Figura 3). As plantas de *Syzygium jambos* também apresentaram poucos sintomas da doença, característica pouco comum quando se inocula essa espécie.



**Figura 2.** Presença de poucas pústulas puntiforme de *Puccinia psidii* em diferentes tempos do genótipo suscetível G33 inoculado (I) aos 20 dias após a inoculação. Os tempos 0, 6, 12, 18, 24 e 48 horas estão representados pelo código T0, T6, T12, T18, T24 e T48, respectivamente. A letras R seguidas de números referem-se às repetições.



**Figura 3.** Ausência de esporulação de *Puccinia psidii* em diferentes tempos do genótipo resistente G21 inoculado (I) aos 20 dias após a inoculação. Os tempos 0, 6, 12, 18, 24 e 48 horas estão representados pelo código T0, T6, T12, T18, T24 e T48, respectivamente. A letras R seguida de números referem-se às repetições.

#### **4.3 *Extração e confirmação da integridade do RNA total***

Todas as amostras do RNA quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop tiveram uma razão de absorbância próxima a 2, o que é esperado e indica pouca contaminação com proteínas. Além disso, todas as amostras extraídas também apresentaram concentração e razão de absorbância 260/280 satisfatório indicando que o método de CTAB para extração de RNA total foi eficaz para obtenção de RNA de alta qualidade e livre de proteínas. A avaliação de qualidade do RNA em gel de agarose também evidenciou baixa degradação, ou seja boa qualidade das amostras uma vez que foi detectada uma razão 2:1 iguais ou maior que 2 (dados não mostrados).

A qualidade verificada pela tecnologia *Agilent Bionalyser* indicou que as amostras apresentaram boa qualidade podendo assim prosseguir com a marcação e hibridização para microarranjo.

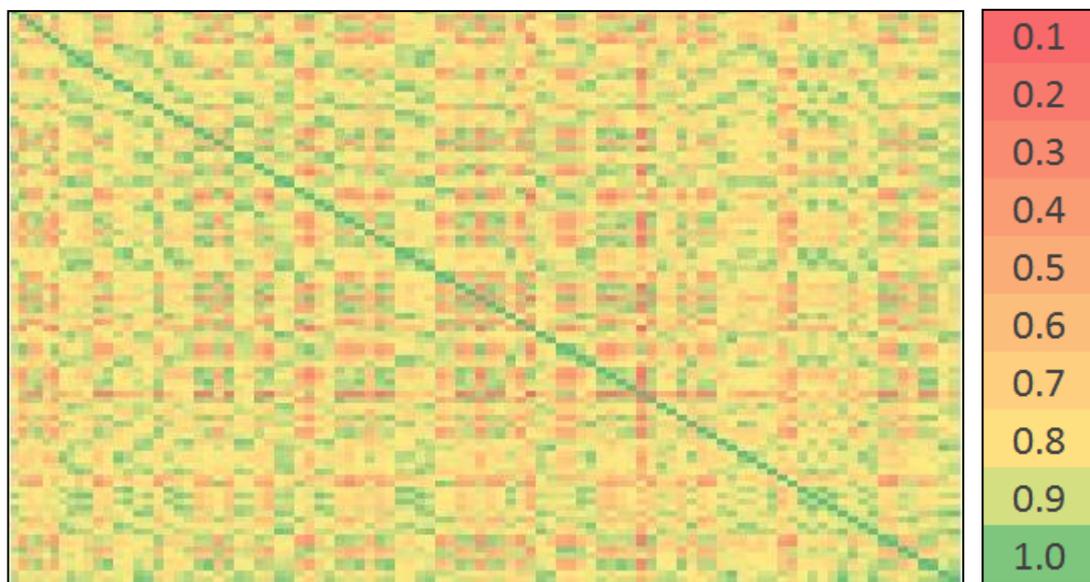
#### **4.4 *Marcação das sondas de cDNA com fluoróchromos Cy3 e Cy5***

Após a amplificação e marcação das amostras foi feito o monitoramento de incorporação dos fluoróchromos através da leitura em espectrofotômetro. Neste trabalho todas as amostras apresentaram os requisitos exigidos. O monitoramento de incorporação dos fluoróchromos através da leitura em espectrofotômetro ficou de acordo com a recomendação do fabricante, ou seja, o rendimento verificado foi maior que 0.825 µg, valores variando de 1.28 e 8.38 µg e atividade específica maior que 6 pmol/µg cRNA com valores variando de 9.94 e 37.71 pmol/µg.

#### 4.5 Pré-processamento dos dados

O programa *Feature Extraction (Agilent)* utilizado neste trabalho mostrou-se eficiente para extrair dos valores de intensidade de cada *spot*, normalizar do efeito do corante e quantificar e corrigir o *background*, pois o mesmo possui fatores de correção específicos para as lâminas Agilent.

Os dados brutos foram analisados para obter uma visão geral da qualidade, distribuição dos dados e correlação entre as amostras (Figura 4). Após essa primeira avaliação os dados foram normalizados e transformados pela função  $\log_2$ .



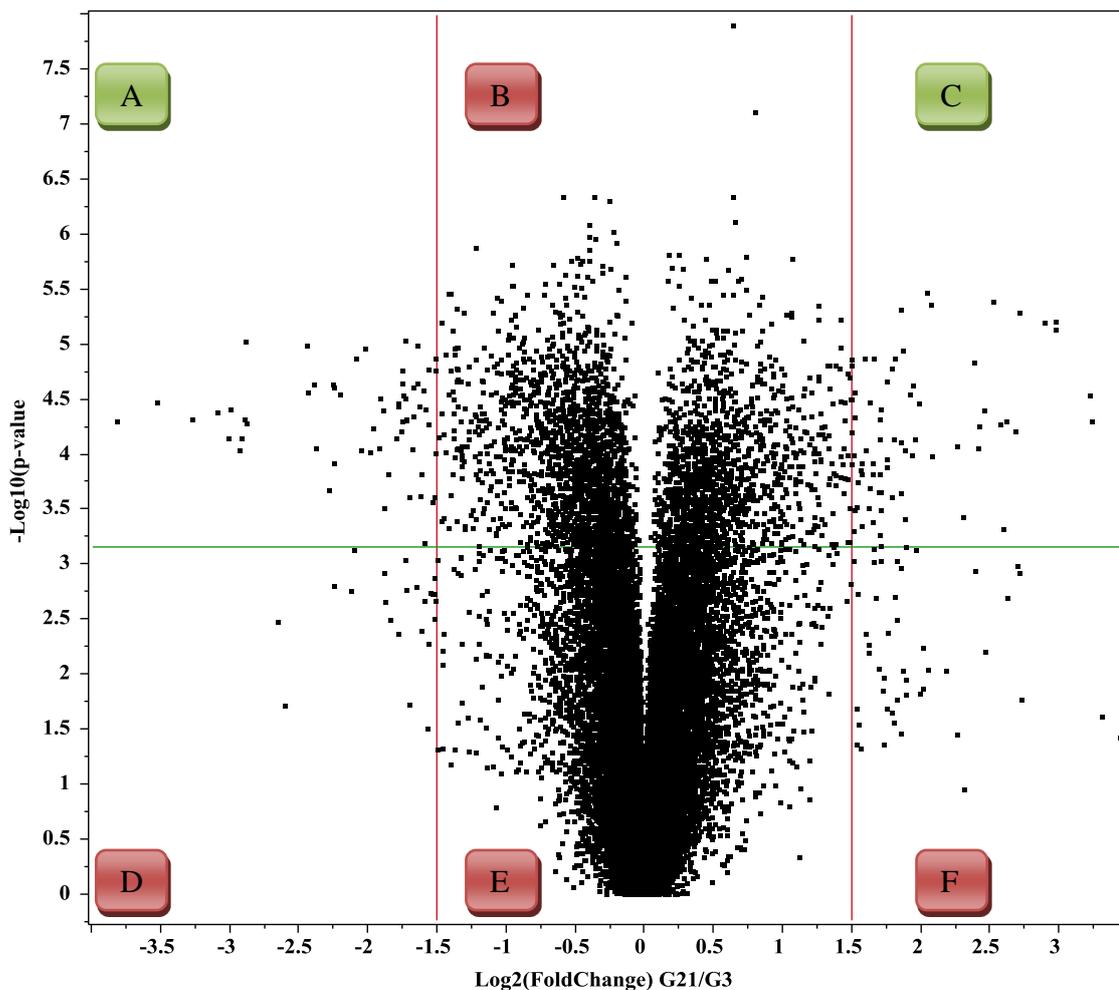
**Figura 4.** Valores de correlação entre os 96 *arrays*. Barra à direita mostra a escala de cores seguindo os valores de correlação utilizadas na tabela.

#### 4.6 Análise dos dados - Identificação de genes Diferencialmente Expressos

Pelo teste F da ANOVA, ao nível de 5% de probabilidade de erro, para os dois genótipos analisados, foram encontrados 16.669 genes diferencialmente expressos pelo teste F, considerando todos os tempos e tipos de inoculação. Para a análise comparando-se a inoculação ou não das plantas, também considerando todos os genótipos e os tempos, foram encontrados um total de 8.231 genes diferencialmente expressos pelo teste F com  $p < 0.05$ . Porém, para as duas análises após a correção dos *p-values* pelo FDR com  $p < 0.05$  nenhum gene foi considerado diferencialmente expresso nas condições experimentais empregadas neste trabalho.

A análise de todas as combinações possíveis, contemplando as diferenças entre os seis tempos e as duas inoculações, dentro e entre os genótipos, realizada por meio do método estatístico Bayesiana Empírica (*B-test*), evidenciou que não houve diferenças significativas dentro de cada genótipo, tanto nas formas utilizadas para as inoculações, como na combinação dos tempos.

Devido à inexistência de diferença significativa dentro dos genótipos, os 48 tratamento de G21 e 48 de G33 foram consideradas como repetições, desconsiderando assim, os tempos e inoculações. Desta forma, os resultados obtidos referem-se às diferenças entre os genótipos resistente e suscetível. Assim, foi possível verificar que dos 46.274 genes analisados no microarranjo, 3.383 genes apresentaram expressão diferencial ( $p < 0.01$ ) (*p-value* corrigido). Dentre esses, 43 apresentaram valores da razão do *foldchange* (G21/G33) maiores que 1,5 vezes. Na figura 5 pode-se observar o gráfico *Volcano* representando todos os genes do microarranjo, na qual as seções do gráfico identificadas com as letras A e C (verde) são as seções onde os gene diferencialmente expressos se encontram.



**Figura 5.** Gráfico *Volcano*. Linha vermelha indica o valor de foldchange 1.5. e linha verde indica o valor do ponto de corte da probabilidade ( $p < 0,01$ ). As seções A e C representam os genes diferencialmente expressos.

Dos 43 genes diferencialmente expressos, 22 foram induzidos e 21 foram reprimidos. As anotações dos genes estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2. Dos genes induzidos, cinco não apresentaram informação de anotação após o BLAST. Dos 17 genes restantes, 10 foram relacionados diretamente com a resposta de estresse, sendo que três relacionados ao estímulo biótico, quatro ao estímulo abiótico, três responde a qualquer estímulo (biótico ou abiótico). Os demais genes (7) foram relacionados a processos metabólicos da planta como a atividade estrutural, catalítica, transferase, ligase e hidrolase. Após o BLAST dos genes reprimidos, três não apresentaram informação de anotação e um apresentou entrada duplicada, ou seja, a mesma sequência com número de acesso e nome do gene diferentes. Dos 17 restantes, sete foram relacionados diretamente com a resposta de estresse, sendo um relacionado a estímulo biótico, três a estímulo abiótico e três respondem a estresses bióticos e abióticos. Os demais genes (10) foram relacionados a processos metabólicos, atividade transferase e organização celular.

**Tabela 1.** Lista dos genes induzidos classificados como diferencialmente expressos.

Nome do gene	Anotação	p-Value	q-Value	FC* G21/G33	GL**	Função Molecular	Resistência ao Patossistema
<b>Eucgr.A00523.1</b>	<i>cytochrome P450</i>	4.82E-05	0.0028	1.70	A	Ligase	Batata- <i>Phytophthora infestans</i> (Resende et al., 2003)
<b>Eucgr.B02470.1</b>	Sem anotação	3.43E-05	0.0026	1.63	B	-	-
<b>Eucgr.C03112.1</b>	<i>Insulinase</i>	1.35E-05	0.0025	1.81	C	Catalisador	
<b>Eucgr.D01340.2</b>	<i>alpha-soluble NSF attachment protein 2</i>	2.95E-05	0.0026	3.21	D	-	-
<b>Eucgr.E00008.1</b>	<i>Seven transmembrane MLO family protein</i>	1.51E-04	0.0041	1.65	E	Ligase	Cevada- <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (Devoto et al., 2003)
<b>Eucgr.E00157.1</b>	<i>Bestrophin-like protein</i>	5.36E-04	0.0083	1.70	E	-	-
<b>Eucgr.E02403.1</b>	<i>sulfotransferase 2A</i>	2.22E-04	0.0050	1.69	E	Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Alternaria brassicicola</i> (Schenk et al., 2000)
<b>Eucgr.F00311.1</b>	<i>LRR-transmembrane protein kinase</i>	5.57E-05	0.0029	2.42	F	Quinase	Arroz- <i>Xanthomonas oryzae</i> (Wang et al., 1998)
<b>Eucgr.F02801.1</b>	<i>Riboflavin synthase</i>	4.85E-04	0.0078	2.59	F	Catalisador	
<b>Eucgr.G01616.2</b>	<i>Ribosomal protein S25 family protein</i>	4.13E-06	0.0025	2.53	G	Estrutura molecular	
<b>Eucgr.G03215.3</b>	<i>Cyclophilin-4</i>	5.44E-05	0.0029	2.58	G	Catalisador	
<b>Eucgr.H04653.1</b>	<i>RNA helicase family protein</i>	1.26E-04	0.0038	1.50	H	Hidrolase	
<b>Eucgr.I01161.1</b>	<i>carboxyesterase 13</i>	4.44E-06	0.0025	2.07	I	Transferase	
<b>Eucgr.I02104.1</b>	Sem anotação	8.90E-05	0.0033	2.42	I	-	-
<b>Eucgr.I02246.1</b>	<i>basic chitinase b</i>	4.60E-04	0.0076	1.58	I	Hidrolase	Algodão- <i>Rhizoctonia solanis</i> (Sharma et al., 2011)
<b>Eucgr.J02300.1</b>	<i>lysine histidine transporter 1</i>	4.66E-05	0.0028	1.52	J	Transferase	
<b>Eucgr.J02435.2</b>	Sem anotação	4.90E-06	0.0025	1.86	J	-	-
<b>Eucgr.K00288.1</b>	<i>fibrillarin 2</i>	2.81E-05	0.0026	1.92	K	Transferase	
<b>Eucgr.L01855.1</b>	Sem anotação	1.79E-04	0.0045	1.55	LK*	-	-
<b>Eucgr.L02728.1</b>	<i>Oxygenase superfamily protein</i>	9.31E-05	0.0034	1.60	LK*	Catalisador	
<b>Eucgr.L03302.1</b>	Sem anotação	1.57E-05	0.0025	1.51	LK*	-	-
<b>Eucgr.L03510.1</b>	<i>E3 ubiquitin ligase protein</i>	6.41E-06	0.0025	2.90	LK*	Ligase	Fumo- <i>Cladosporium fulvum</i> (Yang et al., 2006)

\*FC: Fold Change; \*\*GL:Grupos de ligação.

**Tabela 2.** Lista dos genes reprimidos classificados como diferencialmente expressos.

Nome do gene	Anotação	p-Value	q-Value	FC* G21/G33	GL**	Função Molecular	Resistência ao Patossistema
<b>Eucgr.A01875.1</b>	<i>O-methyltransferase family protein</i>	4.85E-05	0.0028	-1.72	A	Transferase	
<b>Eucgr.A01876.1</b>	<i>O-methyltransferase family protein</i>	9.72E-05	0.0034	-1.51	A	Transferase	
<b>Eucgr.B01122.3</b>	<i>ATP-dependent NAD dehydratase</i>	2.51E-04	0.0054	-1.52	B	Catalisador	
<b>Eucgr.C00308.1</b>	<i>carotenoid cleavage dioxygenase 1</i>	4.80E-05	0.0028	-2.90	C	Catalisador	
<b>Eucgr.C01995.1</b>	<i>npk1-related protein kinase 2</i>	6.24E-05	0.0030	-1.76	C	Quinase	
<b>Eucgr.C02083.1</b>	<i>receptor serine/threonine kinase - RSTK</i>	2.25E-05	0.0025	-1.64	C	Quinase	
<b>Eucgr.C03832.1</b>	<i>proline-rich extensin-like receptor kinase 1</i>	2.32E-05	0.0025	-2.40	C	Quinase	Canola- <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Silva et al., 2002)
<b>Eucgr.E00114.1</b>	<i>calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 2</i>	6.40E-04	0.0092	-1.59	E	Quinase	
<b>Eucgr.E02131.1</b>	<i>phosphoglucose isomerase 1</i>	3.71E-05	0.0027	-1.79	E	Catalisador	
<b>Eucgr.E02131.2</b>	<i>phosphoglucose isomerase 1</i>	3.10E-05	0.0026	-1.92	E	Catalisador	
<b>Eucgr.F00781.1</b>	<i>beta-1,2-xylosyltransferase</i>	5.31E-05	0.0029	-1.56	F	Transferase	
<b>Eucgr.F01760.1</b>	<i>acyl-transferase family protein</i>	4.11E-05	0.0027	-3.09	F	Transferase	
<b>Eucgr.G01590.1</b>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>	9.57E-06	0.0025	-2.89	G	Transferase	
<b>Eucgr.G01783.1</b>	<i>bHLH DNA-binding superfamily protein</i>	3.38E-05	0.0026	-3.52	G	Transferase	
<b>Eucgr.H01128.1</b>	<i>cytochrome P450</i>	3.10E-04	0.0060	-1.88	H	Ligase	Batata- <i>Phytophthora infestans</i> (Resende et al., 2003)
<b>Eucgr.H03534.1</b>	<i>photosystem I subunit D-2</i>	2.14E-04	0.0049	-2.28	H	-	-
<b>Eucgr.H04559.1</b>	<i>nuclear transport factor 2B</i>	5.04E-05	0.0028	-3.82	H	Ligase	
<b>Eucgr.H04570.1</b>	<i>nuclear transport factor 2A</i>	7.26E-05	0.0031	-2.91	H	Ligase	
<b>Eucgr.I00351.1</b>	Sem anotação	9.19E-05	0.0034	-2.05	I	-	-
<b>Eucgr.J02273.2</b>	Sem anotação	1.53E-04	0.0042	-1.61	J	-	-
<b>Eucgr.K00152.1</b>	Sem anotação	1.33E-05	0.0025	-2.08	K	-	-

\*FC: Fold Change; \*\*GL: Grupos de ligação.

## 5. DISCUSSÃO

A baixa severidade da ferrugem nas plantas do clone suscetível G33 foi atribuída à ineficiência da inoculação, uma vez que devido um erro de programação da câmara de nevoeiro, as plantas não permaneceram com água livre nas folhas nas primeiras horas após a inoculação, essencial para o sucesso da infecção, conforme pré-estabelecido (Ruiz et al., 1989). Consequentemente, o genótipo suscetível apresentou apenas poucas pústulas puntiformes e não expressou seu potencial de suscetibilidade. Entretanto, mesmo assim foi possível encontrar genes potencialmente diferencialmente expressos entre os dois genótipos contrastantes quanto à resistência, sugerindo que mecanismos de defesa pré-existent contribuem fortemente para a resposta de defesa da plantas de eucalipto ao fungo *P. psidii*.

Dos genes diferencialmente expressos entre os genótipos avaliados, os induzidos, ou seja, genes mais expressos no genótipo resistente, possuem similaridade com proteínas que possuem papel importante na defesa de plantas contra os patógenos.

Entre os genes identificados, foi encontrado um gene (*Eucgr.E00008.1*) que apresenta alta similaridade com a sequência do gene que codifica para família da proteína 7-transmembrana MLO. Em cevada, plantas contendo alelos homozigotos recessivos MLO são resistentes ao fungo biotrófico *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* causador do mofo em cevada, indicando um papel deste gene em funções relacionadas à defesa das plantas (Buschges et al., 1997; Devoto et al., 2003). Em *Arabidopsis*, genes homólogos a família da proteína 7-transmembrana MLO também já foram estudados sendo denominados AtMLO (Chen et al., 2006). Estes genes apresentam padrão de expressão único e regulado de modo diferente por uma variedade de estímulos bióticos e, ou abióticos, sugerindo que as funções das proteínas AtMLO estão presentes em diversos processos do desenvolvimento e da resposta de defesa (Chen et al., 2006). No presente trabalho, o gene *Eucgr.E00008.1* foi expresso 1.65 vezes mais no genótipo resistente G21 quando comparado ao genótipo suscetível G33.

O gene *Eucgr.E02403.1* foi expresso 1.69 vezes mais no genótipo resistente G21 quando comparado ao genótipo suscetível G33. A sequência deste gene mostrou alta similaridade ao gene da sulfotransferase 2A (AtST2a) descrito em *Arabidopsis thaliana* (Gidda et al., 2003). Esse gene é responsável pela regulação da atividade biológica do 12-hidroxi-jasmonato ou possível inativação do excesso de ácido jasmônico. O ácido jasmônico e seus derivados são importantes em rotas do desenvolvimento das plantas,

florescimento, tuberização e defesa a patógenos (Gidda et al., 2003). Em genótipos suscetíveis de plátano (*Platanus* sp.), a aplicação de ácido jasmônico induziu o acúmulo de fitoalexinas após a inoculação do patógeno (*Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*) ou da molécula elicitora (Clerivet e Alami, 1999). Em *Arabidopsis thaliana*, análises de microarrays de cDNA revelaram um surpreendente nível de correlação entre as respostas de defesa apresentadas a diferentes tratamentos aplicados às plantas, como a inoculação de um fungo incompatível, o tratamento com moléculas de sinalização de defesa com o ácido salicílico, metil jasmonato e etileno. Os resultados sugerem a existência de redes de interligação e coordenação entre as diferentes vias de defesa (Schenk et al., 2000).

A sequência do gene *Eucgr.F00311.1* apresentou alta similaridade com a sequência do gene que codifica a proteína transmembrana quinase, rica em repetições de leucina (*Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase*). A subfamília *Leucine-rich repeat receptor kinases* (LRR-RKs) são as mais conhecidas. LRR-RKS regulam uma grande variedade de processos de desenvolvimento e defesa da planta, incluindo a proliferação celular, a manutenção de células do caule, a percepção de hormônios, a resposta de defesa com especificidade ao hospedeiro ou não, a resposta de ferimento e simbiose (Torii, 2004; Wang et al., 2007). Diversos genes de resistência foram isolados e caracterizados em hospedeiros vegetais de acordo com aspectos funcionais e estruturais. A maior parte das proteínas codificadas por esses genes, denominadas de proteínas R, apresentam um domínio contendo repetições ricas em leucina (LRR), que contém leucinas ou outros aminoácidos hidrofóbicos em intervalos regulares em uma sequência de aproximadamente 24 aminoácidos. Estes domínios estão normalmente associados à mediação de interações proteína-proteína. Por estar presente na grande maioria dos receptores R, o domínio LRR é o principal candidato de reconhecimento da proteína Avr. De fato, mutações pontuais no domínio LRR da proteína Xa21 resultaram em proteínas capazes de conferir resistência e especificidade a diferentes patógenos e suas proteínas Avr (Wang et al., 1998). O gene *Eucgr.F00311.1* foi expresso 2.42 vezes mais no genótipo resistente G21 quando comparado ao genótipo suscetível G33, uma diferença considerável, indicando que esse gene pode ser importante para a planta do genótipo G21 apresentar o fenótipo de resistência ao fungo *P. psidii*.

O gene *Eucgr.G03215.3* mostrou-se similar ao gene que codifica para a proteína ciclofilin-4 (*Cyclophilin-4*). Esta proteína desempenha a função básica do dobramento de proteínas, e podem também desempenhar um papel importante no processamento de

mRNA, na degradação de proteínas, na transdução de sinal e, portanto, crucial durante o desenvolvimento do patógeno e a capacidade de resposta ao stress (Romano et al., 2004).

O gene *Eucgr.I02246.1* é similar ao gene que codifica para a proteína endoquitinase básica B. As quitinases são consideradas ferramentas de fortalecimento da resposta imune de plantas contra patógenos (Sharma et al., 2011), pois essas enzimas catalisam a hidrólise de quitina, constituinte bastante comum em parede celulares de organismos como os fungos. Ademais, o aumento do nível dessas moléculas devido a fatores abióticos e bióticos também contribui para demonstrar o seu papel na resposta de defesa da planta (Sharma et al., 2011).

A sequência do gene *Eucgr.L03510.1* exibiu alta similaridades com a sequência do gene que codifica para proteína ubiquitina-ligase (E3). Em plantas, mutações específicas nas proteína ubiquitina-ligase (E3) podem bloquear a embriogênese, ritmos circadianos, fotomorfogênese, respostas hormonais e senescência (Yang et al., 2006). Uma classe conservadora *U-box ARMADILLO repeat E3 ligases* foi identificada como reguladores positivos da morte celular e de defesa de plantas das famílias Solanaceae e Brassicaceae (Yang et al., 2006). O mecanismo de ubiquitinação pode resultar também na ligação covalente da proteína ubiquitina ao substrato protéico destinado à degradação e ainda é importante para uma ampla gama de processos de desenvolvimento da planta e respostas a estresses abióticos e bióticos (Zeng et al., 2006). Outros três componentes participam do processo de ubiquitinação: a enzima ativadora da ubiquitina (E1), a enzima de conjugação da ubiquitina (E2) e a proteína ubiquitina-ligase (E3) (Nandi et al., 2006). Sendo o processo de ubiquitinação altamente conservado em eucariotos, com um importante papel em morte celular e imunidade em plantas, sendo também, uma candidata a ser o alvo de proteínas que poderiam interferir no mecanismo de defesa das plantas de eucalipto a *P. psidii*. O gene *Eucgr.L03510.1* foi expresso 2.9 vezes mais no genótipo resistente G21 quando comparado ao genótipo suscetível G33, a maior diferença encontrada entre os genes diferencialmente expressos relacionados com a resposta ao estresse.

As sequências dos genes reprimidos *Eucgr.C01995.1*, *Eucgr.C02083.1*, *Eucgr.C03832.1* e *Eucgr.E00114.1* foram similares às sequências de proteínas quinases. As proteínas quinases constituem a maior família de proteínas em eucariotos e são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação as vias metabólicas e estão intimamente envolvida na sinalização das redes celulares (Wang et al., 2007). O

mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais da proteína até o controle transcricional (Silva et al., 2009).

O gene *Eucgr.C01995.1* foi similar a um gene que codifica uma proteína denominada *ANP*, *Arabidopsis NPK1-like protein kinase (NPK1- Nicotiana protein kinase)*. Essa proteína está envolvida na regulação do ciclo celular e na resposta ao estresse oxidativo nas células vegetais. A sua ativação pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desencadeia uma resposta de defesa que protege a planta contra agentes abióticos (Kovtun et al., 2000). O gene *Eucgr.C01995.1* expressou 1.75 vezes mais no genótipo suscetível quando comparado com o resistente.

O gene *Eucgr.C02083.1*, expresso 1,64 vezes mais no genótipo suscetível, foi similar a uma proteína denominada *RSTK (receptor serine/threonine kinase)*, também descrita como um importante receptor quinase na resposta de defesa das plantas aos estímulos abióticos (Sanabria et al., 2010).

O gene *Eucgr.C03832.1* foi similar a uma proteína denominada *PERK1 (Proline Extensin-like Receptor Kinase 1)*. Esta proteína está fortemente relacionada com resposta a estímulos bióticos e abióticos. Em canola (*Brassica napus*) estímulos induzidos por ferimentos mecânicos e ferimentos devido a infecção do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* resultaram em um rápido acúmulo do RNA mensageiro de PERK1, evidenciando que PERK1 pode estar envolvido na percepção geral de danos causados na parede celular (Silva e Goring, 2002). No presente trabalho o gene *Eucgr.C03832.1* apresentou expressão 2,39 vezes maior no genótipo suscetível G33 quando comparada com a expressão no genótipo resistente G21.

Os genes diferencialmente expressos *Eucgr.A00523.1* (induzido) e *Eucgr.H01128.1* (reprimido) foram similares a genes que codificam para o citocromo P450 (*cytochrome P450*). Esta enzima está associada ao estresse oxidativo desempenhando papel fundamental na ativação de oxigênio e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) (Lewis, 2002). A geração de espécies reativas de oxigênio conduz a explosão oxidativa que é uma das respostas mais rápidas de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno e faz parte do que se conhece como resposta de hipersensibilidade (HR) (Resende et al., 2003; Zurbriggen et al., 2010).

O gene *Eucgr.E00114.1*, expresso 1,59 vezes mais no genótipo suscetível G33 em relação ao genótipo suscetível G21, mostrou-se similar ao que codifica a uma proteína *CRCK1 (calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase)*. Esta proteína possui alta

homologia à proteína *RSTK*, descrita acima. *CRCK1* tem papel importante na via de transdução de sinal em resposta ao estresse abiótico e a nível molecular na presença de ácido abscísico e peróxido de hidrogênio (Yang et al., 2004).

A baixa eficiência da inoculação provocou a falta de indução da expressão diferencial dos genes entre os genótipos resistente e suscetível e entre plantas inoculadas e não inoculadas. Embora um grande número de genes passaram pelo teste F da ANOVA ao nível de significância de  $p > 0.05$ , nenhum gene foi classificado como diferencialmente expresso após a correção dos valores de probabilidade pelo FDR (0.05). Portanto foram considerados todos falsos positivos. O grande número de falsos positivos encontrado neste trabalho é descrito na literatura como um problema comum na análise de dados de microarranjo pelo fato de que múltiplos testes são efetuados em cada experimento (um para cada gene), de maneira que um grande número de falsos positivos é esperado mesmo em situações nas quais não há qualquer expressão diferenciada entre os grupos experimentais (Rosa et al., 2007).

A correção de FDR está sendo rotineiramente utilizada na aplicação do conceito de q-valor, definido como o menor valor de FDR para o qual uma determinada hipótese seria rejeitada (Storey, 2003). Esta correção, por FDR, é considerada um critério menos restritivo para múltiplos testes, definida como a proporção esperada de falsos positivos entre todos os testes significativos (Storey, 2003).

A metodologia para encontrar genes diferencialmente expressos por meio da ANOVA é comum na literatura. Calla et al. (2009) estudaram o mofo branco em soja causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando a técnica de microarranjo. Esses autores avaliaram genótipos resistentes e suscetíveis de soja em 8 e 14 horas após a inoculação e identificaram genes envolvidos na defesa contra este patógeno, e assim, puderam inferir sobre possíveis alterações fisiológicas que ocorrem durante infecção. Para tal, eles empregaram a ANOVA e correção dos dados de *p-value* utilizando FDR 0.05, e identificaram um total de 1270 genes diferencialmente expressos na comparação entre os tempos de inoculação, bem como 105 genes quando os genótipos foram contrastados. Boava et al. (2011), em um estudo pioneiro utilizando microarranjo para avaliar expressão gênica da resposta de defesa de plantas de citrus a *Phytophthora parasitica*, encontraram 24 genes candidatos por meio do método da ANOVA. Os autores avaliaram genótipos resistentes e suscetíveis de citrus após 48 horas da inoculação com disco de micélio do fungo. Dos 24 genes encontrados, foram observados tanto genes relacionados diretamente na resistência a doenças como também genes responsáveis pela regulação da transcrição, a

sinalização de morte celular, explosão oxidativa e a ativação de genes que participam da resposta de hipersensibilidade, tais como TIR-NBS-LRR e RPS4.

De forma geral, pela natureza dos genes diferencialmente expressos detectados neste trabalho, foi possível verificar que os genótipos G21 (resistente) e G33 (suscetível) possuem genes que ativam mecanismos de defesa na planta, contudo o genótipo G21 possui genes relacionados diretamente com resposta ao estresse biótico como por exemplo genes que codificam proteínas com domínio LRR, proteína MLO, sulfotransferase 2A, U3 ubiquitina, e esses genes são capazes de reconhecer o fungo *P. psidii* e ativar de forma eficiente mecanismo que impedem que o fungo desenvolva. Já o genótipo G33, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que, mesmo apresentando mecanismo de resposta ao estresse, esses mecanismos não são suficientes para ativar outros mecanismos na planta que impeça que o fungo se desenvolva.

É importante ressaltar que todos os resultados de genes diferencialmente expressos obtidos neste trabalho precisam ser validados por outra técnica independente, como por exemplo, PCR em tempo real. Outro ponto importante a ser ressaltado, é que a maioria dos genes envolvidos nos processos de defesa da planta são expressos apenas após a infecção pelo patógeno, portanto algumas modificações na metodologia devem ser realizadas a fim de investigar de forma precisa quais genes apresentam diferença de expressão ao longo do tempo. Os resultados obtidos servem para direcionar futuras investigações sobre o patossistema *Eucalyptus-Puccinia* e auxiliar na identificação de alvos para o controle da doença em nível de campo.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- A análise global da expressão gênica de plantas de eucalipto resistentes e suscetíveis à ferrugem por meio da análise de microarranjos permitiu identificar potenciais genes diferencialmente expressos quando comparados genótipos resistentes versus suscetíveis a ferrugem em eucalipto;
- Os genes identificados como diferencialmente expressos possuem papel importante nos mecanismos de defesa das plantas a estresse biótico e abiótico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF. Anuário Estatístico da ABRAF de 2012 - ano base 2011. Brasília. Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, 7, 150p., 2012.
- AGILENT. Two - Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling v. 6.6. 2012.
- AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>, acessado em 04 de abril de 2013.
- ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A. V., MAFFIA, R. G. e ASSIS, T. F. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa. Editora UFV, 2ª Edição, 500p., 2009.
- ALVES, A. A., ROSADO, C. C. G., FARIA, D. A., GUIMARÃES, L. M. S., LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S. H., GRATTAPAGLIA, D. e ALFENAS, A. C. Genetic mapping provides evidence for the role of additive and non-additive QTLs in the response of inter-specific hybrids of *Eucalyptus* to *Puccinia psidii* rust infection. *Euphytica*. 2011. DOI:10.1007/s10681-011-0455-5.
- BENT, A. F. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. *Plant Cell* 8: 1757-1771, 1996.
- BOAVA, L., YALY, M. C., MAFRA, V., KUBO, K., KISHI, L., TAKITA, M., ALVES, M. R. e MACHADO, M. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics* 12: 357-371, 2011.
- BOLSTAD, B., IRIZARRY, R. A., ASTRAND, M. e SPEED, T. P. A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics* 19: 185-193, 2003.
- BOOTH, T. H. e JOVANOVIĆ, T. Assessing vulnerable areas for *Puccinia psidii* (eucalyptus rust) in Australia. *Australasian Plant Pathology* 41: 425-429, 2012.
- BOYD, L. A., RIDOUT, C., O'SULLIVAN, D. M., LEACH, J. E., LEUNCH, H. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*. 29:233-240, 2013.
- BRACELPA. Relatório Florestal 2010-2011, 2, 26p., 2011.
- BRONDANI, R., WILLIAMS, E., BRONDANI, C. e GRATTAPAGLIA, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC Plant Biology* 6: 20, 2006.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of genus *Eucalyptus* L'Her. (*Myrtaceae*). *Australian Systematic Botany* 13: 79-148, 2000.
- BUSCHGES, R., HOLLRICHER, K., PANSTRUGA, R., WOLTER, G. S. M., FRIJTERS, A., DAELEN, R. V., LEE, T. V. D., DIERGAARDE, P., GROENENDIJK, J., TOPSCH, S., VOS, P., SALAMINI, F. e SCHULZE-LEFERT, P. The BarleyMloGene: A Novel Control Element of Plant Pathogen Resistance. *Cell* 88: 695-705, 1997.
- CALLA, B., VUONG, T., RADWAN, O., HARTMAN, G. L. e CLOUGH, S. J. Gene Expression Profiling Soybean Stem Tissue Early Response to *Sclerotinia sclerotiorum* and In Silico Mapping in Relation to Resistance Markers. *Plant Gen.* 2: 149-166, 2009.

- CARNEGIE, A. J. e LIDBETTER, J. R. Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. *Australasian Plant Pathology* 41: 13-29, 2012.
- CARNEGIE, A. J., LIDBETTER, J. R., WALKER, J., HORWOOD, M. A., TESORIERO, L., GLEN, M. e PRIEST, M. J. *Uredo rangelii*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on *Myrtaceae* in Australia. *Australasian Plant Pathology* 39: 463-466, 2010.
- CHANG, S., PURYEAR, J. e CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116, 1993.
- CHEN, Z., HARTMANN, A., WU, M. J., FRIEDMAN, E. J., CHEN, J. G., PULLEY, M., LEFERT, P. S., PANSTRUGA, R. e JONES, A. M. Expression analysis of the AtMLO gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. *Plant Molecular Biology* 60: 583-597, 2006.
- CLERIVET, A. e ALAMI, I. Effects of jasmonic acid and of an elicitor from *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* on the accumulation of phytoalexins in leaves of susceptible and resistant plane trees. *Plant Science* 148: 105-110, 1999.
- COUTINHO, T. A., WINGFIELD, M. J., ALFENAS, A. C. e CROUS, P. W. Eucalyptus rust: A disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease* 82: 819-825, 1998.
- DANGL, J. L. e JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833, 2001.
- DEVOTO, A., HARTMANN, A., PIFFANELLI, P., ELLIOTT, C., SIMMONS, C., TARAMINO, G., GOH, C. S., COHEN, F. E., EMERSON, B. C., LEFERT, P. S. e PANSTRUGA, R. Molecular Phylogeny and Evolution of the Plant-Specific Seven-Transmembrane MLO Family. *Journal of Molecular Evolution* 56: 77-88, 2003.
- DOYLE, J. J. e DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15, 1990.
- ELDRIDGE, K., DAVIDSON, J., HARWOOD, C. e WYK, G. Eucalypt Domestication and Breeding. USA. Oxford University Press, 1, 308p., 1994.
- FAO - Food and Agriculture Organization 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/381/default.aspx>>, acessado em 16 de março de 2011.
- FERREIRA, F. A. Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore* 7: 91-109, 1983.
- FERREIRA, F. A. Ferrugem do eucalipto. In: *Patologia Florestal. Principais Doenças Florestais no Brasil*. In: (Ed.). Viçosa, MG: Sociedade de Investigações Florestais, 129-152p., 1989.
- FERREIRA, M. Melhoramento e a Sivilcutura intensiva clonal. *IPEF* 45: 8, 1992.
- FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-669, 1942.
- GIDDA, S. K., MIERSCH, O., LEVITIN, A., SCHMIDT, J., WASTERACK, C. e VARIN, L. Biochemical and Molecular Characterization of a Hydroxyjasmonate Sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 17895-17900, 2003.
- GLEN, M., ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A. V., WINGFIELD, M. J. e MOHAMMED, C. *Puccinia psidii*: A threat to the Australian environment and economy - A review. *Australasian Plant Pathology* 36: 1-16, 2007.
- GOLLE, D. P., REINIGER, L. R. S., CURTI, A. R. e BEVILACQUA, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. *Ciência Rural*, 39: 1606-1613, 2009.

- GRATTAPAGLIA, D., PLOMION, C., KIRST, M. e SEDEROFF, R. R. Genomics of growth traits in forest trees. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 148-156, 2009.
- GRATTAPAGLIA, D., VAILLANCOURT, R., SHEPHERD, M., THUMMA, B., FOLEY, W., KÜLHEIM, C., POTTS, B. e MYBURG, A. Progress in *Myrtaceae* genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes* 8: 463-508, 2012.
- GRAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology* 43:205-27, 2005.
- JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. *Bragantia* 4: 475-487, 1944.
- JONES, J.D.G. e DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329. 2006.
- JUNGHANS, D. T., ALFENAS, A. C., BROMMONSCHENKEL, S. H., ODA, S., MELLO, E. J. e 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* 108: 175-180, 2003.
- JUNGHANS, D. T., ALFENAS, A. C. e MAFFIA, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. *Fitopatologia Brasileira* 28: 184-188, 2003.
- KAGNOFF, M. F. e ECKMANN, L. Analysis of host responses to microbial infection using gene expression profiling. *Current Opinion in Microbiology* 4: 246-250, 2001.
- KAWANISHI, T., UEMATSU, S., KAKISHIMA, M., KAGIWADA, S., HAMAMOTO, H., HORIE, H. e NAMBA, S. First report of rust disease on ohia and the causal fungus, *Puccinia psidii*, in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75: 428-431, 2009.
- KAZAN, K., SCHENK, P. M., WILSON, I. e MANNERS, J. M. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* 2: 177-185, 2001.
- KOVTUN, Y., CHIU, W.-L., TENA, G. e SHEEN, J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS* 97: 2940–2945 2000.
- LAU, D., RODRÍGUEZ, M. A. D., LAU, E. Y. e ALFENAS, A. C. Resistência a doenças: aplicações em patossistemas florestais. In: A. Borém (Ed.). *Biotecnologia florestal*. Viçosa, 1, 143-173p., 2007.
- LEWIS, D. F. V. Oxidative stress: the role of cytochromes P450 in oxygen activation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77: 1095–1100, 2002.
- MAMANI, E. M. C., BUENO, N. W., FARIA, D. A., GUIMARÃES, L. M. S., LAU, D., ALFENAS, A. C. e GRATTAPAGLIA, D. Positioning of the major locus for *Puccinia psidii* rust resistance (Ppr1) on the *Eucalyptus* reference map and its validation across unrelated pedigrees. *Tree Genetics & Genomes* 6: 953-962, 2010.
- MARTIN, G. B., BOGDANOVE, A. J. e SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23-61, 2003.
- MEHDY, M. C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105: 467-472, 1994.
- MELLANO, V. Rust on *Myrtle* Found in San Diego County. *Retail Nursery Newsletter* 1: 3, 2006.
- MONAHAN, J. e ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*. 15:349-357, 2012.
- MORA, A. L. e GARCIA, C. H. A cultura do eucalipto no Brasil. São Paulo - SBS: 1, 2000.

- NANDI, D., TAHILIANI, P., KUMAR, A. e CHANDU, D. The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Bioscience* 31: 137–155, 2006.
- POKE, F. S., VAILLANCOURT, R. E., POTTS, B. M. e REID, J. B. Genomic Research in *Eucalyptus*. *Genetica* 125: 79-101, 2005.
- POTTS, B. M. Genetic improvement of eucalypts. In: (Ed.). *Encyclopedia of forest sciences*. Oxford, UK: Elsevier 1480-1490p., 2004.
- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- RESENDE, M. L. V., SALGADO, S. M. L. e CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28: 123-130, 2003.
- ROMANO, P. G. N., HORTON, P. e GRAY, J. E. The Arabidopsis Cyclophilin Gene Family. *Plant Physiology* 134: 1268–1282, 2004.
- ROSA, G. J. D. M., ROCHA, L. B. D. e FURLAN, L. R. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36: 186-209, 2007.
- ROSADO, T. B., TOMAZ, R. S., JUNIOR, M. F. R., ROSADO, A. M., GUIMARÃES, L. M. D. S., ARAÚJO, E. F. D., ALFENAS, A. C. e CRUZ, C. D. Detection of QTL associated with rust resistance using IBD-based methodologies in exogamic *Eucalyptus* spp. populations. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10: 321-328, 2010.
- RUIZ, R. A. R., ALFENAS, A. C., FERREIRA, F. A. e VALE, F. X. R. R. D. Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 14: 55-61, 1989.
- SANABRIA, N. M., HUANG, J.-C. e DUBERY, I. A. Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense. *Self/Nonsell* 1: 40-54, 2010.
- SAS Institute Inc., SAS® 9.2 Enhanced Logging Facilities, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008.
- SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura (2009) – Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>. >, acessado em 20 de fevereiro de 2011.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W. e BROWN, P. O. Quantitative Monitoring of Gene-Expression Patterns With a Complementary-Dna Microarray. *Science* 270: 467-470, 1995.
- SCHENK, P. M., KAZAN, K., WILSON, I., ANDERSON, J. P., RICHMOND, T., SOMERVILLE, S. C. e MANNERS, J. M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS* 97: 11655-11660, 2000.
- SCHENK, P. M., THOMAS-HALL, S. R., NGUYEN, A. V., MANNERS, J. M., KAZAN, K. e SPANGENBERG, G. Identification of plant defence genes in canola using *Arabidopsis* cDNA microarrays. *Plant Biology* 10: 539–547, 2008.
- SCHULZE, A. e DOWNWARD, J. Navigating gene expression using microarrays - a technology review. *Nature Cell Biology* 3: E190-E195, 2001.
- SHARMA, N., SHARMA, K. P., GAUR, R. K. e GUPTA, V. K. Role of chitinase in plant defense. *Asian J. Biochem* 6: 29-37, 2011.

- SILVA, B. V., BRUNO A. C. HORTA, ALENCASTRO, R. B. D. e PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova* 32: 453-462, 2009.
- SILVA, N. F. e GORING, D. R. The proline-rich, extensin-like receptor kinase-1 (PERK1) gene is rapidly induced by wounding. *Plant Molecular Biology* 50: 667–685, 2002.
- SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data. In: R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry e W. Huber (Ed.). *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. New York: Springer 397-420p., 2005.
- STOREY, J. D. The positive false discovery rate: a bayesian interpretation and the q-value. *The Annals of Statistics* 31: 2013–2035, 2003.
- THATCHER, L. F., ANDERSON, J. P. e SINGH, K. B. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* 32: 1-19, 2005.
- TORII, K. U. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *International Review of Cytology* 234: 1-46, 2004.
- UCHIDA, J., ZHONG, S. e KILLGORE, E. First Report of a Rust Disease on Ohia Caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. *Plant Disease* 90: 524-524, 2006.
- WANG, G. L., RUAN, D. L., SONG, W. Y., SIDERIS, S., CHEN, L., PI, L. Y., ZHANG, S., ZHANG, Z., FAUQUET, C., GAUT, B. S., WHALEN, M. C. e RONALD, P. C. Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* 10: 765-779, 1998.
- WANG, H., CHEVALIER, D., LARUE, C., CHO, S. K. e WALKER, J. C. The Protein Phosphatases and Protein Kinases of *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*: 1-38, 2007.
- WILLIAMS, J. E. e WOINARSKI, J. Eucalypt ecology: Individuals to ecosystems. Cambridge University Press 430p., 1997.
- XAVIER, A. A., ALFENAS, A. C., MATSUOKA, K. e HODGES, C. S. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 30: 277-281, 2001.
- YANG, C. W., LAMOTHE, R. G., EWAN, R. A., ROWLAND, O., YOSHIOK, H., SHENTON, A., YE, H., O'DONNELL, E., JONES, J. D. G. e SADANANDOM, A. The E3 Ubiquitin Ligase Activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and Its Functional Tobacco Homolog ACRE276 Are Required for Cell Death and Defense. *The Plant Cell* 18: 1084–1098, 2006.
- YANG, T., CHAUDHURI, S., YANG, L., CHEN, Y. e POOVAIAH, B. W. Calcium/Calmodulin Up-regulates a Cytoplasmic Receptor-like Kinase in Plants. *The journal of biological chemistry* 279: 42552-42559, 2004.
- ZENG, L. R., SÁNCHEZ, M. E. V., ZHU, T. e WANG, G. L. Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Research* 16: 413-426, 2006.
- ZHUANG, J.-Y. e WEI, S.-X. Additional materials for the rust flora of Hainan Province, China. *Mycosystema* 6: 853-860, 2011.
- ZURBRIGGEN, M. D., CARRILLO, N. e HAJIREZAEI, M. R. ROS signaling in the hypersensitive response. When, where and what for? *Plant Signaling & Behavior* 5: 393-396, 2010.