

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIGO EM RESPOSTA A
INFECÇÃO POR *Puccinia triticina*, AGENTE CAUSAL
DA FERRUGEM DA FOLHA**

ALICE CASASSOLA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, abril de 2015

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIGO EM RESPOSTA A
INFECCÃO POR *Puccinia triticina*, AGENTE CAUSAL
DA FERRUGEM DA FOLHA**

ALICE CASASSOLA

**Orientadora: Prof. Dra. Sandra Patussi Brammer
Coorientadora: Dra. Márcia Soares Chaves
Coorientadora no exterior: Dra. Lesley Boyd**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, abril de 2015

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese


"Expressão gênica em trigo em resposta à infecção por *Puccinia triticina*, agente causal da ferrugem da folha"

Elaborada por

ALICE CASASSOLA

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Doutora em Agronomia – Área de Produção Vegetal"


Aprovada em: 10/04/2015
Pela Comissão Examinadora


Dra. Sandra Patussi Brammer
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora

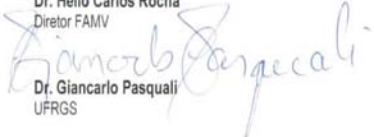

Dr. Márcia Soares Chaves
Embrapa Trigo


Dr. Luis Fernando Revers
Embrapa Uva e Vinho


Dra. Magali Ferrari Grando
FAMV/UPF


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coordenadora PPGAgro


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dr. Giancarlo Pasquali
UFRGS

CIP – Catalogação na Publicação

C343e Casassola, Alice
Expressão gênica em trigo em resposta a infecção
por *Puccinia triticina*, agente causal da ferrugem da
folha / Alice Casassola. – 2015.
142 f. : il. ; 25 cm.

Orientação: Profa. Dra. Sandra Patussi Brammer.
Coorientação: Dra. Márcia Soares Chaves (Brasil).
Coorientação: Dra. Lesley Boyd (Inglaterra).
Tese (Doutorado em Agronomia) –
Universidade de Passo Fundo, 2015.

1. Trigo – Melhoramento genético. 2. Fungos
fitopatogênicos – Plantas hospedeiras. 3. Trigo –
Cultura. I. Brammer, Sandra Patussi, orientador. II.
Chaves, Márcia Soares, coorientadora. III. Boyd,
Lesley. IV. Título.

CDU: 633.11

Catálogo: Bibliotecária Angela Saadi Machado - CRB 10/1857

DEDICATÓRIA

À minha família...

Meus pais Fiorentino e Lourdes e minha irmã Aline:

Pela compreensão...

Pelo apoio...

Pelo amor...

Ao meu noivo Cassiano...

Pela paciência...

Pela amizade e companheirismo...

Pelo amor...

A todos que acreditaram em mim, me ensinaram e me apoiaram durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade e pela concessão da bolsa de estudos;

À minha orientadora, Dra. Sandra Patussi Brammer, pela confiança, pelo suporte, pelos ensinamentos e, principalmente, pela amizade;

À minha coorientadora, Dra. Márcia Soares Chaves por acreditar no meu potencial, pela ajuda e compreensão durante esta caminhada;

À Dra. Lesley Boyd, pela oportunidade de realização de doutorado sanduíche junto à equipe do NIAB, pela confiança, ensinamentos e suporte de todas horas;

À Dra. Francesca Stefenato, pela amizade, companheirismo e ensinamentos;

À Dra. Andréia Caverzan, pela parceria, amizade, conversas de todas as horas, dicas e ensinamentos;

Aos colegas de Embrapa, Jordalan Muniz, Andréa Moras, Valdirene Volpato, Alceu Vicari e Marcos Copetti, pelo auxílio na realização dos experimentos, companheirismo e amizade;

Aos pesquisadores, Antônio Nhani Junior, Paula Regina Kuser-Falcão e Adhemar Zerlotini, pelo auxílio nas análises e ensinamentos prestados;

A todos que se envolveram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e que ajudaram na sua conclusão;

A Deus, principalmente, pela saúde e pela vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Resistência genética	12
2.2 Resistência de planta adulta em Toropi.....	16
2.3 Sistemas ou mecanismos de defesa em plantas.....	19
2.4 Expressão gênica.....	23
2.4.1 RNA-Seq e RT-qPCR.....	24
CAPÍTULO I - ALTERAÇÕES NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA DE PLANTA ADULTA EM TRIGO – CULTIVAR TOROPI	27
RESUMO	27
ABSTRACT	29
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Plantio.....	35
2.2 Extração do RNA e teste de qualidade das amostras.....	36
2.3 Seleção dos iniciadores (primers) para a análise de RT-qPCR e teste de eficiência.....	37
2.3.1 RT-qPCR.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Teste de eficiência dos iniciadores desenvolvidos.....	44
3.2 RT-qPCR.....	44
4 CONCLUSÕES	62
CAPÍTULO II - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TRIGO EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-INFECÇÃO COM <i>PUCCINIA TRITICINA</i>, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM-DA-FOLHA	63
RESUMO	63
ABSTRACT	65
1 INTRODUÇÃO	67
2 MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Plantio.....	70

	Página
2.2 Extração do RNA.....	71
2.3 Teste de qualidade das amostras pós-transporte.....	71
2.4 Sequenciamento.....	72
2.4.1 Análise de qualidade.....	73
2.4.2 Montagem do transcriptoma de referência.....	73
2.4.3 Identificação de transcritos diferencialmente expressos.....	74
2.4.4 Anotação funcional dos transcritos.....	75
2.4.5 Seleção dos iniciadores (<i>primers</i>) para validação do RNA-Seq via qPCR.....	76
2.4.6 RT-qPCR.....	78
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4 CONCLUSÕES.....	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	99
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS.....	123

LISTA DE TABELAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
Tabela	
1 Perda de rendimento de grãos de trigo em relação à severidade na folha em diferentes estádios de desenvolvimento da planta.....	13
2 Enzimas fúngicas responsáveis pela degradação da parede celular de plantas.....	21
CAPÍTULO I	
Tabela	
1 Sondas “unigenes” de trigo selecionadas via análise de microarray (Lesley Boyd, dados não publicados), nome do iniciador desenhado, sequência de bases e nome do gene a que se refere.....	39
2 Iniciadores previamente desenvolvidos por Tufan et al. (2011) para genes relacionados com a patogenicidade (PR) em trigo e sua sequência.....	42
3 Iniciadores desenhados via Primer3Plus e seus respectivos valores de <i>slope</i>	44
4 Níveis de expressão dos genes via RT-qPCR avaliados por ANOVA e pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	49
5 Proteínas relacionadas com a patogênese em plantas e suas respectivas propriedades.....	50
CAPÍTULO II	
Tabela	
1 Iniciadores desenhados para os <i>contigs</i> diferencialmente expressos, selecionados aleatoriamente, para validação do RNA-Seq e sua sequência.....	77
2 Quantitativo de <i>contigs</i> diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi, ao longo do tempo pós-inoculação com <i>P. triticina</i> , quando da comparação das bibliotecas obtidas via sequenciamento.....	81
3 <i>Contigs</i> diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi e seu quantitativo por processo biológico em função do tempo/horário pós-inoculação/infecção (hai) em comparação ao seu respectivo tempo zero.....	83

	Página
Tabela	
4 <i>Contigs</i> diferencialmente expressos ao longo do tempo (6, 12 e 24 horas após a inoculação) em trigo cv. Toropi em resposta à infecção por <i>P. triticina</i> e seu quantitativo por componente celular em função do tempo/horário pós-inoculação/infecção (hai) em comparação ao seu respectivo tempo zero.....	84
5 <i>Contigs</i> diferencialmente expressos ao longo do tempo (6, 12 e 24 horas após a inoculação) em trigo cv. Toropi em resposta à infecção por <i>P. triticina</i> e seu quantitativo por função molecular em função do tempo/horário pós-inoculação/infecção (hai) em comparação ao seu respectivo tempo zero.....	86
6 <i>Contigs</i> diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi em presença do patógeno sem homologia na cv. Chinese Spring.....	96

LISTA DE FIGURAS

Página

REVISÃO DE LITERATURA

Figura

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Ciclo de vida da ferrugem-da-folha do trigo. Adaptado de Alexopoulos et al. (1996)..... | 13 |
| 2 | Distribuição mundial do patógeno <i>Puccinia triticina</i> . Fonte: Plant Wise..... | 14 |
| 3 | Sinais em resposta à infecção por <i>Puccinia triticina</i> na cultivar suscetível IAC13 (A) e na cultivar com resistência de planta adulta (RPA) Toropi (B). A RPA se caracteriza por poucas uredíneas espalhadas ao longo da superfície foliar com halos esbranquiçados característico de morte celular. Fotos: Alice Casassola..... | 18 |

CAPÍTULO I

Figura

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Coleta das folhas bandeira da cultivar Toropi (A) e confirmação da inoculação da cv. Toropi com ferrugem-da-folha, raça B55 (MDT-MR), 15 dias após a inoculação (B).. | 36 |
| 2 | Amostras de RNA com as subunidades 28S e 18S (setas) no gel de agarose 1%, indicando a integridade das amostras. Última banda do gel à direita representa o marcador de tamanho de fragmentos (100pb)..... | 37 |
| 3 | Perfis de expressão (<i>fold-change</i>) e desvio padrão dos genes estatisticamente diferencialmente expressos por ANOVA e Tukey ($P < 0,05$) na cv. Toropi em resposta à infecção por <i>Puccinia triticina</i> ao longo do tempo pós-inoculação (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 hai). (<i>LTP</i>) proteína precursora de transferência de lipídeo não-específica tipo I, (<i>COMT1</i>) ácido cafeico O-metiltransferase, (<i>WCAB</i>) proteína precursora de ligação a clorofila a/b e (<i>AQP1</i>) aquaporina..... | 46 |
| 4 | Perfis de expressão (<i>fold-change</i>) e desvio padrão dos genes estatisticamente diferencialmente expressos por ANOVA e Tukey ($P < 0,05$) na cv. Toropi em resposta à infecção por <i>Puccinia triticina</i> ao longo do tempo pós-inoculação (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 hai). (<i>PRA2</i>) peroxidase de raiz e (<i>PR1</i> , 2, 4 e 9) proteínas relacionadas à patogênese..... | 47 |

	Página
Figura	
5 Perfis de expressão (<i>fold-change</i>) e desvio padrão dos genes não estatisticamente diferencialmente expressos por ANOVA e Tukey ($P < 0,05$) na cv. Toropi em resposta à infecção por <i>Puccinia triticina</i> ao longo do tempo pós-inoculação (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 hai). (<i>G6DPH</i>) glicose-6-fosfato desidrogenase, (<i>ZIP5</i>) transportador de zinco, (<i>HSP80</i>) proteína de choque de calor 80, (<i>FREX</i>) frutose exohidrolase, (<i>RBR1</i>) proteína relacionada com o retinoblastoma 1 e (PR-10) proteína relacionada à patogênese.....	48

CAPÍTULO II

Figura	
1 Representação esquemática da metodologia Illumina pair end. Esta permite que ambos os lados do RNA sejam sequenciados, sendo que a distância entre os pares é conhecida. Fonte: Illumina website.....	72
2 Contagem de <i>contigs</i> diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi, ao longo do tempo de infecção por <i>P. triticina</i> (0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação), na comparação das bibliotecas inoculada (hpi) <i>versus</i> respectivo controle (cont), geradas via sequenciamento.....	81
3 Contagem de <i>contigs</i> diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi, ao longo do tempo de infecção por <i>P. triticina</i> (0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação), na comparação das bibliotecas inoculada e controle com seu respectivo controle tempo zero.....	82
4 <i>Contigs</i> diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi em resposta à infecção por <i>P. triticina</i> em função do tempo pós-infecção (6, 12 e 24 horas após a inoculação) em comparação ao seu respectivo tempo zero por processos biológicos relacionados com a defesa em trigo.....	85
5 Quantidade de <i>contigs</i> que tiveram aumento (<i>up-regulated</i>) ou diminuição (<i>down-regulated</i>) de expressão em trigo cv. Toropi em resposta à infecção por <i>P. triticina</i> , 24 horas após a inoculação, quando em comparação com seu respectivo tempo zero.....	89

	Página
Figura	
6 Expressão dos <i>contigs</i> diferencialmente expressos (comp106069_c2_seq84, comp102910_c2_seq7, comp111707_c2_seq9, comp107689_c3_seq9) em trigo cv. Toropi ao longo do tempo pós-inoculação com <i>P. triticina</i> , selecionados aleatoriamente e analisados via RT-qPCR, e sua correlação com os resultados de <i>fold-change</i> obtidos via RNA-Seq e bioinformática.....	90
7 Expressão dos <i>contigs</i> diferencialmente expressos (comp112052_c0_seq1, comp105125_c0_seq1, comp101937_c0_seq13) em trigo cv. Toropi ao longo do tempo pós-inoculação com <i>P. triticina</i> , selecionados aleatoriamente e analisados via RT-qPCR, e sua correlação com os resultados de <i>fold-change</i> obtidos via RNA-Seq e bioinformática.....	91

**EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIGO EM RESPOSTA À
INFECÇÃO POR *Puccinia triticina*, AGENTE CAUSAL
DA FERRUGEM-DA-FOLHA**

Alice Casassola¹

RESUMO – A ferrugem-da-folha do trigo é causada pelo fungo *Puccinia triticina* e é uma das principais doenças que acometem anualmente a cultura do trigo na região sul do Brasil. O uso de cultivares com resistência genética durável tem sido essencial para o avanço da cultura. Dessa forma, este trabalho objetivou estudar quais os genes, mecanismos e rotas metabólicas estão envolvidos na resistência de planta adulta (RPA) durável da cultivar Toropi. Na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo), plantas de trigo da cv. Toropi foram cultivadas em câmaras de crescimento com ambiente controlado; foi realizada a inoculação das folhas bandeira com a raça B55 de *P. triticina* (MDT-MR); as folhas bandeiras nos diferentes horários pós-inoculação (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação) foram coletadas e o RNA foi extraído e purificado. As análises de expressão gênica mediante RT-qPCR foram realizadas no National Institute of Agricultural Botany (NIAB), em Cambridge/Inglaterra, durante a realização de doutorado sanduíche. O

¹ Farmacêutica, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

sequenciamento dos tempos pós-inoculação foi realizado pelo The Genome Analysis Centre (TGAC), em Norwich/Inglaterra. As análises de bioinformática foram realizadas em dois estágios, no NIAB durante a realização de doutorado sanduíche, e após no laboratório multiusuário da Embrapa Informática Agropecuária – CNPTIA e na Embrapa Trigo. As análises de expressão utilizando-se iniciadores de genes relacionados com a defesa em trigo mediante RT-qPCR mostraram que mecanismos clássicos de defesa como lignificação, estresse oxidativo, geração de energia, fluxo de água e lipídeos e ciclo celular, foram alterados durante o processo de infecção, bem como pode haver uma modulação do metabolismo da planta pelo patógeno visando beneficiar seu desenvolvimento. No sequenciamento e bioinformática dos tempos 0, 6, 12 e 24 h foram obtidos 463.371 *contigs* dos quais 19.633 foram diferencialmente expressos ao longo do tempo. As principais rotas metabólicas alteradas durante o processo de infecção por ferrugem-da-folha em Toropi foram geração de precursores metabólicos e energia; catabolismo; resposta a estímulos bióticos e abióticos e ao estresse; e transporte. Doze *contigs* de Toropi foram expressos somente na presença do patógeno e não possuem homologia na cv. Chinese Spring, podendo representar genes imprescindíveis no processo de defesa. O entendimento dessa resistência viabiliza seu uso no melhoramento genético do trigo visando à obtenção de cultivares com resistência genética durável.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, RT-qPCR, RNA-Seq, rotas metabólicas, resistência de planta adulta, bioinformática.

**GENE EXPRESSION IN WHEAT IN RESPONSE TO
Puccinia triticina INFECTION, CAUSAL AGENT OF
LEAF RUST**

ABSTRACT - Wheat leaf rust is caused by the fungus *Puccinia triticina* and is one of the major diseases which annually affect the wheat crop in southern Brazil. The use of cultivars with durable genetic resistance has been essential to the progress of the culture. Thus, this study investigated which genes, mechanisms and metabolic pathways are involved in the durable adult plant resistance (APR) of wheat cv. Toropi. At the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Trigo), wheat plants of the cv. Toropi were cultivated in growth chambers with controlled environment; inoculation of flag leaves with B55 race (MDT-MR) of *P. triticina* (MDT-MR) was performed; flag leaves were collected in different time-points post-inoculation (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation) and the RNA was extracted and purified. Analyses of gene expression by RT-qPCR were performed at the National Institute of Agricultural Botany (NIAB) in Cambridge/England, during the completion of doctorate sandwich. The sequencing of the post-inoculation time-points was performed by The Genome Analysis Centre (TGAC), Norwich/England. Analyses of bioinformatics were conducted in two stages, in NIAB during the completion of sandwich doctorate, and after at the multi-user laboratory of Embrapa Informática Agropecuária – CNPTIA and Embrapa Trigo. The expression analysis using gene primers related to the plant defense in wheat by RT-qPCR

showed that classical defense mechanisms as lignification, oxidative stress, energy generation, lipids and water flow and cell cycle were altered during the process of infection and may be pathogen modulated in order to benefit its development. In sequencing and bioinformatics of the time-points 0, 6, 12 and 24 hai were obtained 463.371 contigs of which 19.633 were differentially expressed over time. The main metabolic pathways altered during the process of infection by leaf rust were generation of energy and metabolic precursors; catabolism; response to biotic and abiotic stresses; and transportation. Twelve of Toropi contigs were expressed only in the presence of the pathogen and not have homology in cv. Chinese Spring, may represent essential genes to the defense process. The understanding of this resistance enables their use in genetic improvement of wheat in order to obtain cultivars with durable genetic resistance.

Key words: *Triticum aestivum*, RT-qPCR, RNA-Seq, metabolic pathways, adult plant resistance, bioinformatics.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma cultura responsável por suprir 20% das calorias ingeridas pela população mundial. Seu grão possui carboidratos (60-80%), gorduras, vitaminas B e E, minerais e proteínas (BARBIERI & STUMPF, 2008). Seu genoma é hexaploide ($2n=6x=42$), AABBDD, com um tamanho de 17 Gb e muito complexo, proveniente de *T. urartu* (doador do genoma A), *Aegilops speltoides* (doador do genoma B) e *A. tauschii* (doador do genoma D). Até o momento, 99.386 genes codificantes foram identificados em trigo cv. Chinese Spring (utilizada como modelo para estudos genéticos), com 193.667 variantes adicionais para cada locus gênico (MAYER et al., 2014).

Sua representatividade está relacionada à segurança alimentar mundial e, por isso, as doenças fúngicas, como é o caso das ferrugens do trigo são uma ameaça a essa segurança (CHAVES et al., 2013). A ferrugem-da-folha é causada pelo fungo *Puccinia triticina* Eriks., o qual, por sua vez, possui adaptação ao clima sul-brasileiro. Esse fungo possui alta taxa de especialização fisiológica, o que, conseqüentemente, permite elevada taxa de surgimento de novas raças em até três novas raças fisiológicas do patógeno por ano (BARCELLOS & CHAVES, 2003; CHAVES et al., 2005).

Perdas no rendimento do trigo, causadas por esta doença, foram observadas em diversos países produtores como México e América Latina, com perdas estimadas de 32 e 170 milhões de dólares nos períodos de 2000-2003 e 1996-2003, respectivamente (CHAVES et al., 2013). Essas perdas são devidas à redução da área fotossintetizante, prejudicando o desenvolvimento da planta em

função da restrição de nutrientes e água. Apesar disso, epidemias dessa doença não são mais relatadas em virtude da utilização de cultivares com resistência genética (MARASAS et al., 2004).

A resistência genética à ferrugem-da-folha é conferida pelos genes *Lr*, do inglês “leaf rust”. Esses genes podem estar envolvidos na resistência na fase de plântula ou planta adulta (RPA). Do total de genes descritos, 12 conferem RPA: *Lr12*, *Lr13*, *Lr22a*, *Lr22b*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr46*, *Lr48*, *Lr49*, *Lr67*, *Lr68* e *LrTb* (MCINSTOSH et al., 2013). Essa resistência normalmente é conferida por genes não específicos à raça os quais, por sua vez, não conferem resistência completa, mas parcial. Essa resistência parcial não exerce pressão de seleção no patógeno, visto que permite o crescimento do patógeno em taxas não prejudiciais ao desenvolvimento da cultura (KOLMER, 2013). O gene *Lr34* é o gene mais bem caracterizado que confere resistência de planta adulta não específica à raça à ferrugem-da-folha e um dos mais amplamente utilizados no melhoramento do trigo. Sua sequência consiste de 11.805 pb e 24 éxons, sendo que a diferença entre a resistência e susceptibilidade conferida por este gene está em somente três polimorfismos de base, resultando em dois polimorfismos de aminoácidos (KRATTINGER et al., 2011).

A cv. Frontana foi a primeira lançada pelo melhoramento genético brasileiro, em 1940, que é adaptada ao clima do sul do Brasil. Essa cultivar apresenta resistência à ferrugem-da-folha conferida pelo gene *Lr34*. Esse gene, contudo, não fora transmitido à progênie cv. Toropi, a qual possui resistência durável de planta adulta à ferrugem-da-folha, conferida por outros genes ainda não completamente conhecidos. Essa cultivar fora lançada em 1965 e

ainda apresenta resistência à ferrugem-da-folha, apesar de 50 anos de seu lançamento. Esta resistência tem participação de dois genes recessivos, temporariamente designados como *Trp-1* e *Trp-2*, localizados nos cromossomos 1AS e 4DS, respectivamente (BARCELLOS et al., 2000; BRAMMER, 2000; DA-SILVA et al., 2012), os quais explicam em parte a resistência da cultivar. Apesar do conhecimento da existência de alguns genes de resistência de planta adulta presentes nessa cultivar, ainda não se sabe quais e quantos genes são ativados durante o processo de infecção, nem quais os mecanismos e rotas metabólicas envolvidas. Além da resistência à ferrugem-da-folha, a cultivar apresenta absorção, translocação e distribuição de fósforo aumentadas, tolerância ao alumínio (ESPINDULA et al., 2009) e resistência à fusariose (KOHLI, 1989).

O melhoramento genético visa desenvolver cultivares com características de interesse superiores tanto com relação à caracteres agrônômicos quanto à resistência a doenças. A caracterização bioquímica e fisiológica dos processos metabólicos envolvidos na resistência genética à doenças fornece dados importantes para estudos de identificação e caracterização, auxiliando na identificação de genes envolvidos diretamente nos processos de defesa em plantas (WESP-GUTERRES et al., 2013). Esse sistema de defesa envolve vários níveis. O primeiro é regido por receptores de reconhecimento de padrões (PRR – pattern recognition receptors) que reconhecem estruturas conservadas dos patógenos (PAMPs ou MAMPs – pathogen or microbial-associated molecular patterns) ativando mecanismos de defesa como sinalização celular e biossíntese de proteínas. Esse sistema é conhecido como imunidade guiada por

PAMPs (PTI – *PAMP-Triggered Immunity*) (JONES & DANGL, 2006). O segundo envolve receptores de ligação a nucleotídeos LRRs (NB-LRRs – *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats*) os quais são codificados por genes R. As proteínas NLR limitam a proliferação dos patógenos. Esse sistema é conhecido como imunidade guiada por efetores (ETI – *effector-triggered immunity*) (DANGL et al., 2013). O sistema de defesa em plantas envolve, inclusive, uma complexa rede de transdução de sinais (WALLING, 2000) sendo que as defesas podem ser constitutivas ou induzidas.

O entendimento e identificação dos genes envolvidos no sistema de defesa e da rede de sinalização envolvida permitirão um uso mais efetivo destes genes no melhoramento genético a doenças (MCDOWELL & WOFFENDEN, 2003). Tecnologias modernas, como a transcriptômica, tem se revelado importantes ferramentas no entendimento da resposta de defesa em plantas (AGRAWAL et al., 2005), elucidando genes e rotas metabólicas envolvidas nesse sistema.

A transcriptômica é definida como o estudo do conjunto completo de transcritos produzidos por um genoma sob determinadas circunstâncias ou em células específicas, através de metodologias de alto rendimento. Tem como objetivos principais determinar a estrutura transcricional de genes e/ou quantificar as modificações na expressão gênica de transcritos sob condições específicas (WANG et al., 2009). Como ferramenta de estudo do transcriptoma tem-se o sequenciamento de RNA. Nessa metodologia o RNA alvo é convertido à cDNA, fragmentado, sequenciado e analisado com auxílio de ferramentas de bioinformática visando a identificação direta dos genes envolvidos na situação em estudo. Isso

aumenta grandemente o potencial de descobertas na área genômica (LI et al., 2014), e vem sendo utilizada no estudo da interação planta x patógeno, tanto para investigar o sistema de defesa da planta (GAO et al., 2013) quanto a virulência/avirulência do patógeno (BANSAL et al., 2014). Sendo assim, a transcriptômica (RNA-Seq) em diferentes tempos pós-inoculação permite a identificação de genes, mecanismos e rotas metabólicas envolvidas diretamente nos processos de defesa em plantas, permitindo que esses sejam identificados e estudados no decorrer na infecção.

Portanto, este trabalho visou identificar genes, rotas metabólicas e mecanismos de resistência envolvidos na resistência de planta adulta (RPA) à ferrugem-da-folha em trigo, especificamente na cv. Toropi, permitindo gerar conhecimento sobre esse tipo de resistência e proporcionar sua aplicabilidade no melhoramento genético do trigo.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar a expressão de genes específicos relacionados com o processo de defesa em trigo, em diferentes tempos pós-inoculação na cv. Toropi, e verificar qual sua relação com a resistência de planta adulta e resistência pré-haustorial;
- b) Identificar genes e rotas metabólicas envolvidos no processo de defesa à ferrugem-da-folha na cv. Toropi em diferentes tempos pós-inoculação e verificar qual sua relação no tempo pós-infecção;

- c) Identificar quais transcritos são expressos na cv. Toropi, somente na condição de presença do patógeno, e quais suas funções no processo de defesa;
- d) Identificar quais transcritos estão presentes na cv. Toropi mas ausentes na cv. Chinese Spring, visando identificar genes exclusivos da cv. Toropi.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O trigo é uma cultura de ciclo anual e, juntamente com o arroz (*Oryza sativa*), representam as duas principais culturas para consumo humano. Os maiores produtores mundiais de trigo são China, Índia, Estados Unidos e Rússia com produção aproximada de 121, 94, 59 e 44 milhões de toneladas, respectivamente, para a safra 2012/2013 (FAOSTAT, 2014).

A produção nacional desse cereal, na safra 2014, foi de 5,9 mil toneladas (CONAB, 2014). A área plantada foi de 2,7 mil hectares, sendo 1,3 e 1,1 mil hectares no Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente, representando 89% da produção brasileira.

Das doenças que acometem o trigo estão as fúngicas, bacterianas e as virais. As condições climáticas de altas temperaturas e precipitações pluviais frequentes favorecem o desenvolvimento de doenças, principalmente as fúngicas. Essas condições são frequente na região sul do Brasil, principalmente durante a época de plantio e desenvolvimento da cultura. As principais doenças fúngicas do trigo, nessa região, são a ferrugem-da-folha, o oídio e a giberela (FERNANDES & PICININI, 1999; LAU et al., 2011).

As ferrugens são causadas pelo gênero *Puccinia*. A ferrugem-da-folha é causada por *P. triticina*, a do colmo por *P. graminis* f.sp. *tritici* e a amarela por *P. striiformis*. Os sintomas diferem entre si basicamente pelo formato, coloração e localização das pústulas. A ferrugem-da-folha apresenta pústulas alaranjadas a marrom e ocorre geralmente na superfície superior das folhas. A ferrugem-do-colmo apresenta pústulas marrom avermelhadas e que

podem ocorrer em ambas as superfícies das folhas, colmo e espigas. A ferrugem-amarela apresenta pústulas amarelas a laranjadas e se apresentam em faixas (listras) nas folhas (PRESCOTT et al., 1986).

As ferrugens possuem cinco estágios distintos: teliosporos, basidiosporos e uredíniosporos no hospedeiro e picniosporos e aeciosporos nos hospedeiros alternativos (Figura 1). Os uredíniosporos têm a capacidade de se formarem continuamente no hospedeiro (uma nova geração a cada 10-14 dias) e, por isso, são capazes de disseminar a doença na lavoura (KOLMER, 2013).

A ferrugem-da-folha é amplamente distribuída pelo mundo (Figura 2). As perdas ocasionadas por essa doença são devidas à infecção nas folhas, em especial na folha bandeira, reduzindo o processo de fotossíntese. Essas perdas são graduais dependendo do estágio de desenvolvimento das plantas (Tabela 1), sendo que se a infecção for de forma intensa e ocorrer antes da floração e enchimento dos grãos as perdas são mais significativas (MARSALIS & GOLDBERG, 2006), podendo alcançar 80%.

2.1 Resistência genética

A resistência genética é a capacidade do hospedeiro em impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno (PARLEVLIET, 1997). Essa resistência pode ter várias classificações: 1) específica à raça, na qual está envolvida a reação de hipersensibilidade; 2) imunidade ou resistência de não hospedeiro; 3) resistência em fase de plântula; e 4) resistência de planta adulta (RPA) (DYCK & KERBER, 1985).

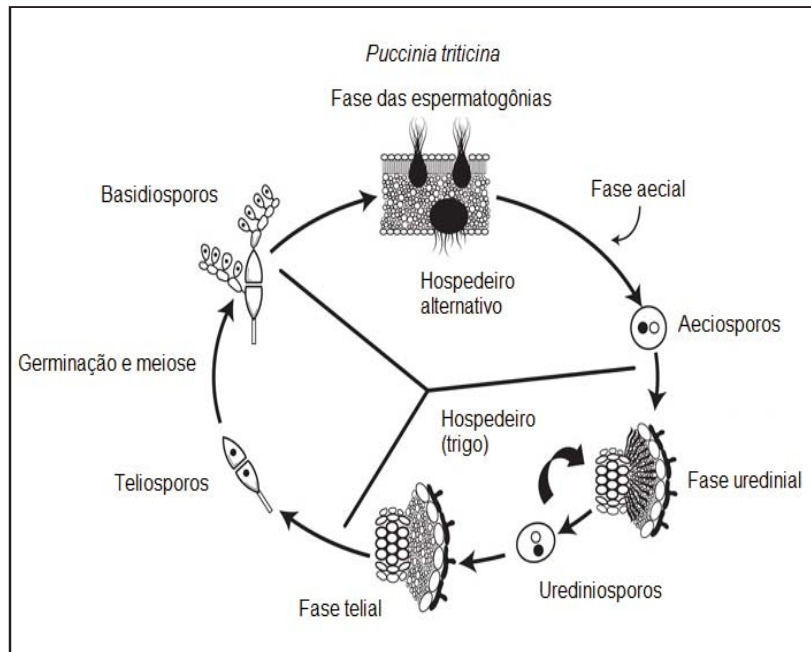


Figura 1 – Ciclo de vida da ferrugem-da-folha do trigo. Adaptado de Alexopoulos et al. (1996).

Tabela 1 – Perda de rendimento de grãos de trigo em relação à severidade na folha em diferentes estádios de desenvolvimento da planta

Estádio	Severidade (%)				
	10	25	40	65	100
	Perda de rendimento (%)				
Floração	10	15	20	30	35
Grão Leitoso	2	5	8	14	20
Grão Mole	1	3	4	7	10
Grão Duro	1	1	1	3	5

Adaptado de Hunger, B. and K. Jackson. Foliar Fungicides and Wheat Production in Oklahoma. Oklahoma Cooperative Extension Service. Oklahoma State University.

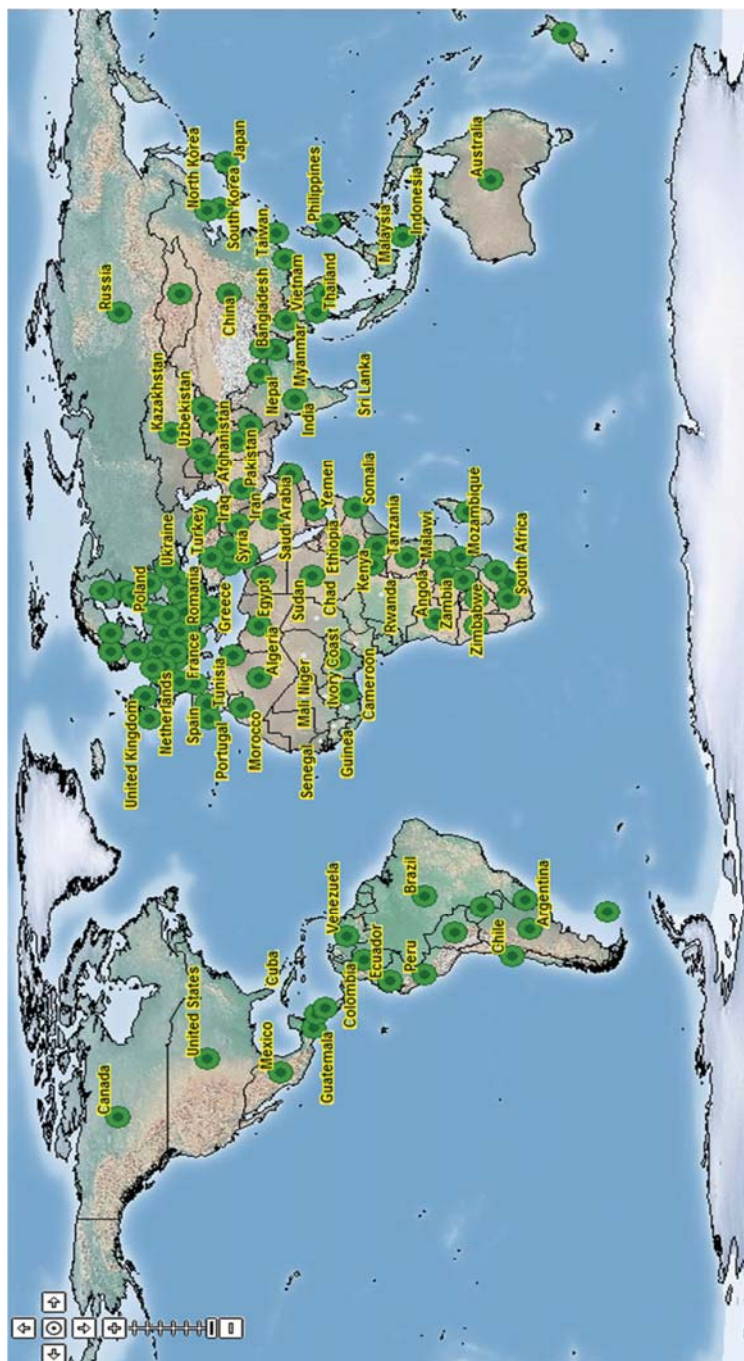


Figura 2 – Distribuição mundial do patógeno *Puccinia triticina*. Fonte: Plant Wise.

A RPA é conferida por genes não efetivos em fase de plântula, mas se tornam efetivos nos estágios de planta adulta, estágio este onde a taxa de desenvolvimento do fungo atinge seu ápice (SAWHNEY et al., 1996).

Existem outros tipos de classificações da resistência como: resistência vertical monogênica ou oligogênica, quando um ou poucos genes raça-específicos são responsáveis pela resistência a um determinado patógeno, esse tipo de interação pode ser conhecida como resistência do tipo maior ou não uniforme; ou horizontal poligênica, quando evolui a participação de diversos genes não específicos à raça, mas de efeito menor (KENENI et al., 2012).

A resistência de planta adulta é normalmente associada à resistência durável. Contudo, nem todos os genes de resistência de planta adulta conferem esta característica. A resistência genética durável, ou seja, que permanece efetiva durante um longo período de tempo em uma ampla área de cultivo (JOHNSON, 1984), geralmente é conferida por genes que conferem resistência de planta adulta associados com outros genes menores que permitem um desenvolvimento lento da doença (*slow rust resistance*). Genótipos que apresentam resistência de planta adulta do tipo *slow rust resistance* aumentam o período latente e de incubação do patógeno, apresentam uredíneas pequenas, baixa receptividade ao patógeno, baixa produção de esporos (componentes *slow rust*) reduzindo, assim, o percentual de severidade da infecção, apesar de apresentarem uma reação compatível de interação (OHM & SHANER, 1976; WILCOXSON, 1981; RUBIALES & NIKS, 1995; SAREEN et al., 2012).

Os genes que conferem a resistência *slow rust* geralmente estão agrupados em clusters ou QTLs (Quantitative Trait Loci). O cluster *Lr67/Yr46/Sr55*, por exemplo, confere resistência *slow rust* similar ao cluster *Lr34/Yr18*, conhecido por ser efetivo contra diversas espécies de patógenos, inclusive à ferrugem-da-folha (ROELFS, 1988; KOLMER, 1992; HIEBERT et al., 2010a; HERRERA-FOESSEL et al., 2011). A associação de genes também pode ser realizada via piramidização gênica. Essa associação é conhecida por conferir uma resistência mais efetiva contra patógenos e visa transferir múltiplos genes desejáveis de vários parentais para um único genótipo, sendo que este possuirá todos os genes de interesse (YE & SMITH, 2008).

As respostas de defesa em plantas são controladas no tempo e no espaço a partir de uma complexa rede de expressão de genes, onde a sensibilidade à temperatura, interações intergênicas aditivas ou inibitórias, efeito *background*, alelismo e a proximidade entre os genes/clusters gênicos afetam a expressão da resistência ou suscetibilidade (DYCK & KERBER, 1985).

2.2 Resistência de planta adulta em Toropi

Toropi é uma cultivar de trigo lançada em 1965 e que, após cinquenta anos, ainda apresenta resistência de planta adulta (Figura 3) à ferrugem-da-folha. A cultivar foi desenvolvida a partir do cruzamento Frontana/Quaderna A//Petiblanco 8, na Estação Experimental de Júlio de Castilhos, da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul.

O gene *Lr34*, considerado como um dos principais genes que confere RPA, está presente no parental Frontana, mas não está presente na progênie Toropi. Contudo, Barcellos et al. (2000) relataram que a cv. Toropi possui dois genes recessivos, designados temporariamente de *Trp-1* e *Trp-2*, estritamente do tipo de planta adulta, responsáveis por essa resistência. Brammer (2000) e Da-Silva et al. (2012) reportaram que esses genes foram mapeados por linhas monossômicas de trigo e confirmados por marcadores microssatélites, e estão localizados nos cromossomos 1AS e 4DS, respectivamente. Essa cultivar, além de apresentar RPA, apresenta outras características agronômicas importantes como absorção, translocação e distribuição de fósforo aumentadas, tolerância ao alumínio (ESPINDULA et al., 2009) e resistência à fusariose (KOHLI, 1989).

Wesp-Guterres et al. (2013), mediante análises de histopatologia, relataram que o sistema de defesa na cv. Toropi envolve os dois estágios, pré e pós-haustorial, ou seja, se manifesta tanto antes quanto depois da formação dos haustórios (24 hai), reduzindo a taxa de formação dos apressórios e, conseqüentemente, das demais estruturas fúngicas. Os autores descreveram que a resistência pré-haustorial é essencial no retardo da doença, sendo que 120 hai nenhuma célula mãe haustorial e nenhum haustório foram observados enquanto que na cultivar resistente RL6010 *Lr9* (resistência específica à raça), a taxa de formação de haustórios foi de 93%. Na cv. Toropi, a produção de compostos autofluorescentes aparecem em 100% das células associadas com a colonização, indicando estarem envolvidos neste processo. A morte celular tardia

também é uma característica do processo de defesa da cultivar observada pelos autores.

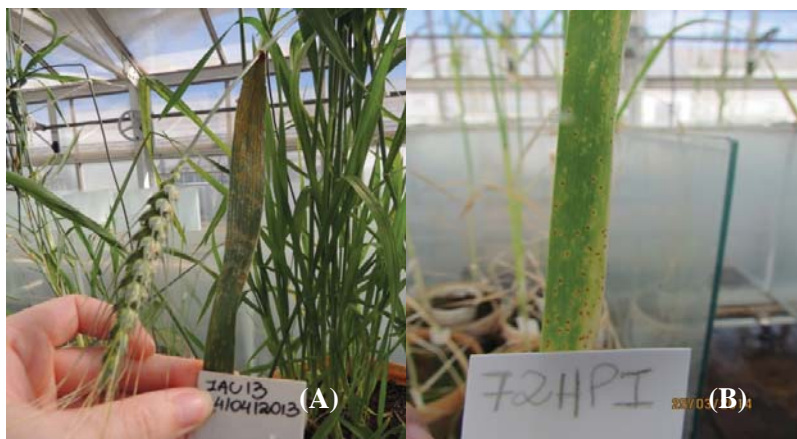


Figura 3 – Sinais em resposta à infecção por *Puccinia triticina* na cultivar suscetível IAC13 (A) e na cultivar com resistência de planta adulta (RPA) Toropi (B). A RPA se caracteriza por poucas uredíneas espalhadas ao longo da superfície foliar com halos esbranquiçados característico de morte celular. Fotos: Alice Casassola.

Da Silva (2006) pela análise da biblioteca obtida por hibridização subtrativa suprimida da cultivar infectada com ferrugem-da-folha, sequenciou duzentos clones dos quais 69% possuem função conhecida. O autor identificou três sequências com potencial papel no reconhecimento primário do patógeno *P. triticina* em trigo, com homologia com genes que codificam para proteínas com função de transdução de sinal, sendo assim fortes candidatas a serem partes de genes de resistência presentes na cv. Toropi, mas que ainda necessitam ser melhor estudados e entendidos para o fechamento do processo.

2.3 Sistemas ou mecanismos de defesa em plantas

O sistema de defesa em plantas envolve defesas inatas e adquiridas e está dividido em dois grupos: imunidade guiada por padrões moleculares associados a microorganismos (*microbial-associated molecular-patterns-triggered immunity* - MTI) e imunidade guiada por efetores (*effector-triggered immunity* - ETI). A MTI confere resistência basal, enquanto que o ETI confere resistência durável associada à resposta de hipersensibilidade (MUTHAMILARASAN & PRASAD, 2013). A resistência inata é ativada por estruturas conservadas dos microorganismos e/ou efetores que são reconhecidos pelos receptores celulares do hospedeiro desencadeando uma cascata de respostas de defesa (SHAMRAI, 2014). A imunidade adquirida conhecida como resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance* – SAR) é basicamente ativada pelo aumento da concentração de ácido salicílico o qual, por sua vez, ativa diversos genes de defesa (RYALS et al., 1994).

Além dos mecanismos já citados, as plantas possuem defesas estruturais como barreiras físicas, as quais têm intuito de evitar a penetração do microorganismo. Dentre as defesas estruturais têm-se as pectinas, ligninas, cutinas e suberinas, as quais, por sua vez, estão envolvidas no reforço da parede celular, depósito de calose e formação da papila; os tricomas e os estômatos (FREEMAN & BEATTIE, 2008).

A infecção por fungos se inicia pela entrada do patógeno na célula, o que requer a superação das barreiras físicas para penetração. Essa penetração é realizada com auxílio de enzimas

(Tabela 2) que além de facilitarem a penetração auxiliam na aquisição de nutrientes (CHOI et al., 2013).

Após penetração e para o estabelecimento do patógeno, este precisa superar o sistema de defesa químico: terpenóides, fenóis, alcalóides, proteínas e enzimas de defesa. Os genes de resistência (*R*) mediam o reconhecimento de componentes específicos do patógeno (produtos dos genes *Avr*) (TAYLOR, 1998), induzindo a produção de desses compostos de defesa.

As proteínas de defesa atuam na degradação das estruturas fúngicas do patógeno evitando seu desenvolvimento. As proteínas relacionadas com a defesa (PR) são um exemplo de substâncias que degradam a parede celular fúngica e atuam no combate ao patógeno. As quitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), glucanases (PR-2) e peroxidases (PR-9) degradam quitinas e glucanas, componentes estruturais da parede celular do fungo, e as peroxidases atuam na formação de espécies reativas de oxigênio (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). A “explosão oxidativa” ocorre por meio de dois sistemas: sistema oxidativo NADPH (NADP é um fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina acceptor de elétrons que se reduz em NADPH) e geração de peróxido de hidrogênio dependente de pH via peroxidases extracelular (WOJTASZEK, 1997). As espécies reativas de oxigênio são altamente reativas podendo atuar diretamente no patógeno (eliminando-o), induzir a resposta de hipersensibilidade e morte celular no hospedeiro e também podem induzir outros mecanismos de defesa, atuando como sinalizadores (GECHEV et al., 2006).

Tabela 2 – Enzimas fúngicas responsáveis pela degradação da parede celular de plantas

Substrato	Família Gênica
Celulose	Celobiohidrolase
	Alfa-glucosidase
	Alfa-ramnosidase
	Pectatoliase
	Pectinoliase
	Poligalacturonase
Pectina	Ramnogalacturonanoliase
	Beta-D-galactosidase
	Endoarabinase
	Pectinometilesterase
	Ramnogalacturonan acetilesterase
Xilose	Endoxilanase
	Alfa-glucuronidase
Manose	Alfa-mannosidase
	Beta-endo-mannnanase
	Beta-mannosidase

Adaptado de Choi et al. (2013).

A constante evolução dos fungos, com o surgimento frequente de novas raças, exige o desenvolvimento de cultivares com novas combinações gênicas ou com novos genes de resistência. Para isso, esforços do melhoramento genético são requeridos e o uso de ferramentas de estudos genéticos (genômica, transcriptômica e proteômica) auxilia na elucidação dos processos e rotas envolvidas no sistema de defesa. A identificação de genes envolvidos na resistência parcial, que é ideal, pois não exerce pressão de seleção no patógeno, é difícil. Ballini et al. (2013) relataram que são três as razões dessas dificuldades: (1) a análise quantitativa dos sintomas requer experiência e muito trabalho, pois essa reação é difícil de ser observada; (2) a identificação de QTLs requer populações de tamanhos elevados; (3) essa resistência requer específicas

combinações de alelos; e por isso o uso de ferramentas biotecnológicas auxiliam neste processo. Os autores relatam, inclusive, que a partir do conhecimento básico gerado via estudos genéticos em uma espécie, este é transferível para outra, em função dos ortólogos funcionais e homólogos, facilitando futuros estudos e ressaltando a importância dessa tecnologia.

Arabidopsis thaliana (CONSORTIUM, 2011) é a planta que tem o sistema de defesa melhor documentado. Esse sistema serve de base para muitos estudos com trigo, via inferência da função de genes. O sequenciamento do trigo, cv. Chinese Spring (EMBL/Genbank SRA ERP000319 – Brenchley et al., 2012), já está disponível. Contudo, ainda não se tem a anotação funcional de todos os genes, e de muitos não se conhece a função e envolvimento no sistema de defesa. O gene *Lr34* tem sido o componente estratégico mais utilizado no melhoramento genético do trigo, considerando que confere resistência não somente à ferrugem-da-folha, mas também à ferrugem amarela, oídio (SPIELMEYER et al., 2005), ferrugem do colmo (HIEBERT et al., 2010b) e BYDV (*barley yellow dwarf virus*) (SINGH, 1993). Esse gene foi descrito por Dyck & Samborski (1979), mas teve sua sequência e função conhecidas, transportador ABC (adenosine triphosphate-binding cassette), somente trinta anos após, por Krattinger et al. (2009), os quais utilizaram marcadores moleculares para isolar a sequência do gene. Esse trabalho viabilizou o estudo do sistema de defesa envolvendo este gene, via homologia e genes ortólogos, em outras espécies de gramíneas como arroz, sorgo e *Aegilops tauschii* (KRATTINGER et al., 2011; 2013).

2.4 Expressão gênica

Expressão gênica se refere à ativação do gene e produção de seu produto. A regulação dessa expressão pode se dar na frequência da transcrição via proteínas reguladoras as quais afetam a eficiência/atividade da RNA polimerase; na velocidade de processamento do splicing das moléculas de RNA imaturo; através do acesso ou eficiência dos canais de transporte que controlam a saída do RNA maduro; através da atividade das ribonucleases que degradam o RNA que sai do núcleo; e aceleração ou desaceleração do processo de tradução através da disponibilidade dos componentes necessários ao processamento (EVERT & EICHHORN, 2013).

Durante o processo de infecção, genes podem ser ativados ou inibidos. Em trigo, em resposta à ferrugem-da-folha, Fofana et al. (2007) verificaram que 192 genes tiveram alteração significativa durante esta interação, tais como os relacionados à fotossíntese, produção de espécies reativas de oxigênio, ubiquitinação, transdução de sinal e rota fenilpropanóide, indicando que diversas rotas metabólicas são alteradas durante a infecção.

O estudo da expressão dos genes durante o processo de infecção permite identificar quais as rotas metabólicas são alteradas e, conseqüentemente, quais estão envolvidas no processo de defesa. Esse estudo pode ser realizado, principalmente, via microarray, PCR quantitativo (RT-qPCR) e/ou sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

Apesar do conhecimento da existência de alguns genes de resistência de planta adulta presentes na cv. Toropi, como *Trp-1* e *Trp-2*, não se sabe quais e quantos genes são ativados durante a infecção, nem quais os mecanismos envolvidos. O esclarecimento

desses mecanismos pode gerar informações de extrema importância para o desenvolvimento de novas cultivares de trigo com resistência durável à ferrugem-da-folha, o que justifica a intensificação dos estudos nessa área utilizando-se metodologias recentes como o RNA-Seq visando, por fim, a viabilização dessas informações para o melhoramento genético da cultura do trigo.

2.4.1 RNA-Seq e RT-qPCR

A RT-qPCR (*Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction*) mensura a quantidade da sequência alvo pela amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) que é correspondente ao aumento da emissão de fluorescência durante cada ciclo (SMITH & OSBORN, 2008). Essa metodologia pode ser utilizada no estudo de genes específicos (GENNARO et al., 2009) ou no estudo da expressão de diversos genes, visando entender rotas e processos metabólicos como o processo de defesa (FRAAIJE et al., 2001). O uso dessa metodologia, isoladamente no estudo da expressão gênica, requer que se conheça a sequência de interesse. Caso contrário, requer análises prévias para se obtê-las, como é o caso do uso do sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

O RNA-seq é uma metodologia desenvolvida para analisar o perfil de transcriptoma. O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos em uma célula os quais variam dependendo do estágio fenológico ou condição ambiental ou fisiológica. O RNA-Seq realizado a partir de amostras de uma condição específica permite entender quais os mecanismos e genes estão envolvidos nessa condição.

No caso do trigo, que possui um genoma de 17 Gb, foram identificados 94.000-95.000 genes e 132.000 polimorfismos de base única (SNP) (BRENCHLEY et al., 2012). Singh et al. (2014), por exemplo, obtiveram 55 K de transcritos de trigo em três estádios de desenvolvimento da semente, sendo identificadas 236 sequências diferencialmente expressas e 110 relacionadas com a qualidade para produção de “chapatti”, que é um pão típico da culinária indo-portuguesa. Dessas sequências, os autores observaram que não somente genes sabidamente relacionados com a qualidade foram expressos diferencialmente, mas também genes relacionados com a função celular e molecular, ressaltando a complexidade da cascata de sinais e genes envolvidos na condição em estudo.

Da mesma forma, Zhang et al. (2014), estudando a interação de trigo com ferrugem-amarela e oídio, verificaram uma alteração na transcrição de 23,8% dos transcritos totais de trigo. O oídio alterou de forma mais significativa a expressão gênica da linhagem em comparação à ferrugem-amarela. Do mesmo modo, Hulbert et al. (2007) confirmaram a complexidade da resposta de trigo à ferrugem-da-folha via GeneChip array, na qual verificaram que 1.610 genes tiveram expressão alterada na cv. Thatcher em resposta a essa infecção.

Embora a tecnologia de RNA-Seq seja utilizada em pesquisas, existem algumas limitações tais como: limitações técnicas, como programas e recursos logísticos e humanos capazes de armazenar e processar o quantitativo de dados gerados via sequenciamento (CASASSOLA et al., 2013), e de informação disponível, considerando que somente o rascunho do genoma do trigo

está disponível bem como seu tamanho, poliploidia (80% do seu genoma é repetitivo) e complexidade dificultam as análises. Visando diminuir essas limitações a associação com a RT-qPCR objetiva confirmar/validar a expressão estimada pelo RNA-Seq (LORAINE et al., 2013; BRODERICK et al., 2014).

CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA DE PLANTA ADULTA EM TRIGO - CULTIVAR TOROPI

Alice Casassola¹

RESUMO – Toropi é uma cultivar de trigo que apresenta resistência pré-haustorial e de planta adulta à ferrugem-da-folha. Essa doença acomete as lavouras de trigo do sul do Brasil, pois as condições climáticas da região favorecem seu desenvolvimento, sendo a resistência genética a alternativa mais eficiente de controle da doença. A resistência genética de Toropi apesar de confirmada, ainda não está totalmente compreendida. Sabe-se que esta começa a se expressar em estágio de planta adulta e antes da formação do haustório pelo patógeno que ocorre 24 horas após a inoculação (hai). O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de 15 genes relacionados com o processo de defesa em trigo via PCR quantitativo (RT-qPCR) e verificar qual o seu perfil de expressão ao longo do tempo pós-infecção. Na sede da Embrapa Trigo, as folhas bandeiras de plantas adultas (fase de espigamento e anterior à antese) da cultivar foram inoculadas com solução oleosa contendo urediniósporos do fungo, raça B55 (MDT-MR), e coletadas 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 hai. As plantas controles foram inoculadas somente com óleo visando subtrair

¹ Farmacêutica, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

o efeito do óleo nos resultados. O RNA foi extraído, purificado e encaminhado ao National Institute of Agricultural Botany, na Inglaterra, para realização das análises de genes relacionados com o processo de defesa em trigo. Os genes foram selecionados a partir de resultados de microarranjos da interação trigo com oídio, ferrugem amarela e brusone e os iniciadores de RT-qPCR foram desenhados com auxílio da ferramenta Primer3Plus versão 2.3.5. Os resultados de RT-qPCR foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e ao teste de Tukey 5%. Nove genes foram estatisticamente diferencialmente expressos: *LTP*, *COMT1*, *WCAB*, *AQP1*, *PRA2*, PR-1, PR-2, PR-4 e PR-9. Os picos de expressão variaram ao longo do tempo sendo que os genes *LTP*, *WCAB*, *AQP1*, *PRA2*, PR-2 e PR-9 parecem estar envolvidos na resistência pré-haustorial da cultivar, pois tiveram pico anterior a 24 hai. Os genes *COMT1*, PR-1 e PR-4 parecem estar envolvidos na resistência pós-haustorial de Toropi, pois apresentaram pico de expressão posterior a 24 hai. Entretanto, *G6DPH*, *ZIP5*, *HSP80*, *FREX*, *RBRI* e PR-10 apresentaram expressão constante ao longo do tempo. Esses perfis de expressão elucidam em partes a resistência de planta adulta pré-haustorial da cultivar demonstrando que o reforço da parede celular, destruição das estruturas fúngica, geração de energia e absorção de água são defesas pré-haustoriais e conforme evidenciado em estudos anteriores é essa resistência que detém quase que completamente o desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: *Puccinia triticina*, *Triticum aestivum* L., pré-haustorial, RT-qPCR.

**CHANGES IN GENE EXPRESSION PROFILES AS THEY
RELATE TO THE ADULT PLANT LEAF RUST RESISTANCE
IN THE WHEAT CULTIVAR TOROPI**

ABSTRACT – Toropi is a wheat cultivar that presents pre-haustorial adult plant resistance to leaf rust. Southern Brazil environment conditions are very conducive to wheat leaf rust, and up to four sprays are necessary to control it depending on the year. Thus genetic resistance is the most efficient alternative to control this disease. The genetic resistance of Toropi despite confirmed, is not yet fully understood. It is known that its expression occurs in adult plant stage and is triggered before the formation of the haustoria by the pathogen, 24 hours after inoculation (hai). The objective of this study was to evaluate the expression of 15 defense-related genes in wheat via quantitative PCR (RT-qPCR) and uncover their expression profile throughout the post-infection time. At Embrapa Trigo, adult plants flags leaves (silking stage before the anthesis) of the cultivar were inoculated with oily suspension containing urediniospores of the fungus, B55 race (MDT-MR), and collected 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hai. The control plants were inoculated only with oil in order to subtract the effect of the oil into results. The RNA were extracted, purified and forwarded to the National Institute of Agricultural Botany, in England, to carry out the analysis regarding defense genes in wheat. Genes were selected based on results of the microarray interaction between wheat with powdery mildew, yellow rust and blast. RT-qPCR primers were designed with Primer3Plus tool version 2.3.5. RT-qPCR results were submitted to analysis of variance

(ANOVA) and Tukey test 5%. Nine genes were statistically differentially expressed: *LTP*, *COMT1*, *WCAB*, *AQP1*, *PRA2*, PR-1, PR-2, PR-4 and PR-9. The peaks of expression varied over time. *LTP*, *WCAB*, *AQP1*, *PRA2*, PR-2 and PR-9 appear to be involved in the pre-haustorial resistance of the cultivar, as had earlier peak (before 24 hai). Genes *COMT1*, PR-1 and PR-4 appear to be involved in post-haustorial resistance, as presented later peak expression (post 24 hai). On the other hand, *G6DPH*, *ZIP5*, *HSP80*, *FREX*, *RBR1* and PR-10 had constant expression over time. These expression profiles elucidate in parts the pre-haustorial adult plant resistance of the cultivar, showing that the strengthening of the cell wall, destruction of fungal structures, energy generation and water absorption are pre-haustorial defenses and, as evidenced in previous studies, these defenses mechanisms are responsible for efficiently hampering the disease development.

Keywords: *Puccinia triticina*, *Triticum aestivum* L., pre-haustorial, RT-qPCR.

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem-da-folha do trigo é uma doença fúngica causada pelo fungo *Puccinia triticina*. A doença acomete a triticultura nacional, em especial, a região sul do Brasil e é um desafio em todo o Cone Sul da América do Sul. Com o uso de cultivares suscetíveis, sem aplicação de fungicidas, mais de 50% de perdas são observadas (GERMÁN et al., 2011). Durante seu ciclo, os urediniosporos do patógeno germinam na superfície foliar, formando um apressório sob o estômato aproximadamente três horas após a inoculação (hai), e a formação da vesícula sub-estomatal ocorre aproximadamente seis hai (HU & RIJKENBERG, 1998). A formação da célula-mãe de haustório ocorre aproximadamente 12 hai e a formação do haustório 24 hai (HU & RIJKENBERG, 1998; ZHANG & DICKINSON, 2001). Os urediniosporos têm a capacidade de se formarem continuamente no hospedeiro (uma nova geração a cada 10-14 dias) e, por isso, são capazes de disseminar a doença na lavoura (KOLMER, 2013).

Em geral, o controle dessa doença é realizado mediante aplicação de produtos químicos. Contudo, esses produtos podem representar um risco à saúde humana, animal e ao meio ambiente. A utilização de cultivares com resistência genética controlam a doença na lavoura e diminuem a necessidade de aplicação de fungicidas. A resistência genética, por sua vez, é dependente da interação planta-patógeno, temperatura, estágio de desenvolvimento da planta e da interação entre os genes de resistência e os efetores (KOLMER, 1996).

Duas classes de genes de resistência são utilizadas no melhoramento genético do trigo: os genes R e APR (*adult plant resistance*). Os genes R normalmente são raça específicos, atuam durante todo o ciclo da planta e codificam receptores NB-LRR (nucleotide binding leucine rich repeat). Os genes APR são efetivos somente no estágio de planta adulta, codificam uma gama de proteínas heterogêneas e, em geral, conferem uma resistência do tipo parcial (ELLIS et al., 2014). A resistência de planta adulta (RPA) é não específica à raça e é caracterizada por múltiplos genes de resistência de menor efeito que permitem o desenvolvimento da doença, mas em níveis não prejudiciais ao rendimento da cultura (VALE et al., 2001).

O uso desses genes no melhoramento genético, contudo, representam um desafio e requer esforços dos programas de melhoramento, considerando que sua identificação e isolamento é uma tarefa difícil (BALLINI et al., 2013). Dentre os genes que conferem RPA, o mais utilizado e estudado é o *Lr34*, contudo ainda não se sabe o que este gene transporta e como ele controla a doença. Sabe-se que ele é um transportador ABC (KRATTINGER et al, 2009) que confere resistência à ferrugem-da-folha, ferrugem-amarela, oídio (SPIELMEYER et al., 2005), ferrugem-do-colmo (HIEBERT et al., 2010b) e BYDV (*barley yellow dwarf virus*) (SINGH, 1993).

Toropi é uma cultivar de trigo que apresenta RPA durável à ferrugem-da-folha, mas não apresenta o gene *Lr34*, presente em seu parental Frontana. Em estágio de plântula essa cultivar é suscetível, contudo o aparecimento da doença coincide com o estágio de planta adulta da cultura (início da antese – estágio 61 da escala de Zadoks et al. (1974)), o que demonstra a importância dessa resistência

para a tricultura nacional. Os mecanismos envolvidos na resistência de Toropi não são completamente conhecidos, apesar de trabalhos anteriores descreverem a presença de dois genes recessivos, denominados temporariamente de *Trp-1* e *Trp-2*, nos cromossomos 1A e 4D (BARCELLOS et al., 2000; BRAMMER, 2000; DA-SILVA et al., 2012) e da importância da resistência pré-haustorial na cultivar. A resistência observada em Toropi é pré e pós-haustorial e é capaz de manter a severidade baixa da doença mesmo em alta pressão de inóculo. Contudo, é observada taxa quase nula de formação de haustórios, o que ressalta a atuação dos mecanismos de defesa pré-haustoriais (WESP-GUETERRES et al., 2013).

O sistema de defesa em plantas é complexo e envolve componentes estruturais, químicos e proteínas de defesa. Esses componentes detectam a presença do patógeno no intuito de detê-los antes de causarem danos (FREEMAN & BEATTIE, 2008). As defesas vegetais podem ser consideradas passivas ou ativas. Como passivas tem-se as barreiras físicas (cera, cutícula, parede celular, estômatos e lenticelas) e químicas (privação de nutrientes, pH, fitoalexinas e defensinas). Como ativas tem-se as rápidas (função da membrana, explosão oxidativa, reforço da parede celular, morte celular por hipersensibilidade e acúmulo de fitoalexinas) e lentas (proteínas relacionadas à patogênese, resistência sistêmica adquirida e contenção do patógeno) (GUEST & BROWN, 1997). Em Toropi, apesar de estudos prévios com a cultivar ainda não se sabe quais genes, mecanismos e rotas metabólicas estão envolvidos na resistência genética observada.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar genes e rotas metabólicas envolvidas na resistência pré-haustorial à ferrugem-da-folha na cultivar Toropi em diferentes tempos pós-inoculação via RT-qPCR utilizando-se 15 genes relacionados com o processo de defesa em trigo. Esses resultados visam gerar conhecimento para guiar futuros estudos sobre a resistência de planta adulta durável à ferrugem-da-folha do trigo e entender a resistência pré-haustorial da cultivar, viabilizando sua utilização do melhoramento genético do trigo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Plantio

O plantio da cv. Toropi foi realizado em baldes contendo solo, substrato e vermiculita (1:1:1). Foram cultivadas seis plantas por balde, 12 plantas por horário, para as amostras inoculadas, e seis plantas por horário para as amostras controle, num total de 24 baldes. As plantas foram mantidas em câmara-de-crescimento, na Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS, com condições assépticas, fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro e umidade de 80%. A inoculação foi realizada mediante aspersão na folha bandeira de plantas adultas na fase de espigamento e anterior à antese, com uredíniosporos da raça B55 (MDT-MR; LONG & KOLMER, 1989; CHAVES & BARCELLOS, 2006) de *P. triticina*, suspensos em óleo mineral. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara escura e úmida por 24 horas. Posteriormente, os baldes foram transferidos para câmara-de-crescimento, visando a confirmação da eficiência da inoculação a ser verificada, em torno de 15 dias após a inoculação (Figura 1). As folhas-bandeira das plantas inoculadas e das plantas controle (sem inóculo) foram coletadas nos horários de 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (Figura 1) e armazenadas em tubos plásticos (Falcon de 50 mL), os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos em *freezer* –80°C, até o momento da extração do RNA.

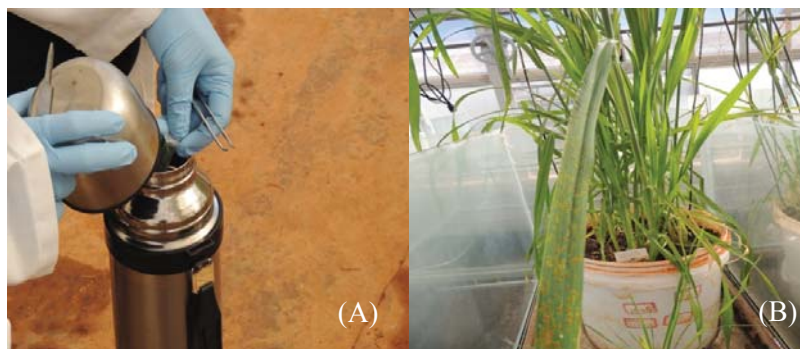


Figura 1 – Coleta das folhas bandeira da cultivar Toropi (A) e confirmação da inoculação da cv. Toropi com ferrugem-da-folha, raça B55 (MDT-MR), 15 dias após a inoculação (B).

2.2 Extração do RNA e teste de qualidade das amostras

O RNA foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini RNA kit (Qiagen) e a limpeza de DNA genômico contaminante foi realizada utilizando o Turbo DNA-free™ kit (Ambion), ambos de acordo com o protocolo dos fabricantes. A qualidade do RNA foi realizada em Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) e a quantificação em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). O RNA foi precipitado com 1/10 do volume com acetato de sódio 3M pH 5.2 e 2-3x do volume de etanol PA, colocado imediatamente em gelo seco e enviado ao National Institute of Agricultural Botany (NIAB).

No NIAB, as amostras foram ressuspensas em água utilizando-se o seguinte procedimento: as amostras/tubos foram centrifugados a 13.800 g por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se ao precipitado 50 µL de etanol 70% e novamente centrifugou-se a 13.800 g por 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 40µL de água livre de

RNase. Das amostras, 2 μ L foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo por 30 minutos a 50V (Figura 2).

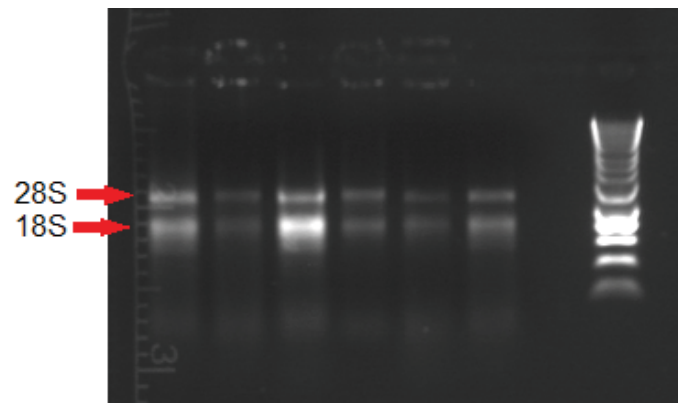


Figura 2 – Amostras de RNA com as subunidades 28S e 18S (setas) no gel de agarose 1%, indicando a integridade das amostras. Última banda do gel à direita representa o marcador de tamanho de fragmentos (100pb).

2.3 Seleção de iniciadores (*primers*) para a análise de RT-qPCR e teste de eficiência

Com a finalidade de analisar o comportamento da cv. Toropi em resposta a infecção por *P. triticina* e auxiliar na escolha dos tempos para posterior sequenciamento via RNA-Seq, análises de microarray da cv. Renan em fase de plântula em resposta à infecção por ferrugem-da-folha (*P. triticina/hordei*), brusone (*Magnaporthe grisea/oryzae*) e oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) foram utilizadas para escolha de genes diferencialmente expressos na reação de hospedeiro e não-hospedeiro, sendo que foram selecionadas sondas/genes com maiores e menores valores de *fold-change* nas interações (com maior e menor variação). Após seleção dos genes,

iniciadores foram desenhados utilizando a ferramenta Primer3Plus versão 2.3.5. Um total de 20 genes foram selecionados e 40 iniciadores desenhados (Tabela 1). Os iniciadores foram então sintetizados pela empresa Sigma Life Sciences.

Para o teste de eficiência dos iniciadores 1µg de RNA foi convertido à cDNA utilizando-se o kit SuperScript™ (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Foram misturados 5µL de cada cDNA (de cada horário) a fim de fazer um bulk e deste bulk foram preparadas as seguinte diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000. A RT-qPCR foi realizado utilizando o kit SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich) e o *slope* (b), fator de amplificação e eficiência de amplificação foram calculados, conforme fórmula:

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

$$\text{Eficiência da amplificação (E)} = (10^{(-1/b)} - 1)$$

$$\text{Fator de amplificação} = 1 + E$$

Cabe ressaltar que valores de *slope* entre -3.1 e -3.6 são aceitáveis, pois geram eficiência entre 90 e 110%. Assim, somente os iniciadores com valores de *slope* dentro desta faixa foram selecionados.

Além dos iniciadores desenhados, iniciadores previamente desenvolvidos por Tufan et al. (2011) para genes relacionados com a defesa em trigo foram utilizados (Tabela 2).

Tabela 1 – Sondas “unigenes” de trigo selecionadas via análise de microarray (Lesley Boyd, dados não publicados), nome do iniciador desenhado, sequência de bases e nome do gene a que se refere

Sonda Microarray	Nome do Iniciador	Sequencia	Gene
A_99_P156537	AC1_G6DPH_F	5'- AGACCAGCAACACTTTGTGC -3'	
A_99_P156537	AC1_G6DPH_R	5'- CTGCCAGGCTTGATGAACACAG -3'	Glicose-6-fosfato desidrogenase (<i>G6DPH</i>)
A_99_P156537	AC2_G6DPH_F	5'- TCGTGTGAGTTCAAAGGATG -3'	
A_99_P156537	AC2_G6DPH_R	5'- CATGTACATGGCTTC'GTATGGC -3'	
A_99_P136820	AC3_ZIP5_F	5'- AGTCCAGGCAAGTTC AAGG -3'	Transportador de zinco (<i>ZIP5</i>)
A_99_P136820	AC3_ZIP5_R	5'- ACACCCGTGATATGCCAAAAG -3'	
A_99_P136820	AC4_ZIP5_F	5'- AGTTGGGTATTGTTGGTGCAC -3'	
A_99_P136820	AC4_ZIP5_R	5'- ACATCTGGTGAAGCTCAAAGG -3'	
A_99_P589522	AC5_COMT_F	5'- ATCTACGCCAACCCATTTCG -3'	Acido cafeico O-metiltransferase (<i>COMT1</i>)
A_99_P589522	AC5_COMT_R	5'- AACAGAGGAAACACCAAGCC -3'	
A_99_P589522	AC6_COMT_F	5'- ACGTCGACATGATCATGCTC -3'	
A_99_P589522	AC6_COMT_R	5'- ACTCGATGGCAAAATGCCGTTG -3'	
A_99_P238786	AC7_HSP80_F	5'- TGATTGGCCAGTTTGGTGTGTC -3'	
A_99_P238786	AC7_HSP80_R	5'- TGTGTCTTGTGCTCACAATG -3'	
A_99_P238786	AC8_HSP80_F	5'- ACATGTCGAGCAAGAAGACG -3'	Proteína de choque de calor 80 (<i>HSP80</i>)
A_99_P238786	AC8_HSP80_R	5'- TTCTCGAACACAGCATCAC -3'	
A_99_P165052	AC9_GERMIN_F	5'- ATTGTCTTGTGTCCTCCCTCAC -3'	Proteína precursora de germina 9f-2.8 (<i>GERMIN</i>)
A_99_P165052	AC9_GERMIN_R	5'- AAAAACCAGCGCAAACTTG -3'	
A_99_P165052	AC10_GERMIN_F	5'- ATCGGCATCTGTGATGAAAGG -3'	
A_99_P165052	AC10_GERMIN_R	5'- CGTTGAACCTGGAAGTGCATGAG -3'	
A_99_P072835	AC11_WAK4_F	5'- TTGTGGCGAAAGGGAGTTTG -3'	Quinase associada à parede celular (<i>WAK4</i>)
A_99_P072835	AC11_WAK4_R	5'- TAGCAATTGCAAGGCGCTTG -3'	
A_99_P072835	AC12_WAK4_F	5'- TGGTGTGTTGATTCGCCATC -3'	
A_99_P072835	AC12_WAK4_R	5'- AGGGGTGCCCATTGTAATGC -3'	
A_99_P421267	AC13_PRA2_F	5'- AACATCAACACTGCCTTCGC -3'	Peroxidase de raiz (<i>PRA2</i>)
A_99_P421267	AC13_PRA2_R	5'- AGGTTGGTGTAGTAGGGCGTTG -3'	

Tabela 1 – continuação

Sonda Microarray	Nome do Iniciador	Sequencia	Gene
A_99_P421267	AC14_PRA2_F	5'-TTTGTCCAAGGCTGTGATGC-3'	Peroxidase de raiz (<i>PRA2</i>)
A_99_P421267	AC14_PRA2_R	5'-TCTTGATGCTGTCGATGACG-3'	
A_99_P218621	AC15_WRBAl_F	5'-ACCAGGAATCACTAGACGCATC-3'	Proteína indutora do ABA (<i>WRBAl</i>)
A_99_P218621	AC15_WRBAl_R	5'-TACTGTAGAAGGCTCGTGAACG-3'	
A_99_P218621	AC16_WRBAl_F	5'-GCATGGTGGTGACAATGC-3'	
A_99_P218621	AC16_WRBAl_R	5'-AATTAAGCGGAAACGATGCG-3'	
A_99_P446157	AC17_LTP_F	5'-TGCCATCGTTGTGCTATCG-3'	Proteína precursora de transferência de lípideo não específica tipo 1 (<i>LTP</i>)
A_99_P446157	AC17_LTP_R	5'-TGCCTGTATGTGACCTCAAC-3'	
A_99_P446157	AC18_LTP_F	5'-TTCCAAGAGCATGACC AAGC-3'	
A_99_P446157	AC18_LTP_R	5'-TTGCTTCCACGAC AAGAACG-3'	
A_99_P406462	AC19_STA_F	5'-TTCTGGGTTTCTGCAATCGC-3'	Transportador de sulfato (<i>STAl.la</i>)
A_99_P406462	AC19_STA_R	5'-GGGACTTACAATTGCAACGC-3'	
A_99_P406462	AC20_STA_F	5'-AAGCAAACCTCGCAACAATG-3'	
A_99_P406462	AC20_STA_R	5'-TGTGTCTGCTGTGTAACGG-3'	
A_99_P129205	AC21_TAMYB13_F	AGCCTTAGCGTCGTTTC	Proteína relacionada com o MYB13 (<i>TAMYB13</i>)
A_99_P129205	AC21_TAMYB13_R	TAAACGTGCATGTGCTGTGC	
A_99_P129205	AC22_TAMYB13_F	TTTCAGCACAGCACATGAC	
A_99_P129205	AC22_TAMYB13_R	AAGCAACGTACGTACAAGG	
A_99_P159167	AC23_EXPA3_F	TGGCCTTGGCTGTGAAAAAC	Expansina (<i>EXPA3</i>)
A_99_P159167	AC23_EXPA3_R	ACCACCTCCATGCATGTGTACC	
A_99_P159167	AC24_EXPA3_F	TTTTCTTCCGGTCCACCTTC	
A_99_P159167	AC24_EXPA3_R	AATGCAATCCATCCGTCCAC	
A_99_P215566	AC25_WCAB_F	TTGTCCAAGCTATCGTCACG	Proteína precursora de ligação a clorofila a/b (<i>WCAB</i>)
A_99_P215566	AC25_WCAB_R	ACAAAAGTTGGTGGGAAATGC	
A_99_P215566	AC26_WCAB_F	GC AAGGCGGTGAAGAATGTAC	
A_99_P215566	AC26_WCAB_R	AACCTGCTTTGGCCTTGCTG	

Tabela 1 – continuação

Sonda Microarray	Nome do Iniciador	Sequencia	Gene
A_99_P194873	AC27 CSLF6_F	TTCGTGATGACGGCAAGTTG	B-glucano sintase (<i>CSLF6</i>)
A_99_P194873	AC27 CSLF6_R	ATGTCACGCCGGAAATATCAC	
A_99_P194873	AC28 CSLF6_F	GAGCTACTTTGAGCTCAAGTCC	
A_99_P194873	AC28 CSLF6_R	TTCGCTGCTTGATGTCATG	
A_99_P624287	AC29 AQPI_F	AAGAAGATGCCAGCCCAAC	Aquaporina (<i>AQPI</i>)
A_99_P624287	AC29 AQPI_R	TCCACGGTAGTAACACGGATG	
A_99_P624287	AC30 AQPI_F	TGGTCAGACCCTGGATCTTC	
A_99_P624287	AC30 AQPI_R	TGGCATCTCTTTGCAGCAG	
A_99_P112790	AC31 FREX_F	TTGACACCCGAGAAGCATTTG	Frutose exohidrolase (<i>FREX</i>)
A_99_P112790	AC31 FREX_R	TGCACAACAGTTTGTCTCCTC	
A_99_P112790	AC32 FREX_F	AGAACCGGATACCCCAAAATGAC	
A_99_P112790	AC32 FREX_R	TTCGGAAGCCGGATGTTTTG	
A_99_P039144	AC33 PINBV2_F	AGCACAACTTTGGCAATG	Puroindolina (<i>PINBV-2</i>)
A_99_P039144	AC33 PINBV2_R	AAAACCCCTTCAACGCCAAGC	
A_99_P039144	AC34 PINBV2_F	AGCAAAGAAAGTCCCGATGTG	
A_99_P039144	AC34 PINBV2_R	TGCTGAAAAGCCAAAGATGCC	
A_99_P540132	AC35 NADP_F	ATTCCGGTTGGCAAACTGTC	Enzima málica dependente de NADP (<i>NADP</i>)
A_99_P540132	AC35 NADP_R	ATCGTAATTGGCAGGCAAGC	
A_99_P540132	AC36 NADP_F	GGCAITTCAGAACTCAITTC	
A_99_P540132	AC36 NADP_R	AACGGCTTCTGAAAGTGCTG	
A_99_P105865	AC37 RBRI_F	AGATCGCCCAAAAGAGCATG	Proteína relacionada com o retinoblastoma 1 (<i>RBRI</i>)
A_99_P105865	AC37 RBRI_R	TCTTGTGGGGTTGCAAAACG	
A_99_P105865	AC38 RBRI_F	TACCGTCAAGCCTTTGTGG	
A_99_P105865	AC38 RBRI_R	TGCATCGCCCACTTTTGG	
A_99_P193548	AC39 WCBF2_F	TTTGACGCTGCAACTGATGG	Fator de transcrição AP2/EREBP (<i>WCBF2-1</i>)
A_99_P193548	AC39 WCBF2_R	CGGCTCTCTTAAACTTGGTC	
A_99_P193548	AC40 WCBF2_F	GTTGGACGAGCACTGGTTTTG	
A_99_P193548	AC40 WCBF2_R	TGTAGACGCCCGCTGTATTCC	

Tabela 2 – Iniciadores previamente desenvolvidos por Tufan et al. (2011) para genes relacionados com a patogenicidade (PR) em trigo e sua sequência

Gene	Iniciador Forward	Iniciador Reverse	Função
PR1	CAATAACCTCGGCGTCTT CATCAC	TTATTTACTCGCTCGGTC CCTCTG	β -1,3- glucanase
PR2	AAGCACTTTGGGCTGTTC AATCCG	CCAGGCAGCTTATTCGAA CGCAA	β -1,3- glucanase
PR4	AAGTGCCTCCAGGTGACG AA	TGCACTGGTCGACGATCC T	Endoquitinase
PR9	CAAGGTGAACTCGTGATG GA	TTGAGGATTCAACCGTCG TT	Peroxidase
PR10	CAAGATGGTCGAGGCTTA CC	CGAAGTCGATCATGAAGC AA	Fenilalanina amônia-liase

2.4 RT-qPCR

Para a análise de PCR quantitativo, 1 μ g de RNA foi convertido à cDNA utilizando-se o kit SuperScript™ (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Cada amostra foi individualmente analisada com cada iniciador desenhado com valor de *slope* dentro da faixa recomendável, utilizando o kit SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich). Cada horário foi analisado em triplicata biológica e em três replicatas técnicas.

Como normalizadores foram utilizados genes de expressão constitutiva *EFI* (elongation factor-1 α), *GADPH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e *UBI* (ubiquitin) (VAN RIET et al., 2006; CORAM et al., 2008; MCGRANN et al., 2009). O fator normalizador foi calculado mediante a ferramenta GeNorm VBA, a qual calcula o fator normalizador baseado na média geométrica dos genes referência. Os resultados foram normalizados utilizando os valores de Ct's obtidos para os controles endógenos presentes na mesma reação. Para normalização foi utilizada a seguinte equação:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - C_{\text{controle endógeno}}$$

O aumento dos níveis de expressão do gene alvo para cada condição foi calculado através da equação:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

Como calibrador foi utilizado o valor obtido para uma amostra específica, como por exemplo, o controle sem a presença do fungo. A quantificação relativa foi calculada através da fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Para todas as amostras, fez-se uma média dos valores de expressão das replicatas técnicas. Para as amostras controle, uma média dos valores de expressão normalizados de cada replicata biológica para cada horário também foi calculada. Cada valor de expressão de cada replicata biológica inoculada foi dividido pela média de seu respectivo controle, gerando um valor x . Esses valores x foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e analisados pelo teste Tukey a 5% de significância, para confirmação da expressão diferencial. Para a construção dos gráficos de expressão uma média dos valores x para cada horário foi calculada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de eficiência dos iniciadores desenvolvidos

Para os iniciadores desenhados os valores de *slope* obtidos estão descritos na Tabela 3. Iniciadores com valores maiores ou menores do que a faixa ideal (-3.1 a -3.6) ou referente ao mesmo gene não estão descritos. Essa seleção visa à amplificação na faixa de 90 a 110%.

Tabela 3 – Iniciadores desenhados via Primer3Plus e seus respectivos valores de *slope*

Nome do Iniciador	<i>Slope</i>	Nome do Iniciador	<i>Slope</i>
AC2_G6DPH_F		AC17_LTP_F	
AC2_G6DPH_R	-3.063	AC17_LTP_R	-3.104
AC4_ZIP5_F		AC25_WCAB_F	-3.379
AC4_ZIP5_R	-3.249	AC25_WCAB_R	
AC6_COMT_F		AC30_AQP1_F	-3.559
AC6_COMT_R	-3.279	AC30_AQP1_R	
AC7_HSP80_F		AC31_FREX_F	-3.492
AC7_HSP80_R	-3.396	AC31_FREX_R	
AC13_PRA2_F		AC38_RBR1_F	-3.866
AC13_PRA2_R	-3.295	AC38_RBR1_R	

3.2 RT-qPCR

O processo de defesa em plantas é complexo e envolve múltiplas etapas e atuação de diversas proteínas e enzimas. Os genes selecionados para análise via RT-qPCR participam direta ou indiretamente do processo de defesa. Este processo se inicia pelo reconhecimento do patógeno, sinalização celular e ativação de genes que podem estar envolvidos nas mais diversas rotas metabólicas (KOORNNEEF & PIETERSE, 2008).

A expressão dos genes foi diferencial em função do tempo e estágio de desenvolvimento da doença, bem como os genes avaliados, pertencente às rotas metabólicas diferentes, tiveram picos

de expressão em momentos diferentes da infecção. Dos genes avaliados, alguns apresentaram alteração de expressão em função da infecção (Figura 3, 4 e Tabela 4) evidenciando sua participação direta ou indireta no processo de defesa e outros não apresentaram alteração significativa (Figura 5 e Tabela 4), podendo ou não estar envolvidos neste processo.

Das proteínas relacionadas com a patogênese todas, com exceção da PR-10, aumentaram sua expressão significativamente durante a infecção (Figura 4). Os picos de expressão dessas proteínas foram 6 hai (PR-2 e PR-9) e 72 hai (PR-1, PR-2 e PR-4). Sabe-se que estas proteínas estão envolvidas na resposta de defesa contra patógenos (VAN LOON et al., 2006) e estão subdividas em classes dependendo do tipo de patógeno e da interação compatível ou incompatível, conforme mostra a Tabela 5 (BONASERA et al., 2006; SEO et al., 2008).

Bonaser et al. (2006) estudaram a expressão desses genes em maçã (*Malus × domestica* cv. Gala) em resposta a *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e verificaram que houve aumento da expressão de PR-2, PR-5 e PR-8 na interação compatível (*E. amylovora*). Porém, o mesmo não ocorreu na interação incompatível (*P. syringae* pv. *tomato*). PR-1, nesses casos, não alterou seus níveis de expressão. Com relação à cv. Toropi percebeu-se um aumento na expressão PR-1, PR-2, PR-4 e PR-9 (Figura 4).

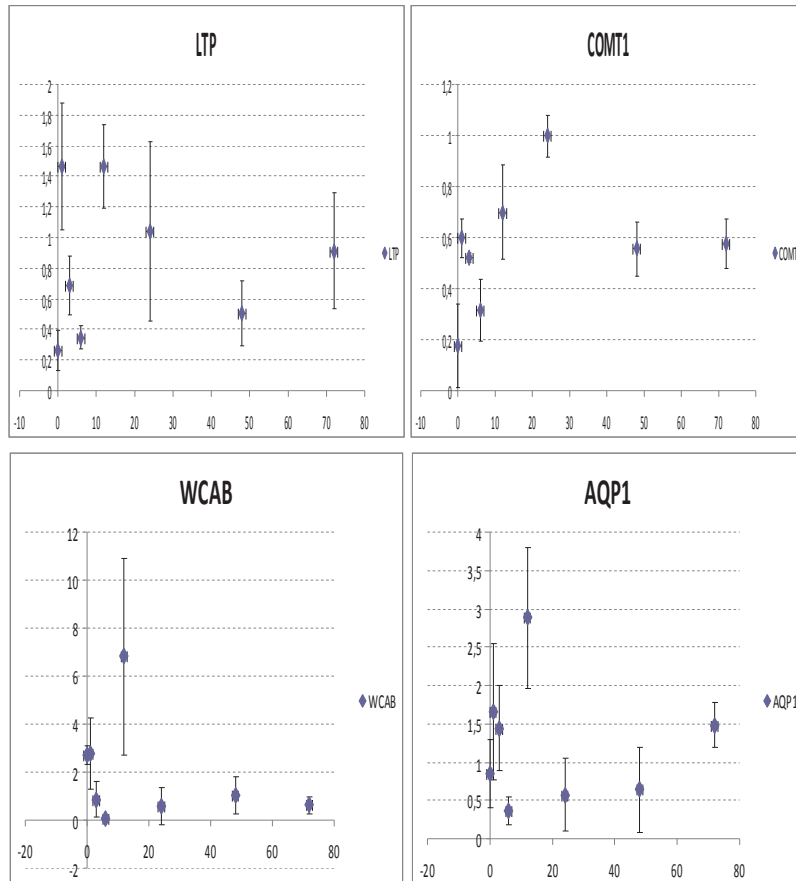


Figura 3 – Perfis de expressão (*fold-change*) e desvio padrão dos genes estatisticamente diferencialmente expressos por ANOVA e Tukey ($P < 0,05$) na cv. Toropi em resposta à infecção por *Puccinia triticina* ao longo do tempo pós-inoculação (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 hai). (*LTP*) proteína precursora de transferência de lipídeo não-específica tipo I, (*COMT1*) ácido cafeico O-metiltransferase, (*WCAB*) proteína precursora de ligação a clorofila a/b e (*AQP1*) aquaporina.

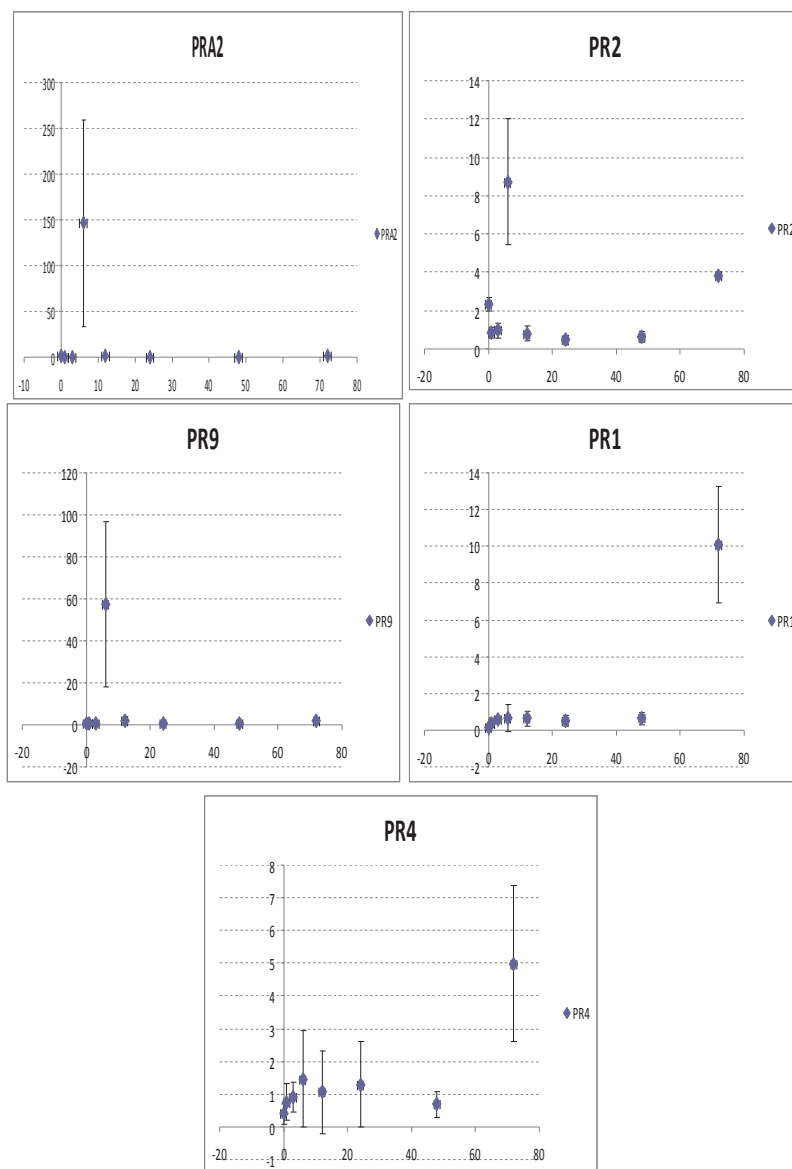


Figura 4 – Perfis de expressão (*fold-change*) e desvio padrão dos genes estatisticamente diferencialmente expressos por ANOVA e Tukey ($P < 0,05$) na cv. Toropi em resposta à infecção por *Puccinia triticina* ao longo do tempo pós-inoculação (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 hai). (PRA2) peroxidase de raiz e (PR1, 2, 4 e 9) proteínas relacionadas à patogênese.

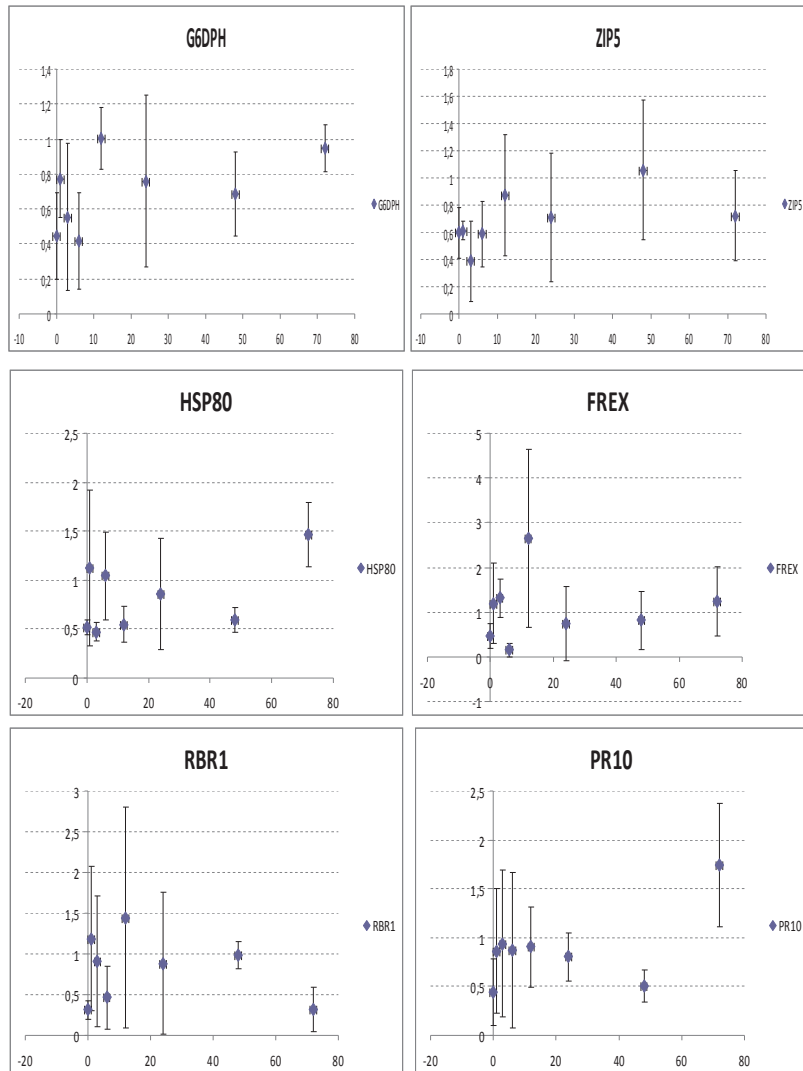


Figura 5 – Perfis de expressão (*fold-change*) e desvio padrão dos genes não estatisticamente diferencialmente expressos por ANOVA e Tukey ($P < 0,05$) na cv. Toropi em resposta à infecção por *Puccinia triticina* ao longo do tempo pós-inoculação (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 hai). (*G6DPH*) glicose-6-fosfato desidrogenase, (*ZIP5*) transportador de zinco, (*HSP80*) proteína de choque de calor 80, (*FREX*) frutose exohidrolase, (*RBR1*) proteína relacionada com o retinoblastoma 1 e (*PR-10*) proteína relacionada à patogênese.

Tabela 4 – Níveis de expressão dos genes via RT-qPCR avaliados por ANOVA e pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tempo pós-infecção	<i>G6DPH</i>	<i>ZIP5</i>	<i>HSP80</i>	<i>FREX</i>	<i>RBR1</i>	PR10	<i>LTP</i>	<i>COMTI</i>
0 hai	0.45 ^a	0.60 ^a	0.52 ^a	0.46 ^a	0.31 ^a	0.45 ^a	0.26 ^a	0.18 ^a
1 hai	0.77 ^a	0.61 ^a	1.13 ^a	1.19 ^a	1.19 ^a	0.86 ^a	1.47 ^b	0.60 ^{ab}
3 hai	0.55 ^a	0.39 ^a	0.47 ^a	1.32 ^a	0.91 ^a	0.94 ^a	0.68 ^{ab}	0.52 ^{ab}
6 hai	0.42 ^a	0.59 ^a	1.04 ^a	0.15 ^a	0.47 ^a	0.87 ^a	0.35 ^a	0.32 ^{ab}
12 hai	1.00 ^a	0.87 ^a	0.55 ^a	2.64 ^a	1.44 ^a	0.91 ^a	1.47 ^b	0.70 ^{ab}
24 hai	0.76 ^a	0.71 ^a	0.86 ^a	0.74 ^a	0.89 ^a	0.81 ^a	1.04 ^{ab}	1.00 ^b
48 hai	0.69 ^a	1.06 ^a	0.59 ^a	0.82 ^a	0.99 ^a	0.50 ^a	0.51 ^a	0.56 ^{ab}
72 hai	0.95 ^a	0.72 ^a	1.47 ^a	1.24 ^a	0.32 ^a	1.74 ^a	0.91 ^{ab}	0.57 ^{ab}
Tempo pós-infecção	<i>WCAB</i>	<i>AQPI</i>	<i>PRA2</i>	PR-2	PR-9	PR-1	PR-4	
0 hai	2.73 ^{ab}	0.85 ^a	0.78 ^a	2.33 ^a	0.33 ^a	0.15 ^a	0.39 ^a	
1 hai	2.78 ^{ab}	1.66 ^{ab}	0.62 ^a	0.84 ^a	0.74 ^a	0.39 ^a	0.75 ^a	
3 hai	0.85 ^a	1.44 ^{ab}	0.39 ^a	0.98 ^a	0.69 ^a	0.56 ^a	0.91 ^a	
6 hai	0.05 ^a	0.37 ^a	146.47 ^b	8.72 ^b	57.35 ^b	0.67 ^a	1.47 ^a	
12 hai	6.82 ^b	2.88 ^b	0.96 ^a	0.79 ^a	1.75 ^a	0.62 ^a	1.06 ^a	
24 hai	0.57 ^a	0.57 ^a	0.28 ^a	0.47 ^a	0.40 ^a	0.51 ^a	1.29 ^a	
48 hai	1.01 ^a	0.64 ^a	0.59 ^a	0.64 ^a	0.78 ^a	0.64 ^a	0.69 ^a	
72 hai	0.62 ^a	1.48 ^{ab}	1.67 ^a	3.85 ^a	1.70 ^a	10.11 ^b	4.98 ^b	

^{a,b} Valores médios na mesma coluna, com letras iguais, não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) pelo teste Tukey 5%. (*G6DPH*) glicose-6-fosfato desidrogenase, (*ZIP5*) transportador de zinco, (*HSP80*) proteína de choque de calor 80, (*FREX*) frutose exohidrolase, (*RBR1*) proteína relacionada com o retinoblastoma 1, (*LTP*) proteína precursora de transferência de lipídeo não-específica tipo I, (*COMTI*) ácido cafeico O-metiltransferase, (*WCAB*) proteína precursora de ligação a clorofila a/b, (*AQPI*) aquaporina, (*PRA2*) peroxidase de raiz, (PR) proteína relacionada à patogênese e (hai) horas após inoculação.

Segundo Liu et al. (2005), PR-1 a PR-6 estão envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são tóxicas ao fungo, podendo atuar também reforçando a parede celular do hospedeiro. Por sua vez, PR-7 a PR-9 estão relacionadas com a eliminação dessas ROS, aliviando os danos oxidativos e a PR-10 pode estar envolvida na homeostase redox e, por isso, sua expressão é constante.

Tabela 5 – Proteínas relacionadas com a patogênese em plantas e suas respectivas propriedades

Família	Propriedade	Gene
PR-1	β -1,3-glucanase	<i>Ypr1</i>
PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Quitinase tipo I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	“thaumatin-like”	<i>Ypr5</i>
PR-6	Inibidor de proteinase	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Endo-proteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Quitinase tipo III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Fenilalanina amônia-liase	<i>Ypr10</i>
PR-11	Quitinase tipo I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Defensina	<i>Ypr12</i>
PR-13	Tionina	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Proteína de transferência de lipídeo	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Oxalato oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Oxalato oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Desconhecida	<i>Ypr17</i>

Adaptado de van Loon et al. (2006); Tufan et al. (2011).

β -1,3-glucanases (PR-2) são enzimas que clivam ligações 1,3- β -D-glicosídicas em β -glucanos. Esses β -glucanos são componentes estruturais da parede celular de fungos e por isso algumas isoformas dessas enzimas têm propriedades antifúngicas. Essas enzimas apresentaram atividade antifúngica, por exemplo, contra *Alternaria longipes*, *Rhizoctonia cerealis* (SUN et al., 2004), *R. solani*, *R. cerealis*, *Phytophthora capsici* e *A. longipes* (LIU et al., 2009). Sela-Buurlage et al. (1993) verificaram que as quitinases e as β -1,3-glucanases de classe I possuem propriedades antifúngicas e agem, inclusive sinergicamente.

As quitinases (PR-4) são enzimas que hidrolizam a N-acetilglucosamina do polímero de quitina. A quitina também é um

componente presente na parede celular dos fungos e sua atividade antifúngica é variável pela especificidade da enzima, sua localização e concentração celular e natureza da interação (PUNJA & ZHANG, 1993).

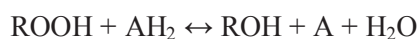
As peroxidases (PR-9) são enzimas que catalisam a oxidoredução entre o peróxido de hidrogênio e seus redutores ($H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$). Elas também estão envolvidas no processo de lignificação, suberização, catabolismo de auxina, cicatrização e defesa (HIRAGA et al., 2001).

Em Toropi, em resposta à ferrugem-da-folha, observou-se que a cultivar produz espécies reativas de oxigênio (PR-1), degrada a parede celular e estruturas fúngicas (PR-2 e PR-4) bem como aumenta o processo de lignificação e detoxificação celular (PR-9). A degradação das estruturas fúngicas (PR-2) começa nos primeiros momentos pós-infecção, 6 hai, e continua a ocorrer nos momentos tardios (PR-4), 72 hai. A lignificação, para evitar a penetração das estruturas fúngicas (PR-9), ocorre também nos momentos iniciais pós-infecção, 6 hai, e a produção de espécies reativas de oxigênio (PR-1) ocorre em momentos tardios, 72 hai. Como a formação haustorial do fungo ocorre 24 hai (HU & RIJKENGERG, 1998; ZHANG & DICKINSON, 2001), pode-se hipotetizar que PR-2 e PR-9 atuam na resistência pré-haustorial de Toropi (WESP-GUTERRES et al., 2013) e PR-1 e PR-4 na resistência pós-haustorial.

Além das proteínas PR, outras proteínas podem auxiliar direta ou indiretamente no processo de defesa, as quais podem atuar em rotas metabólicas paralelas com finalidade de produzir compostos intermediários, gerar energia, produzir outros compostos de defesa

como ligninas e outros. Os picos de expressão dos genes estatisticamente diferencialmente expressos variaram. *LTP* teve pico 1 e 12 hai; *PRA2* teve pico em 6 hai; *WCAB* e *AQPI* tiveram pico 12 hai; e *COMT1* teve pico 24 hai. Os genes *G6DPH*, *ZIP5*, *HSP80*, *FREX*, *RBR1* e *PR10* por sua vez, não tiveram alteração significativa em sua expressão ao longo do tempo.

As peroxidases (*PRA2*) são enzimas que catalisam a oxidação de substratos inorgânicos e orgânicos à custa de uma variedade de peróxidos segundo a seguinte reação:



Essas enzimas estão envolvidas não somente na defesa de plantas contra patógenos, mas também em diversos ciclos celulares. Dentre os mecanismos de defesa, estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de auxinas, formação de suberina e lignina (iniciam a polimerização de monolignóis à lignina), sinalização celular, mediadores da resposta de hipersensibilidade, mensageiros secundários do ciclo do ácido jasmônico, biossíntese de fitoalexinas e no metabolismo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ALMAGRO et al., 2009).

Boava et al. (2011), estudando a interação entre citrus (*Citrus* sp.) resistente e suscetível com *Phytophthora parasitica* relataram que houve um expressão aumentada de peroxidases nos híbridos resistentes principalmente 48, 96 e 168 hai. Wang et al. (2012) também observaram um aumento da expressão de peroxidases na interação entre banana (*Musa acuminata*) e *Fusarium oxysporum* f.sp. Cubense tropical raça 4. Yang et al. (2007) observaram o mesmo fenômeno na interação canola (*Brassica napus*) e *Sclerotinia*

sclerotiorum. Em Toropi o aumento da expressão desta proteína teve pico em 6 hai (Figura 4). O comportamento dessa peroxidase foi similar ao perfil de expressão da proteína PR-2 e PR-9 (Figura 3), indicando que todas estas enzimas/proteínas atuam na resistência pré-haustorial da cultivar.

As proteínas de transferência de lipídeos (*LTP*) não específicas transferem fosfolipídios e galactolipídeos através da membrana celular e estão envolvidos na deposição de cera e cutina na parede celular, auxiliando no processo de defesa contra patógenos. Kamal et al. (2010) confirmaram a expressão aumentada da proteína tipo 1 não específica de transferência de lipídeos (*ltp9.2c*) em trigo em resposta a estresses bióticos. Neste estudo, na cv. Toropi constatou-se um aumento significativo de expressão dessa proteína nos primeiros estágios pós-infecção, 1 e 12 hai (Figura 3). Esse aumento pode estar envolvido no processo de defesa, aumentando a deposição de cera e cutina na parede celular no intuito de evitar que novos esporos e estruturas fúngicas penetrem na célula.

A lignina é um polímero complexo formado a partir da polimerização e desidrogenação de monolignóis, os quais são formados a partir da via fenilpropanoíde. É sabido que a enzima caffeoil-CoA O-metiltransferase (CCoAOMT – *COMT1*) está envolvida na biossíntese de lignina, a qual, por sua vez, é um composto importante na defesa de plantas contra patógenos, pois proporciona resistência mecânica da parede celular e proteção contra degradação biológica (LI et al., 1997; ZHONG et al., 2000). Esta enzima é capaz de metilar precursores aldeídicos, alcoólicos e ésteres.

Ding et al. (2011) observaram a expressão aumentada deste gene na cultivar resistente de trigo Wangshuibai na interação com *Fusarium graminearum* 3 hai, com pico em 12 hai. Moon et al. (2007) estudando a interação entre eucalipto e *Puccinia psidii* verificaram que na biblioteca de sequências com expressão aumentada na cultivar resistente estão genes relacionados com a biossíntese de celulose e lignina, inclusive o caffeoil-CoA O-metiltransferase. Similarmente, Liu et al. (2011) observaram aumento da expressão deste gene na interação soja e *Heterodera glycines*.

Neste estudo, na cv. Toropi a expressão dessa enzima teve pico em 24 hai (Figura 3). Esse gene juntamente com o *LTP* atua reforçando a parede celular. A penetração do fungo na célula pode ocorrer diretamente através da cutícula, se esta for fina (LEONARD & SZABO, 2005), e por isso esta camada é de extrema importância na defesa celular contra fungos biotróficos. O gene *COMT1* tem sua expressão nos momentos iniciais da infecção visando evitar a penetração dos esporos e estruturas infectivas do fungo atuando na defesa pré e pós-haustorial de Toropi, pois tem seu pico em 24 hai, momento no qual a formação dos primeiros haustórios se inicia.

A enzima RUBISCO (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase) é a principal fonte de produção de energia e potencial redutor em células vegetais. Fofana et al. (2007) relatam que a expressão desta enzima aumentou drasticamente na interação compatível entre a linhagem isogênica de trigo RL 6003 com *P. triticina*, principalmente 24 hai. Acredita-se que a regulação diminuída da expressão de genes envolvidos no fotossistema II e interrupção da cadeia de transporte de elétrons, resulta no desvio de

elétrons e formação de espécies reativas de oxigênio (ZOU et al., 2005), o que também foi observado por Fofana et al. (2007) na interação incompatível (resistente) 6 hai. Os autores especularam que estas ROS participam na defesa de não hospedeiro, fortalecendo a parede celular, atuando como sinalizadores intracelulares e/ou alterando a estado redutor da célula com finalidade de regulação.

A proteína de ligação à clorofila a/b (*WCAB*) é uma proteína de membrana do complexo de reação II (light-harvesting II – LCHII) envolvida na captura de luz e, por consequência, na fotossíntese (HORN & PAULSEN, 2004). Manickavelu et al. (2010) analisaram a interação trigo e *P. triticina* em cultivar suscetível e resistente e observaram a expressão aumentada na cultivar suscetível do gene codificante do precursor da proteína de ligação da clorofila a/b (chlorophyll a/b-binding protein *WCAB* precursor). Yang et al. (2013), estudando a interação trigo e *Septoria tritici*, verificaram a redução em abundância e no status de fosforilação das proteínas de ligação a clorofila do cloroplasto (chloroplast chlorophyll a-b binding proteins), tanto na cultivar resistente quanto na suscetível, o que sugere uma supressão da fotossíntese e alterações no metabolismo de açúcares. Em resposta à seca o mesmo fenômeno fora observado por Rizhsky et al. (2004) em *Arabidopsis*. Em Toropi observou-se um aumento de expressão da proteína precursora de ligação à clorofila (*WCAB*) em 12 hai (Figura 3). A principal função da proteína de ligação à clorofila a/b é coletar e transferir energia luminosa entre os centros de reação fotossintéticos.

Durante um estresse, a planta pode reagir aumentando a expressão dessas proteínas ou diminuindo. A diminuição, conforme

observado por Manickavelu et al. (2010), pode representar que a planta está priorizando o processo de defesa ao invés da fotossíntese. Uma expressão aumentada pode representar que a planta aumentou o processo de fotossíntese e, em consequência, a produção de energia para o processo de defesa, o que pode ser observado em Toropi, a partir das 12 hai. A diminuição dessa expressão após 12 hai pode ser uma resposta da planta mudando sua prioridade para o processo de defesa e/ou o gene pode estar sendo inibido pelo patógeno no intuito de amenizar os danos causados pelo processo de defesa e produção de ROS (ZOU et al., 2005). A interrupção da cadeia de transporte de elétrons resulta no desvio de elétrons para formação de ROS (YOSHIOKA et al., 2006).

As aquaporinas, por sua vez, são proteínas intrínsecas de membrana conhecidas por facilitar o transporte de água pela membrana, mas também podem estar envolvidas no transporte de outras moléculas como dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, nitratos e nitritos e boro (ECKARDT, 2008). A aquaporina 1 (*AQP1*) facilita o transporte de CO₂ e água (UEHLEIN et al., 2008). Em Toropi um aumento de expressão dessa proteína foi observado, sendo seu pico em 12 hai (Figura 3). Essa expressão indica que há um aumento da atividade metabólica celular, bem como um aumento da entrada de água na célula, que pode ser em virtude do processo de defesa da planta e/ou pode ser resultado da indução pelo fungo no intuito de favorecer seu processo de desenvolvimento e o estabelecimento da infecção.

Além dos genes *PRA2*, *LTP*, *COMT1*, *WCAB* e *AQP1* outros genes foram avaliados. Estes, por sua vez, não mostraram

alteração de expressão estatisticamente significativa. Apesar disso se pode observar alterações em seu perfil pós-infecção sendo que *G6DPH*, *FREX* e *RBRI* tiveram pico em 12 hai; *ZIP5* teve pico em 48 hai e *HSP80* e *PR-10* tiveram pico em 72 hai (Figura 5). Essas alterações podem indicar que estes genes estão auxiliando no processo de defesa da planta.

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (*G6DPH* - EC 1.1.1.49) participa da via das pentoses-fosfato, a qual é responsável pela produção de ribose-5-fosfato (constituente dos ácidos nucleicos) e pela formação de moléculas de NADPH (molécula com poder redutor) a partir da clivagem de moléculas de glicose-6-fosfato. Os patógenos quando se estabelecem recrutam genes do hospedeiro para favorecer a infecção alterando tanto sua morfologia quanto seu metabolismo (IBRAHIM et al., 2011). Ibrahim et al. (2011), avaliando a infecção de *M. incognita*, em soja (*Glycine max*) em dois estágios diferentes de infecção, 12 dias após a infecção – galhas pequenas (intensa atividade de alimentação) e dez semanas após a infecção – galhas largas (infecção madura), relatam ter observado a expressão diferencial de diversos genes, inclusive aqueles relacionados com a glicólise. Estes apresentaram regulação aumentada, tal como a glicose-6-fosfato isomerase, indicando que durante a infecção a planta desvia o metabolismo para a produção de energia e precursores para a via da glicólise. Essa observação justifica porque não foi observado um aumento significativo da expressão de *G6DPH* em Toropi (Figura 5), pois essa enzima participa da rota oposta da glicólise. Apesar disso, essa enzima pode auxiliar no processo de defesa produzindo NADPH,

um agente redutor requerido para diversas reações como síntese de lipídeos e ácidos nucléicos.

Assim como o *G6DPH*, o gene *ZIP5* teve sua expressão constante ao longo do tempo de infecção (Figura 5). Contudo, seus perfis de expressão foram muito similares. Isto porque o íon zinco é um potente inibidor da glicose-6-fosfato desidrogenase. O ciclo das pentoses-fosfato gera NADPH, sendo que uma baixa relação NADPH/NADP é favorecida pelo íon zinco (IBRAHEEM et al., 2005), ou seja, quando há um aumento na expressão de glicose-6-fosfato desidrogenase, há um aumento de NADPH o que por sua vez estimula a entrada de zinco através do transportador ZIP, inibindo a *G6DPH*. A entrada e saída de zinco nas plantas são realizadas através de transportadores conhecidos como ZIP (zinc-, iron-permease), HMA (heavy-metal-ATPases) e MTP (metal tolerance protein) ou CDF (cation diffusion facilitator) (BROADLEY et al., 2007; CLAUS & CHAVARRIA-KRAUSER, 2012). A expressão do gene *ZIP5* teve pico em 48 hai. Esse aumento, apesar de pequeno, indica que pode estar havendo um aumento de absorção de zinco que pode indicar uma necessidade da planta em estimular rotas de defesa. O zinco é um cofator enzimático, bem como faz parte da estrutura de diversas proteínas e enzimas, podendo atuar também como mensageiro secundário e na proteção contra o estresse oxidativo. Esse pode atuar como um agente estrutural, catalítico e co-catalítico. A entrada de zinco pode também ser em função da necessidade desse metal pelo patógeno considerando que este metal faz parte estrutural da zinco-superóxido dismutase – importante enzima antioxidante – e está envolvido na germinação e desenvolvimento do tubo germinativo

(COUEY & SMITH, 1961; HWANG et al., 2002; ZHANG et al., 2008).

Heat Shock Proteins (HSP) são proteínas importantes na resposta imune basal e essenciais no processo de reconhecimento do patógeno, resistência, transdução de sinal e apoptose (GARRIDO et al., 2003; MAIMBO et al., 2007; AL-WHAIBI, 2011). HSP90 é uma chaperona citosólica responsável pela resistência à patógenos, uma vez que esta reage com as proteínas de resistência (R), as quais, por sua vez, são sinalizadoras/receptoras no processo de defesa. Bhattarai et al. (2007) sugerem que a HSP90 forma um complexo sinalizador para os genes que codificam as proteínas R e/ou genes que induzem a morte celular programada. Klink et al. (2009), avaliando a interação entre cultivares de soja resistente e suscetível à *Heterodera glycines*, verificaram que a indução da HSP90 ocorreu somente na reação de resistência. Essa proteína demonstrou importância na resistência contra *Tobacco mosaic virus*, *Potato virus X*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (LIU et al., 2004) e *Pestalotiopsis thea* (SENTHILKUMAR et al., 2012). A HSP80 de trigo é uma proteína associada a microtubulos conhecida por estar envolvida nos processos de defesa e no enovelamento de proteínas (BESSUDO, 1996). A HSP80 é descrita como membro da família das HSP90 (ROY et al., 2013).

Neste estudo, na cv. Toropi observou-se um aumento da expressão desta proteína somente 72 hai (Figura 5). O aumento de expressão desta proteína coincide com os picos de expressão das proteínas PR1 e PR4, demonstrando que pode haver uma correlação

entre esta proteína e a biossíntese de proteínas PR, conforme sugerido por Bhattarai et al. (2007).

O pico de expressão da frutose exohidroxilase (*FREX*) foi observado em 12 hai, mas não foi estatisticamente significativo. Essas enzimas clivam a porção terminal das frutoses ou difrutoses na ligação Fru-Fru e estão envolvidas em diversas rotas metabólicas como provisão de energia, regulação osmótica e tolerância a estresses. Van Den Ende et al. (2004) sugeriram que, por essas enzimas também estarem presentes em plantas com ausência de frutose, estas podem estar relacionadas com os processos de defesa em plantas. Acredita-se que esta enzima auxilia no processo de defesa ao degradarem a frutose originando compostos que se aderem na membrana e a estabilizam (VALLUTU & VAN DER ENDE, 2008). Em Toropi essas enzimas podem estar auxiliando no processo de defesa reforçando a membrana e/ou liberando energia.

A proteína relacionada ao retinoblastoma 1 (*RBR1*) controla a transição do ciclo celular de G1 para S. Esta proteína se liga aos fatores de transcrição E2F atuando como regulador negativo do ciclo celular e diferenciação (HIRANO et al., 2008; GUTZAT et al., 2011). Alguns vírus, como o geminivirus se ligam a esta proteína inibindo sua ligação com os fatores de transcrição, ativando a replicação do DNA (SHEN & HANLEY-BOWDOIN, 2006). Yin et al. (2012) relatam ter observado um aumento da expressão desta proteína em resposta ao estresse em embriões de trigo, indicando que os organismos regulam o esqueleto celular, divisão celular e extensão da parede celular para sobreviver. Na cv. Toropi, em estágio de planta adulta, percebeu-se um pico de expressão desta proteína em 12 hai

(Figura 5), indicando que a planta diminuiu o processo de replicação celular, desviando suas energias para outros processos como produção de compostos de defesa.

4 CONCLUSÕES

As análises mostram o comportamento de diversas rotas metabólicas durante o processo de defesa contra a ferrugem-da-folha na cultivar resistente Toropi. Esse conhecimento pode ser utilizado para guiar novos estudos, visando o entendimento da resistência de planta adulta em trigo a esta doença. Em especial, destacam-se os principais genes envolvidos:

- Os genes *PRA2*, *PR-2*, *PR-9*, *LTP*, *WCAB* e *AQPI* parecem estar envolvidos na resistência pré-haustorial de Toropi, reforçando a parede celular da planta (*PRA2*, *LTP*), degradando estruturas fúngicas (*PR-2*), formação de ROS (*PRA2*), detoxificação celular (*PR-9*), geração de energia (*WCAB*) e absorção de água e nutrientes (*AQPI*);
- *COMT1*, *PR-1* e *PR-4* parecem estar envolvidos na resistência pós-haustorial de Toropi, reforçando a parede celular da planta (*COMT1*), degradando estruturas fúngicas (*PR-4*) e na formação de ROS;
- *G6DPH*, *ZIP5*, *HSP80*, *FREX*, *RBRI* e *PR-10* apresentam expressão constante, mas podem estar auxiliando o processo de defesa celular;
- O patógeno, por sua vez, pode estar envolvido no aumento da expressão de genes como *ZIP5* e *AQPI*, visando suprir a demanda por zinco, água e nutrientes para seu desenvolvimento.

CAPÍTULO II

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM TRIGO EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-INFECÇÃO COM *PUCCINIA TRITICINA*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM-DA-FOLHA

Alice Casassola¹

RESUMO – A ferrugem-da-folha é uma doença que afeta a cultura do trigo na região sul do Brasil a qual, por sua vez, é a maior produtora nacional deste cereal. A resistência genética é uma das alternativas mais eficientes no controle da doença. A resistência de planta adulta é mediada por genes menores que permitem o desenvolvimento da doença em níveis não prejudiciais ao rendimento. Toropi é uma cultivar de trigo brasileira que apresenta resistência de planta adulta à ferrugem-da-folha. Os mecanismos envolvidos nessa resistência duradoura ainda não são totalmente conhecidos. Sabe-se que, diferentemente de seu parental Frontana, essa cultivar não possui o gene *Lr34*, um dos principais genes que conferem resistência de planta adulta. O objetivo deste trabalho foi estudar quais os genes e rotas metabólicas estão envolvidas na resistência de Toropi à ferrugem-da-folha. Na Embrapa Trigo, as folhas bandeiras de plantas adultas da cultivar foram inoculadas com solução oleosa contendo uredineosporos do fungo, raça B55 (MDT-MR). As plantas controles foram inoculadas somente com óleo, visando subtrair seu efeito nos

¹ Farmacêutica, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

resultados. O RNA foi extraído, purificado e encaminhado ao National Institute of Agricultural Botany – NIAB, Cambridge/Inglaterra para realização do sequenciamento e bioinformática. O sequenciamento foi realizado via Illumina Pair-End pelo The Genome Analysis Centre – TGAC, Norwich/Inglaterra. As análises de bioinformática foram realizadas no NIAB e finalizadas no Laboratório Multiusuário da Embrapa Informática Agropecuária e na Embrapa Trigo. Foram realizadas a montagem do transcriptoma de referência, cálculo da expressão diferencial e comparação com o genoma da cultivar Chinese Spring. A validação via PCR quantitativo (RT-qPCR) foi realizada na Embrapa Trigo utilizando sete iniciadores desenhados a partir de *contigs* diferencialmente expressos. No sequenciamento foram obtidos 463.371 *contigs*, dos quais 19.633 foram diferencialmente expressos. O tempo pós-infecção onde mais genes tiveram sua expressão alterada foi 24 horas após a inoculação. Dos *contigs* diferencialmente expressos, as principais rotas metabólicas envolvidas foram geração de precursores metabólicos e energia, catabolismo, resposta a estímulos bióticos e abióticos e ao estresse e transporte. A validação via RT-PCT apresentou uma correlação média de 0,69. Além dos *contigs* com função conhecida, vários não apresentam homologia nas bases de dados. Esses genes com função conhecida ou não podem representar novos genes a serem utilizados no melhoramento genético da cultura.

Palavras-chave: *Triticum aestivum* L., ferrugem-da-folha, sequenciamento de RNA, RT-qPCR, bioinformática.

**WHEAT GENE DIFFERENTIAL EXPRESSION AT
DIFFERENT TIME POINTS POST-INFECTION WITH
Puccinia triticina – CAUSAL AGENT OF LEAF RUST**

ABSTRACT - Leaf rust is a disease that affects the wheat crop in southern Brazil which, in turn, is the largest national producer of this cereal. Genetic resistance is one of the most effective alternatives to control the disease. The adult plant resistance is provided by minor genes which allow the development of the disease at levels that do not harm productivity. Toropi is a Brazilian wheat cultivar that exhibits adult plant resistance to leaf rust. The mechanisms involved in this durable resistance are not yet completely known, it is just known that unlike its parental Frontana, Toropi does not have the *Lr34* gene, one of the most important genes that confer adult plant resistance. The objective of this work was to study which genes and metabolic pathways are involved in the resistance of Toropi to leaf rust. At Embrapa Trigo, adult plants flags leaves of the cultivar were inoculated with oily solution containing spores of the fungus, race B55 (MDT-MR). The control plants were inoculated only with oil in order to subtract its effect in the results. The RNA were extracted, purified and sent to the National Institute of Agricultural Botany – NIAB, Cambridge/England, to perform the sequencing and bioinformatics. Sequencing was performed via Illumina Pair-End by The Genome Analysis Centre – TGAC, Norwich/England. Bioinformatics analyzes were performed at NIAB and were finalized at the Multiuser Laboratory of Embrapa Informática Agropecuária and at Embrapa Trigo. These analyses involved: assembly of the reference

transcriptome, calculation of the differential expression and comparison with the genome of the cultivar Chinese Spring. Validation via RT-qPCR was performed at Embrapa Trigo using seven primers designed for the differentially expressed *contigs*. In the sequencing were obtained 463.371 *contigs* of which 19.633 were differentially expressed. The time after infection where more genes have had expression altered was 24 hours. Among the differentially expressed *contigs* the major metabolic pathways involved were generation of metabolic precursors and energy, catabolism, response to biotic and abiotic stimuli and stress and transport. The validation by RT-PCT had a mean correlation of 0.69. In addition to the various *contigs* with known function, many do not have homology in the databases. Genes with known and unknown function may represent novel genes to be used in the genetic breeding of the culture.

Keywords: *Triticum aestivum* L., leaf rust, RNA sequencing, RT-qPCR, bioinformatics.

1 INTRODUÇÃO

O trigo é uma cultura de importância econômica e alimentar. A produtividade mundial estimada para a safra de 2013/2014 foi de 715,1 milhões de toneladas (USDA, 2014). A produção nacional do grão, em contrapartida, para a safra de 2014 foi de somente 5,9 milhões de toneladas sendo o consumo deste cereal está estimado em 11,4 milhões de toneladas, o que requer uma importação de aproximadamente 5,5 milhões de toneladas (CONAB, 2014).

Dentre os vários fatores limitantes da cultura do trigo na região sul do Brasil, está a ferrugem-da-folha. Esta doença tem como agente causal o fungo *Puccinia triticina* o qual, por sua vez, tem alta capacidade de especialização fisiológica resultando no surgimento de várias novas raças do patógeno por ano. Acredita-se que esse surgimento seja resultado da superação dos genes de resistência pela raça do patógeno via mudanças em suas proteínas secretoras (BRUCE et al., 2014).

Barcellos & Chaves (2003) descreveram sessenta raças de *P. triticina* identificadas no Brasil, mas a frequência da raça é dependente da área produtora e da cultivar utilizada na região. Arduim et al. (2012) observaram que a raça mais predominante nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná era a MDK-MR (B55 4002). Em 2013, contudo, a raça mais predominante foi a TFT-MT (Camila Turra, informação pessoal), o que confirma a alta taxa de especialização e adaptação do patógeno.

O trigo foi introduzido no Brasil em 1534, quando cultivares italianas foram trazidas, contudo as mesmas não eram adaptadas ao clima brasileiro, havendo a necessidade de melhoramento genético intenso. Com êxito desse trabalho, em 1940 a cultivar Frontana foi lançada com as seguintes características: ciclo curto, resistência à ferrugem-da-folha pela presença dos genes *Lr13* e *Lr34*, resistência intermediária à fusariose e baixa estatura (SOUSA, 2001). Em 1965, a cv. Toropi (Petiblanco 8//Frontana 1971-37//Quaderna A) foi lançada na Estação Experimental de Júlio de Castilhos e essa, por sua vez, apresenta aumento na absorção, translocação e distribuição de fósforo, tolerância ao alumínio, resistência à fusariose e resistência de planta adulta à ferrugem-da-folha (APR). Diferentemente do seu parental Frontana, a cv. Toropi não possui o gene *Lr34*, que confere resistência parcial de planta adulta à ferrugem-da-folha (BOLTON et al., 2008). Além do gene *Lr34*, sabe-se que os seguintes genes também conferem resistência de planta adulta: *Lr12*, *Lr13*, *Lr22a*, *Lr22b*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr46*, *Lr48*, *Lr49*, *Lr67* e *Lr68* (MCINTOSH et al., 2013), porém a presença desses genes ainda não foi investigada em Toropi.

A resistência de planta adulta é devida a atuação de genes menores não específicos à raça, e por isso sua resistência não é superada tão facilmente pelo patógeno. Alguns genes que conferem esse tipo de resistência são sensíveis à temperatura e assim apresentam um aumento de eficiência em temperaturas elevadas, como é o caso do *Lr13* (GRDC, 2012).

Toropi continua apresentando resistência de planta adulta após 50 anos de seu lançamento. Sabe-se, contudo, que sua resistência

não é devida ao gene *Lr34*. Os trabalhos com esta cultivar iniciaram na década de 90 através de parcerias estabelecidas entre a Embrapa Trigo, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o Agricultural and Agri-Food Canada/Cereal Research Centre e atualmente com o National Institute of Agricultural Botany, Inglaterra. O trabalho pioneiro foi a tese de doutorado da pesquisadora Amarilis Labes Barcellos, a qual pela primeira vez confirmou que Toropi possui dois genes recessivos à ferrugem-da-folha e que um deles é responsável pela redução no tamanho das pústulas (BARCELLOS et al., 2000). Esses genes foram mapeados nos cromossomos 1A e 4D, via série monossômica e por AFLP, por Brammer (2000), sendo que a localização mais precisa nos cromossomos foi confirmada via marcadores microssatélites por Da-Silva et al. (2012). Ao mesmo tempo, Da-Silva (2006) iniciou os trabalhos de expressão gênica e validação de marcadores moleculares associados à resistência parcial, onde esta linha de pesquisa continua sendo desenvolvida até o momento na Embrapa Trigo.

Além disso, Wesp-Guterres et al. (2013) verificaram que a resistência em Toropi ocorre antes da formação dos haustórios, na fase pré-haustorial, restringindo a formação de estruturas infectivas primárias, apressórios e vesículas sub-estomatais.

O presente trabalho teve como objetivo identificar possíveis genes e rotas metabólicas envolvidas na defesa e resistência da cv. Toropi em resposta à infecção por *P. triticina*, visando elucidar quais os mecanismos envolvidos na resistência durável em trigo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Plantio

O plantio da cv. Toropi foi realizado em baldes contendo solo, substrato e vermiculita (1:1:1). Foram cultivadas seis plantas por balde, sendo 12 plantas por horário para as amostras inoculadas e seis plantas por horário para as amostras controle. As plantas foram mantidas em câmara-de-crescimento, na Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS, com condições assépticas, fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro e umidade de 80%. A inoculação foi realizada mediante pulverização na folha bandeira de plantas adultas na fase de espigamento, com uredíniosporos da raça B55 (MDT-MR) de *P. triticina*, suspensos em óleo mineral. As plantas controle foram inoculadas com óleo sem uredíniosporos. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara escura e úmida por um período de 24 horas. Posteriormente, os baldes foram transferidos para uma câmara-de-crescimento visando à confirmação da eficiência da inoculação a ser verificada em torno de 15 dias após a inoculação. As folhas bandeira das plantas inoculadas e das plantas controle foram coletadas nos horários de 0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação e armazenadas em tubos plásticos, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80°C , até o momento da extração do RNA.

Dois plantios foram realizados da mesma forma, um para extração do RNA e sequenciamento e outro para validação do RNA-Seq via RT-qPCR. O primeiro plantio foi realizado em fevereiro de 2013 e o segundo em dezembro de 2013.

2.2 Extração do RNA

Para o sequenciamento, o RNA foi extraído utilizando o kit RNaseasy Mini RNA kit (Qiagen), seguido da limpeza de DNA genômico com o kit Turbo DNA-free™ kit (Ambion), ambos de acordo com o protocolo dos fabricantes. A qualidade do RNA foi avaliada em Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) e a quantificação em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). O RNA foi precipitado com 1/10 do volume com acetato de sódio 3M pH 5.2 e com 2-3x do volume de etanol PA, colocado imediatamente em gelo seco e enviado ao National Institute of Agricultural Botany (NIAB), através da empresa World Courier do Brasil.

Para a validação do RNA-Seq via RT-qPCR, o RNA foi extraído utilizando Trizol® (Life Technologies), a purificação do RNA com Turbo DNA-free™ kit (Ambion) e a conversão à cDNA foi feita utilizando o SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-QPCR (Invitrogen), conforme os protocolos dos fabricantes.

2.3 Teste de qualidade das amostras pós-transporte

As amostras ao chegarem ao NIAB, foram ressuspendidas em água utilizando-se o seguinte procedimento: as amostras/tubos foram centrifugados a 13.800 g por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se ao precipitado 50 µL de etanol 70% e novamente centrifugou-se a 13.800 g por 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 40 µL de água livre de RNase. Das amostras, 2 µL foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo por 30 minutos a 50V.

2.4 Sequenciamento

No total, quatro horários após as inoculações das plantas com *P. triticina* foram sequenciados: 0, 6, 12 e 24 hai. Para cada horário três replicatas biológicas com inóculo e sem inóculo (controle) foram sequenciados gerando 24 bibliotecas. Somente amostras contendo 5 µg de RNA e RIN (RNA integrity number) com nota igual ou superior a 8 foram sequenciadas.

O sequenciamento das amostras foi realizado pelo The Genome Analysis Centre (TGAC) em Norwich na Inglaterra utilizando a metodologia Pair-End Illumina, conforme protocolo do fabricante (Figura 1), o qual envolve: quebra do RNA em fragmentos menores; reparo das extremidades e adenilação da extremidade 3'; ligação dos adaptadores; limpeza dos adaptadores não ligados e ligados entre si; enriquecimento dos fragmentos; remoção de produtos indesejados; validação para controle de qualidade e sequenciamento.

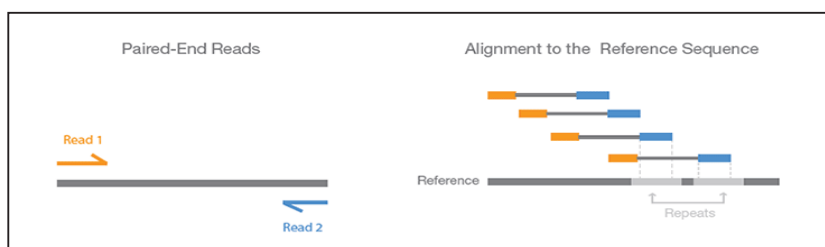


Figura 1 – Representação esquemática da metodologia Illumina pair end. Esta permite que ambos os lados do RNA sejam sequenciados, sendo que a distância entre os pares é conhecida. Fonte: Illumina website.

As análises de bioinformática foram realizadas no Laboratório Multiusuário da Embrapa Informática Agropecuária –

CNPTIA (qualidade, montagem do transcriptoma de referência, cálculo da expressão diferencial e anotação funcional) e na Embrapa Trigo (isolamento dos genes de interesse por função, tempo pós-inoculação e exclusivos de Toropi, anotação funcional das sequências selecionadas e estudo de relação ao processo de defesa).

2.4.1 Análise de qualidade

A qualidade das sequências obtidas no sequenciamento foi avaliada utilizando-se o software FastQC (BABRAHAM BIOINFORMATICS, 2012) e as regiões de baixa qualidade foram eliminadas das sequências utilizando-se o software FastX-Toolkit (“FASTX-TOOLKIT”, 2012). Esse filtro retira os nucleotídeos das extremidades das sequências a partir do cálculo do valor de Q deslizando em uma janela de tamanho ajustável. Os parâmetros utilizados foram: verificação nas extremidades 5' e 3'; janela de 5 nucleotídeos com deslizamento de base por base, sem limite de exclusão de bases; e bases com média de pontuação igual ou inferior a Q20. A pontuação Q20 na escala Phred corresponde a 1% de probabilidade de a base nucleotídica estar incorreta.

2.4.2 Montagem do transcriptoma de referência

Com o objetivo de reconstruir os transcritos presentes nas amostras, as bibliotecas filtradas foram processadas pelo software Trinity (GRABHERR et al., 2011). Este software constrói gráficos de Bruijn para representar computacionalmente cada um dos genes utilizando a informação de sobreposição entre as reads. Posteriormente, cada gráfico é analisado individualmente para reportar

a sequência de cada gene e de seus transcritos. Foram utilizados os parâmetros padrão do software.

2.4.3 Identificação de transcritos diferencialmente expressos

Para identificar os transcritos diferencialmente expressos foi utilizado o protocolo conhecido como RSEM (LI & DEWEY, 2011) que pode ser dividido em três etapas:

- Mapeamento das *reads* de cada amostra no transcriptoma de referência construído: os programas fornecidos no pacote RSEM possibilitam o mapeamento das *reads* no transcriptoma de referência utilizando-se o software Bowtie (LANGMEAD & SALZBERG, 2012), permitindo até 2 “mismatches” e tamanho mínimo e máximo de íntrons de 50 e 500.000pb, respectivamente;
- Quantificação do número de *reads* por transcrito em cada uma das amostras: são estimadas as abundâncias de cada transcrito, produzindo-se uma tabela de contagem de *reads* mapeadas por amostra;
- Análise estatística de expressão diferencial de transcritos entre as amostras: as tabelas de abundância de transcritos por amostra são agrupadas em uma única tabela possibilitando a análise estatística de expressão diferencial por diferentes programas. Seguindo o protocolo indicado no pacote RSEM, foi utilizado o software EdgeR (ROBINSON et al., 2010) para identificação dos transcritos de interesse. O EdgeR calculou a expressão diferencial dos transcritos a partir da matriz de abundâncias utilizando-se a distribuição binomial negativa. Foram utilizados os parâmetros padrão dos softwares.

2.4.4 Anotação funcional dos transcritos

Foi executado a partir do software Blast (ALTSCHUL et al., 1997) com o objetivo de inferir a função de cada um dos transcritos. Este software calcula a similaridade entre sequências produzindo informações sobre porcentagem de identidade e probabilidade da identidade ter ocorrido por acaso dado o tamanho do banco de dados. Os transcritos foram traduzidos para aminoácidos e comparados com o banco de dados Swiss-Prot (BOECKMANN, 2003) mantido pelo European Bioinformatics Institute (EBI). Esse banco de dados de alta qualidade possui um conjunto de proteínas não redundantes e anotadas manualmente.

O mesmo *software* foi utilizado para verificar quais sequências foram expressas na cv. Toropi e não estão presentes no conjunto de dados (genoma) da cultivar Chinese Spring (EMBL/Genbank ERP000319, BRENCHLEY et al., 2012, ftp://ftpmips.helmholtz-muenchen.de/plants/wheat/UK_454/), visando identificar quais sequências podem ser exclusivas da cv. Toropi, e ainda, quais sequências tiveram similaridade com *P. triticina* 1-1 BBBD Race 1 (NCBI ASM15152v1, IDs: 174908 [UID] 174908 [GenBank]), visando eliminar possíveis contaminações de sequências provenientes do fungo.

Com a finalidade de possibilitar melhor visualização dos resultados produzidos foi desenvolvido um programa em Python para agrupar os resultados de anotação com a lista de genes diferencialmente expressos. A expressão diferencial foi analisada dentre todas as bibliotecas, ou seja, cada horário inoculado com cada

horário controle, cada horário inoculado com cada horário inoculado e cada horário controle com cada horário controle (avaliação par-a-par).

Para seleção dos genes diferencialmente expressos exclusivos de Toropi e em presença do fungo foi desenvolvido um programa em Perl onde foram eliminadas as sequências com homologia em Chinese Spring, em *P. triticina* e as sequências diferencialmente expressas nas bibliotecas controle (pois estes podem representar genes constitutivos), restando somente sequências “exclusivas” de Toropi e diferencialmente expressas na presença do patógeno.

A anotação funcional e análise dos genes diferencialmente expressos bem como a construção gráfica foram realizadas utilizando a ferramenta Blast2GO® (CONESA et al., 2005).

2.4.5 Seleção de iniciadores (*primers*) para a validação do RNA-Seq via RT-qPCR

Contigs estatisticamente diferencialmente expressos provenientes do RNA-Seq e bioinformática foram selecionados aleatoriamente para construção dos iniciadores e análises via RT-qPCR. Os 21 pares de iniciadores (Tabela 1) foram desenhados utilizando a ferramenta Primer3Plus versão 2.3.5. Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia representada pela marca IDT- Integrated DNA Technologies.

Para o teste de eficiência dos iniciadores o RNA foi convertido à cDNA utilizando o kit SuperScript™ (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante.

Tabela 1 – Iniciadores desenhados para os *contigs* diferencialmente expressos, selecionados aleatoriamente, para validação do RNA-Seq e sua sequência

ID	Contig	Forward	Reverse
AL_1	comp104992_c2_seq8	CGGGCTATGGATCAAACAAC	TTTACATGGTCTGGCCCTTC
AL_2	comp107910_c4_seq3	GCATGTCAGGTGATGGTTTG	TGGCTGTGGACTAAACTTGC
AL_3	comp102511_c1_seq7	TTGCTCCGAGCTTATCTTCC	GAGCAATCAGGCAAAGCAAC
AL_4	comp106069_c2_seq84	CACAATGGTTGTGTCCCTTG	AGTAAAGTGGTGGCCAATGC
AL_5	comp102910_c2_seq7	AGCAGGAACAGAAACCATGC	TGCTTTTTCGCCTTCTACCC
AL_6	comp111707_c2_seq9	ATTGGTCCAGAAGACGTTGC	TTCGGTGTGTAAGCATCACG
AL_7	comp108884_c0_seq8	CAATGTCAAGGATCCCAAGG	CAGCCATGGACGATGTTATG
AL_8	comp100008_c3_seq16	TTGTATTGCACCACCCTCAG	TATGCATGTACTCGGCATCG
AL_9	comp107689_c3_seq9	GTGTATGCGGACAACATTGG	TCAAGCACAAGATGGTCGAG
AL_10	comp112052_c0_seq1	AACGTGCATCCAGTCTTCC	GAGTCCGGAATTCATGAGC
AL_11	comp105125_c0_seq1	TCCATCCAGCCATACCTTC	CGAGTTGCTTTGTGTTGAGG
AL_12	comp112226_c0_seq9	ATCCGTTTGCAACTCCTCTG	AAGCCTGTTGGCACAGAAAC
AL_13	comp100657_c1_seq1	GCAAAAAGAGTGGGCATCATC	GTTGACTGGGCAATCAAAGG
AL_14	comp100613_c1_seq6	TCCCGATGCGTATATGAAGG	TCAAGAAGTGC AAGCAGGTG
AL_15	comp101937_c0_seq13	TCCACTTTGCTGCCTGAATC	AACGTGGCGTTTCAGAAGTC
AL_16	comp107816_c1_seq8	CTCCTTCGCAGCCAAATATC	TAACAACCTCGCCAGAAGTCG
AL_17	comp110739_c0_seq3	ACAGCAACTTTCCACCTTG	AAAGAAGCTTGGAGGGGAAC
AL_18	comp101535_c6_seq1	GCCGGCATAACTTTCCTTTG	CCAAATCGAAGTCCAAGATGC
AL_19	comp102258_c1_seq3	TCGCGTAACGGTTCCTTCTC	TCATATGGTGGTGGGTATGG
AL_20	comp102026_c0_seq13	TCCCAAATCGGCTACTTCAG	TGTTCCCATCTCGAACTTCC
AL_21	comp104811_c1_seq9	GATTTGGCGTGTATGGAAGG	CAATTCACAAGGGCCTCTC

Foram misturados 5µL de cada cDNA a fim de fazer um bulk e deste bulk foram preparadas as seguinte diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000. A RT-qPCR foi realizado utilizando o kit Power SYBR® Green Master Mix (Life Technologies) e o *slope* (b), fator de amplificação e eficiência de amplificação foram calculados, conforme formulas:

$$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2}$$

$$\text{Eficiência da amplificação (E)} = (10^{(-1/b)} - 1)$$

$$\text{Fator de amplificação} = 1 + E$$

Valores de *slope* entre -3.1 e -3.6 são aceitáveis, pois geram eficiência entre 90 e 110%. Sendo assim, somente os iniciadores com valores de *slope* dentro desta faixa foram selecionados.

2.4.6 RT-qPCR

Para a análise de RT-qPCR, o RNA foi convertido à cDNA utilizando-se o kit SuperScript™ (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Cada amostra foi individualmente analisada com cada iniciador desenhado com valores de *slope* dentro da faixa recomendável, utilizando o kit Power SYBR® Green Master Mix (Life Technologies). O ciclo utilizado foi 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 10 s, 72 °C por 15s e 60 °C por 35 s; e então 95°C por 15 s, 60°C por 1 min e 95°C por 15 s.

Como normalizadores foram utilizados genes de expressão constitutiva *EF1* (elongation factor-1 α - MCGRANN et al., 2009), *GADPH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - CORAM et al., 2008) e *UBI* (ubiquitin - VAN RIET et al. 2006). O fator normalizador foi calculado através da ferramenta geNorm VBA, a qual calcula o fator normalizador baseado na média geométrica dos genes referência. Os resultados foram normalizados utilizando os valores de Ct's obtidos para os controles endógenos presentes na mesma reação. Para normalização foi utilizada a seguinte equação:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - C_{\text{controle endógeno}}$$

O aumento dos níveis de expressão do gene alvo para cada condição foi calculado através da equação:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

Como calibrador, foi utilizado o valor obtido para uma amostra específica, como por exemplo, o controle sem a presença do fungo. A quantificação relativa foi realizada através da fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram obtidos 2.798.981.764 *reads* nas 24 bibliotecas e foram montados 463.371 *contigs* no transcriptoma de referência, dos quais 19.633 foram diferencialmente expressos ao longo do tempo. Na comparação par-a-par verificou-se que genes diferentes se expressam tanto na comparação da biblioteca inoculada versus controle como ao longo do tempo (em relação ao tempo zero) (Tabela 2). Quando da comparação das bibliotecas inoculada *versus* controle (Figura 2) e tempo pós-inoculação *versus* zero (Figura 3) o tempo 24 foi o de maior número de *contigs* diferencialmente expressos. O número máximo de *contigs* comuns entre as comparações foram de um a três.

Considerando que no genoma de Chinese Spring foram identificados 99.386 genes codificantes até o momento (MAYER et al., 2014), isso indica que em Toropi muitos dos *contigs* obtidos podem se referir à um mesmo gene.

A partir dessas análises, percebeu-se que o tempo em que mais *contigs* foram diferencialmente expressos foi 24 horas após a inoculação tanto em comparação com o seu controle (1.631) como ao longo do tempo (1.469). Apesar de a biblioteca controle apresentar mais genes diferencialmente expressos, quando em comparação com a biblioteca inoculada em relação ao tempo zero (Figura 3), somente um contig (comp111059_c0_seq10) foi comum, indicando que outros genes expressos na biblioteca inoculada, que não os expressos na biblioteca controle, são ativados em resposta a infecção.

Tabela 2 – Quantitativo de *contigs* diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi, ao longo do tempo pós-inoculação com *P. triticina*, quando da comparação das bibliotecas obtidas via sequenciamento

Biblioteca	Quantidade de <i>Contigs</i>	
	Inoculada <i>versus</i> Controle	
0		100
6		422
12		250
24		1631
	Inoculada <i>versus</i> Zero	
6		479
12		458
24		1469
	Controle <i>versus</i> Zero	
6		1122
12		1475
24		3928

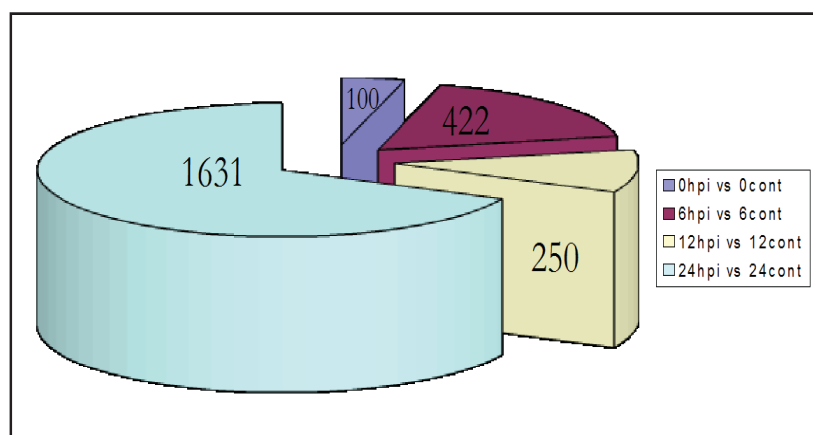


Figura 2 – Contagem de *contigs* diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi, ao longo do tempo de infecção por *P. triticina* (0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação), na comparação das bibliotecas inoculada (hpi) *versus* respectivo controle (cont), geradas via sequenciamento.

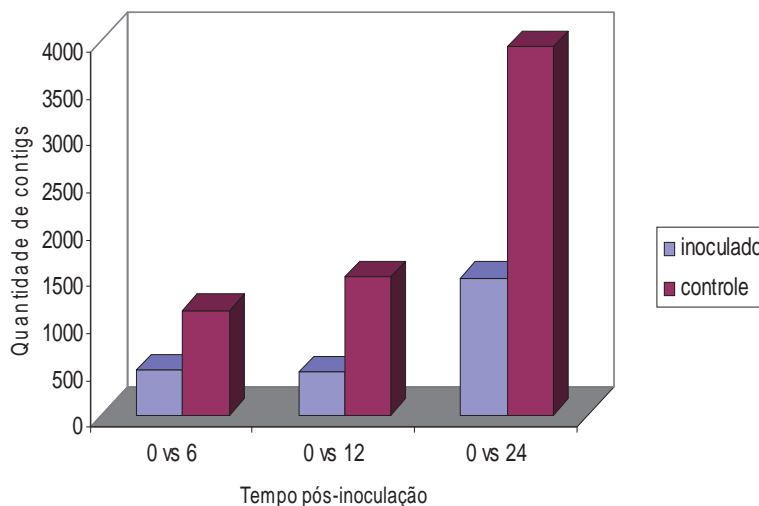


Figura 3 – Contagem de *contigs* diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi, ao longo do tempo de infecção por *P. triticina* (0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação), na comparação das bibliotecas inoculada e controle com seu respectivo controle tempo zero.

Ao longo do tempo, na biblioteca inoculada em relação ao seu zero, somente três *contigs* foram comuns do tempo 6 para o 12 (comp91660_c0_seq8, comp91660_c0_seq9 e comp99820_c1_seq4) e dois do tempo 12 para o 24 (comp91660_c0_seq8 e comp99820_c1_seq4), sendo dois os mesmos da comparação anterior.

Durante o desenvolvimento da doença se pode perceber que nem todos os processos biológicos se alteraram em função da infecção, porém a maioria deles foi ativada/induzida (Tabela 3).

Dos processos mais intimamente relacionados à defesa, todos tiveram pico de expressão 24 horas após a inoculação, inclusive os relacionados com a resposta ao estresse (Figura 4).

Tabela 3 – *Contigs* diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi e seu quantitativo por processo biológico em função do tempo/horário pós-inoculação/infecção (hai) em comparação ao seu respectivo tempo zero

Processo biológico	6 hai	12 hai	24 hai
Ciclo celular	5	8	11
Crescimento celular	9	11	23
Desenvolvimento embrionário	6	-	-
Desenvolvimento floral	8	7	15
Diferenciação celular	8	7	27
Estrutura anatômica/morfogênese	22	14	64
Fotossíntese	43	18	80
Geração de precursores metabólicos e de energia	50	20	119
Homeostase	10	5	30
Metabolismo de carboidratos	30	29	161
Metabolismo de lipídeos	31	19	120
Metabolismo secundário	5	5	34
Modificação celular de proteínas	59	48	122
Morte celular	9	7	24
Organização celular	44	40	163
Polinização	-	-	7
Processos biossintéticos	-	90	-
Processos catabólicos	35	33	138
Processos metabólicos DNA	9	13	30
Regulação da expressão gênica epigenética	-	-	6
Resposta a estímulos abióticos	45	45	128
Resposta a estímulos bióticos	18	15	67
Resposta a estímulos endógenos	22	20	53
Resposta a estímulos externos	21	16	14
Resposta ao estresse	51	62	191
Transdução de sinal	26	25	36
Translação	8	-	31
Transporte	45	25	137
Total	619	582	1831

Considerando o nível componente celular esses *contigs* estão dispersos tanto em nível celular, como de organela, membrana e região extracelular (Tabela 4). A função molecular também está dispersa desde funções relacionadas ao DNA até proteínas (Tabela 5).

Considerando que algumas sequências não tiveram resultados de BLAST e/ou não tiveram hits (não possuem função descrita) os totais com função conhecida são diferentes dos totais de *contigs* diferencialmente expressos encontrados. Apesar de não terem função conhecida, estes *contigs* podem representar novos genes a serem utilizados no melhoramento genético da cultura.

Tabela 4 – *Contigs* diferencialmente expressos ao longo do tempo (6, 12 e 24 horas após a inoculação) em trigo cv. Toropi em resposta à infecção por *P. triticina* e seu quantitativo por componente celular em função do tempo/horário pós-inoculação/infecção (hai) em comparação ao seu respectivo tempo zero

Componente celular	6 hai	12 hai	24 hai
Citoesqueleto	-	-	14
Citosol	15	15	53
Membrana plasmática	34	27	79
Mitocôndria	62	44	178
Núcleo	44		6
Nucleoplasma	-	7	-
Organela intracelular não ligado a membranas	7	9	-
Parede celular	6	9	44
Peroxisomo	8	5	27
Plastídeo	135	96	356
Região extracelular	32	25	90
Retículo Endoplasmático	5	6	12
Ribossomo	-	-	32
Tilacóide	53	20	114
Vacúolo	16	19	55
Total	417	282	1060

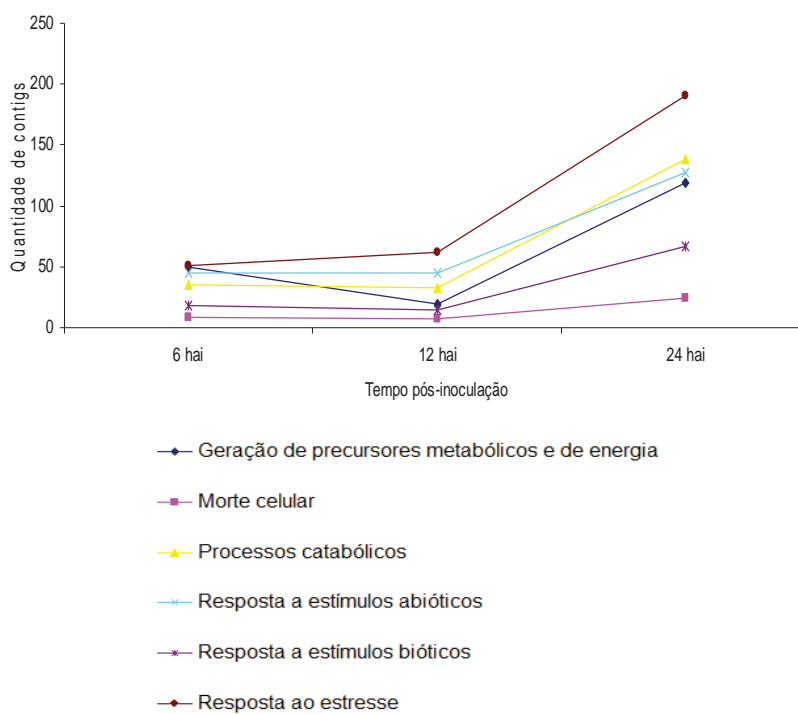


Figura 4 – *Contigs* diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi em resposta à infecção por *P. triticina* em função do tempo pós-infecção (6, 12 e 24 horas após a inoculação) em comparação ao seu respectivo tempo zero por processos biológicos relacionados com a defesa em trigo.

As espécies nas quais os *contigs* tiveram maior proporção de similaridade (BLAST) foram arroz (*Oriza sativa*), milho (*Zea mays*), *Aegilops tauschii* e cevada (*Hordeum vulgare*).

Em trigo, a formação da vesícula sub-estomatal e hifa infectiva ocorrem cerca de 6 hai, a diferenciação em células-mãe-de-haustório em 12 hai e a formação do haustório em 24 hai (HU & RIJKENBERG, 1998; WESP-GUTERRES et al., 2013).

Tabela 5 – *Contigs* diferencialmente expressos ao longo do tempo (6, 12 e 24 horas após a inoculação) em trigo cv. Toropi em resposta à infecção por *P. triticina* e seu quantitativo por função molecular em função do tempo/horário pós-inoculação/infecção (hai) em comparação ao seu respectivo tempo zero

Função molecular	6 hai	12 hai	24 hai
Atividade hidrolase	-	48	-
Atividade molecular estrutural	6	5	28
Atividade nuclease	5	-	11
Atividade quinase	24	30	66
Fator de transcrição ligado ao DNA			
sequência específica	20	20	26
Ligação ao carboidrato	-	5	9
Ligação à cromatina	5	9	14
Ligação à proteína	22	29	68
Ligação ao DNA	29	38	66
Ligação ao nucleotídeo	54	42	160
Ligação ao oxigênio	-	-	5
Ligação ao RNA	9	9	34
Receptor	-	-	5
Regulador enzimático	14	11	-
Transdução de sinal	-	6	8
Transporte	16	12	53
Total	204	264	553

Neste estudo, na cv. Toropi, o tempo 24 hai foi o que mais apresentou sequências diferencialmente expressas (Tabela 2 e Figuras 2 e 3), o que indica que a formação do haustório é a etapa que mais induz a expressão de genes na cultivar. Apesar disso, nota-se que o aumento da expressão de *contigs* já ocorre desde os primeiros momentos após infecção, pois houve um aumento de 4,2 vezes no quantitativo de *contigs* do tempo zero para o tempo 6 hai.

A produção de compostos de defesa exige alto custo energético e de nutriente para as plantas. Assim, as plantas somente

produzem esses compostos quando os patógenos são detectados (FREEMAN & BEATTIE, 2008). Em Toropi, a produção de compostos energéticos e geração de energia aumentaram significativamente em 24 hai (Figura 4). Isso indica que para esta cultivar o momento crucial para a indução de compostos de defesa ocorre após 24 hai, tempo que coincide com o aumento do catabolismo, indução de morte celular e resposta a estímulos bióticos, abióticos e ao estresse. Isso pode ocorrer, pois neste momento a planta reconhece que o sistema de defesa inicial/basal fora superado e que o processo infeccioso está progredindo, ou seja, a resistência pré-haustorial não foi capaz de deter o desenvolvimento do fungo e a formação de todos os haustórios.

A liberação de energia está relacionada ao catabolismo, o qual cliva moléculas, como sacarídeos, lipídeos e proteínas, a fim de liberar energia. O metabolismo de carboidratos e lipídeos aumentou em Toropi o que indica que a energia requerida para a defesa vem da clivagem principalmente destes dois componentes.

Diversas rotas metabólicas estão envolvidas no processo de defesa. Os processos de resposta a estresses bióticos e abióticos aumentaram (Tabela 2), e os *contigs* relacionados à resposta a estresses abióticos aumentaram mais significativamente que os bióticos. Isso ocorre porque essas rotas metabólicas estão interligadas e auxiliam na resposta de defesa conjuntamente, podendo induzir ou antagonizar um ao outro. Essa interação pode ser realizada via fatores de transcrição, cascatas quinase, espécies reativas de oxigênio, proteínas de choque de calor (HSP ou *heat shock proteins*) e pequenos RNA's (small RNA's) (ATKINSON & URWIN, 2012).

Dentre as alterações que ocorrem no metabolismo e fisiologia da planta em resposta ao estresse estão as alterações no metabolismo do oxigênio (produção e eliminação de espécies reativas), na entrada e saída de íons e água, alocação de carbono e nitrogênio (BOHNERT & SHEVELEVA, 1998). A entrada e saída de moléculas das células são realizadas a partir de transportadores de membrana via difusão simples ou facilitada, osmose, transporte ativo e/ou endocitose e exocitose, sendo que alguns processos requerem energia. Assim, o processo de defesa é suprido via transportadores de membrana e, por isso, a expressão de *contigs* relacionados com transporte e energia em Toropi aumentou ao longo do tempo de infecção.

O aumento do metabolismo na cv. Toropi em resposta à infecção por ferrugem-da-folha pode ser verificado pela quantidade de *contigs* que aumentaram de expressão (up-regulated) em comparação aos que diminuíram (down-regulated). Em 24 hai, 61% dos *contigs* tiveram sua expressão aumentada (Figura 5) quando em comparação ao seu tempo zero. Esse aumento não quer dizer que a resposta começou a partir de 24 hai, mas que mais genes são expressos para combater o patógeno.

Para validar os resultados obtidos pela bioinformática, sete iniciadores desenhados com valor de *slope* ideal, do total de 21 iniciadores desenhados para *contigs* diferencialmente expressos, foram avaliados (Figuras 6 e 7).

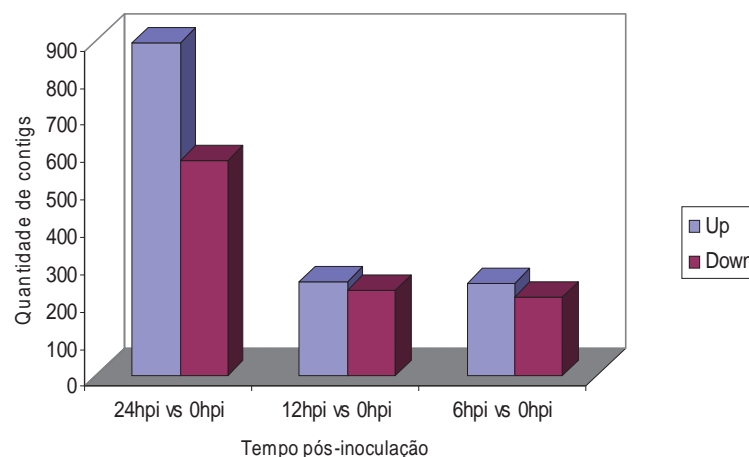


Figura 5 – Quantidade de *contigs* que tiveram aumento (*up-regulated*) ou diminuição (*down-regulated*) de expressão em trigo cv. Toropi em resposta à infecção por *P. triticina*, 24 horas após a inoculação, quando em comparação com seu respectivo tempo zero.

Os resultados obtidos via RT-qPCR, quando da divisão do valor de expressão do tempo x pelo seu zero (*fold-change*), mostraram que os resultados obtidos via RNA-Seq foram subestimados ou superestimados. Contudo, o comportamento da expressão ao longo do tempo foi similar para a maioria dos *contigs*. Esse resultado foi observado por Zhou et al. (2013), que verificaram diferenças de expressão entre o RNA-Seq e RT-qPCR, mas padrões de expressão similares. Isso pode ocorrer, pois, como se trata de um transcriptoma montado via bioinformática, um gene pode estar representando por vários *contigs* (RNA-Seq subestimando) ou um *contig* pode representar mais de um gene (RNA-Seq superestimando).

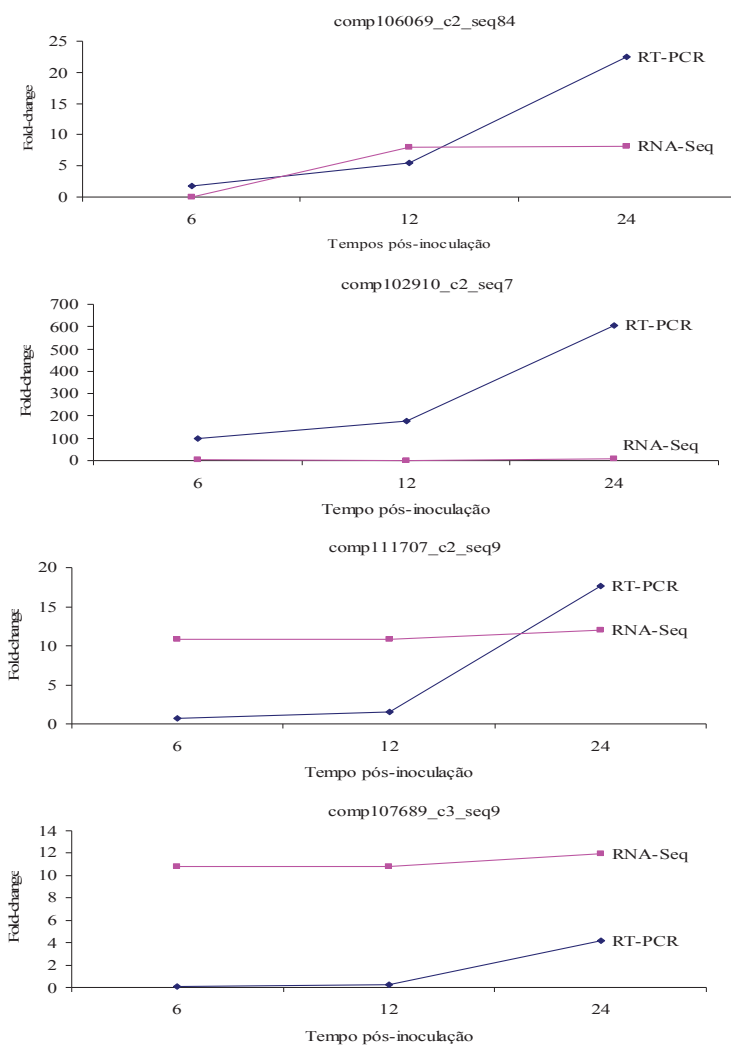


Figura 6 – Expressão dos *contigs* diferencialmente expressos (comp106069_c2_seq84, comp102910_c2_seq7, comp111707_c2_seq9, comp107689_c3_seq9) em trigo cv. Toropi ao longo do tempo pós-inoculação com *P. triticina*, selecionados aleatoriamente e analisados via RT-qPCR, e sua correlação com os resultados de *fold-change* obtidos via RNA-Seq e bioinformática.

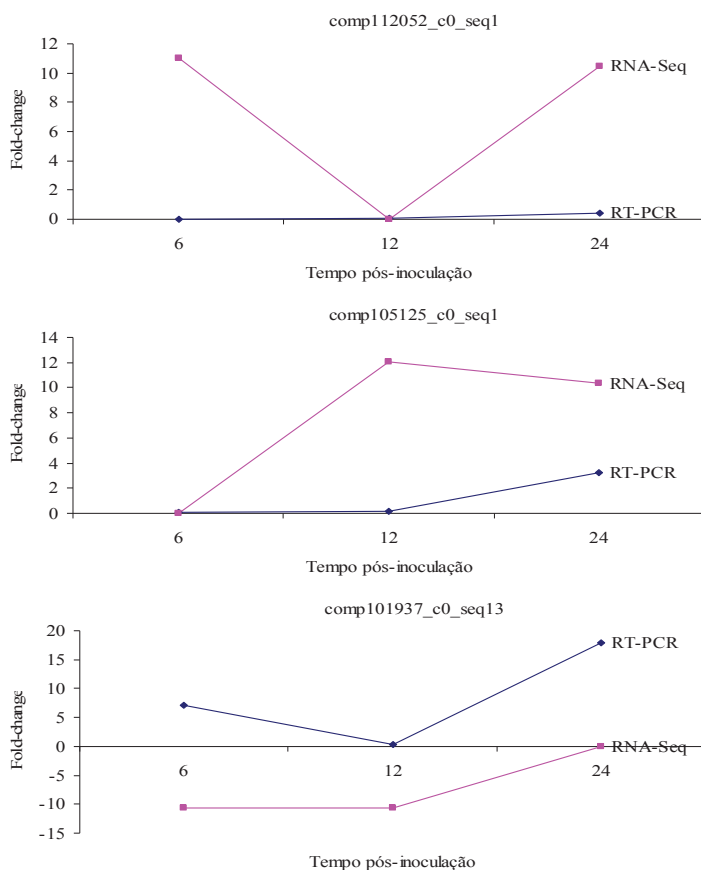


Figura 7 – Expressão dos *contigs* diferencialmente expressos (comp112052_c0_seq1, comp105125_c0_seq1, comp101937_c0_seq13) em trigo cv. Toropí ao longo do tempo pós-inoculação com *P. triticina*, selecionados aleatoriamente e analisados via RT-qPCR, e sua correlação com os resultados de *fold-change* obtidos via RNA-Seq e bioinformática.

A avaliação em diferentes tempos pós-expressão dificulta a exatidão dos dados. Contudo, na maioria dos casos, os pontos onde houve aumento ou diminuição de expressão, estes foram coincidentes (Figuras 6 e 7). Os valores de correlação de Pearson variaram de 0,39

a 0,99. Esses valores dependendo da referência podem ser considerados: por Cohen (1988) $r = 0,1$ a $0,29$ fraco, $r = 0,3$ a $0,49$ moderado e $r = 0,5$ a 1 forte; por Dancey & Reidy (2005) $r = 0,1$ a $0,3$ fraco, $r = 0,4$ a $0,6$ moderado e $r = 0,7$ a 1 forte. Considerando os descritores de Cohem (1988) os resultados de RT-qPCR tiveram correlação de moderada a forte com os resultados de RNA-Seq, sendo que a correlação média foi de $0,69$, considerada forte.

As dificuldades de se trabalhar com o genoma do trigo são várias, dentre elas: as estratégias e programas de bioinformática utilizados foram desenvolvidos para espécies modelos; o genoma de referência e as anotações funcionais em trigo ainda não estão disponíveis (sequenciamento e anotação funcional ainda em andamento); o tamanho do genoma do trigo é 40 vezes maior que o do arroz; seu genoma é hexaploide e altamente repetitivo (OONO et al., 2013); e, por isso, uma exatidão nos resultados com trigo é difícil.

Os *contigs* foram selecionados aleatoriamente para a análise de RT-qPCR, porém foram diferencialmente expressos. O gene CRK26 (Cysteine-rich receptor-like protein kinase 26), comp106069_c2_seq84, por exemplo, tem atividade catalítica que cliva “ATP + proteína” em “ADP + fosfoproteína” liberando energia (CHEN, 2001). Energia é requerida para clivagem, síntese e transporte de moléculas e íons e a liberação de energia é um dos processos que mais teve sua expressão aumentada em Toropi em resposta à infecção.

Em gramíneas, o ciclo dos ácidos hidroxâmicos DIBOA (2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one) e DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one) faz parte do sistema de defesa (Frey et al., 1997). O gene CYP71C4 (Indole-2-monooxygenase),

comp102910_c2_seq7, por sua vez é uma enzima que catalisa a reação do indol à indol-2-one que são metabólitos intermediários do ciclo de formação do DIBOA. Os ácidos hidroxâmicos estão presentes na planta principalmente como glucosídeos que são hidrolisados para as respectivas agliconas após lesão tecidual, considerando que estas têm atividade maior do que aquelas. Estes compostos têm atividade alelopática e de defesa contra insetos, afídeos e fungos (NIEMEYER, 2009).

O gene AAE16 (probable acyl-activating enzyme 16, chloroplastic), comp111707_c2_seq9, tem atividade catalítica e de ligase no metabolismo de ácidos graxos ativando ácidos graxos à proteínas carreadoras de acil e podem estar envolvidas na modulação da expressão de defesa via ácidos oléicos (KACHROO et al., 2004; CHANDRA-SHEKARA et al., 2007; KACHROO et al., 2008).

O gene CIPK32 (CBL – interacting protein kinase 32), comp107689_c3_seq9, tem atividade catalítica e de cofator. Quando uma proteína CBL se liga ao domínio NAF da proteína CIPK uma quinase dependente de cálcio é ativada. As proteínas quinase dependentes de cálcio podem atuar na sinalização de defesa, sendo ativadas por genes de defesa como o *Avr9* em tabaco (ROMEIS et al., 2000) e podem atuar na indução da resposta de hipersensibilidade (ROMEIS et al., 2001).

O WSD1 (O-acyltransferase WSD1), comp112052_c0_seq1, está envolvido na biossíntese de cutina. A barreira de cutina possui diversas funções e dentre elas se podem citar a defesa contra a penetração de patógenos, sinalização intracelular e

desencadeamento de defesas multifatoriais por seus produtos de degradação (CHASSOT et al., 2008).

Os fatores de transcrição Y (NF-Y) são fatores de transcrição sequência específicos que se ligam em complexos ao DNA nos sítios CCAAT. Três famílias dessas proteínas são conhecidas: NF-YA, NF-YB e NF-YC. Em Toropi, a expressão da proteína NF-YA-7 foi avaliada, comp105125_c0_seq1. Essas proteínas aumentaram o desempenho de *Arabidopsis* e milho em situações de estresse abiótico (NELSON et al., 2007), podendo estarem envolvidas na resistência de Toropi à ferrugem-da-folha ativando genes relacionados a defesa.

O gene NUDT8 (Nudix hidrolase 8), comp101937_c0_seq13, por sua vez, atua como mediador da hidrólise de derivados de nucleosídeos difosfato. Sabe-se que o silenciamento do gene NUDT7 aumentou a expressão da resistência em *Arabidopsis* (GE & XIA, 2008). Contudo, não foram encontrados relatos de como a NUDT8 pode estar envolvida positiva ou negativamente no processo de defesa.

Para visualização dos *contigs* expressos somente na condição inoculada, uma subtração entre as bibliotecas foi realizada. Os totais de *contigs* diferencialmente expressos mostraram que 4.545 *contigs* foram expressos somente na situação inoculada, ou seja, em presença do patógeno. A comparação do transcriptoma de Toropi com o genoma da cv. Chinese Spring (BRENCHLEY et al., 2012) mostrou que 10.677 *contigs* diferencialmente expressos em Toropi não apresentaram homologia com Chinese Spring; 12 *contigs* diferencialmente expressos na cv. Toropi em presença do patógeno não apresentaram homologia na cv. Chinese Spring (Tabela 6). A cv.

Chinese Spring foi sequenciada utilizando a tecnologia 454. O sequenciamento está disponível no EMBL/Genbank sob número SRA ERP000319.

Dos 12 *contigs* diferencialmente expressos em presença do patógeno sem homologia no genoma de Chinese Spring, quatro sequências não tiveram resultado de BLAST. Os demais, como a protease *ulp1* atua na catálise da hidrólise de ligações peptídicas em uma cadeia polipeptídica por um mecanismo no qual o grupo sulfidrilo de um resíduo de cisteína no centro ativo atua como um nucleófilo. SUMO é uma proteína “ubiquitin-like” que se liga covalentemente à proteína alvo, na sua maioria, presente no núcleo. A *ulp1* controla positivamente ou negativamente a SUMO (SMITH et al., 2004). Essa proteína, por sua vez, está relacionada com o processo de defesa em tomate (*Solanum lycopersicum*) interagindo com a EIX (ethylene-inducing xylanase) reprimindo o sistema de defesa (HANANIA et al., 1999). O aumento da expressão da *ulp1* pode indicar que o sistema de defesa em Toropi está reprimindo a atuação da SUMO aumentando, conseqüentemente, a eficiência do sistema.

A metiltransferase *tarbp1* é uma provável S-adenosil-L-metionina-dependente metiltransferase que metila tRNAs em humanos. Em plantas a S-adenosil-L-metionina-dependente O-metiltransferase está envolvida na biosíntese de lignina, que é um importante fator na defesa contra infecções fúngicas prevenindo a penetração das estruturas fúngicas na célula hospedeira (ZUBIETAA et al., 2002).

Tabela 6 – *Contigs* diferencialmente expressos em trigo cv. Toropi em presença do patógeno sem homologia na cv. Chinese Spring

Contig	ID	Descrição da sequência BLAST
1	comp106421_c0_seq28	ulp1 protease c-terminal catalytic domain containing expressed
2	comp106421_c0_seq3	ulp1 protease c-terminal catalytic domain containing expressed
3	comp106421_c0_seq99	methyltransferase tarbp1
4	comp107749_c3_seq2	conserved protein
5	comp110960_c5_seq1	hypothetical protein HMPREF9610_00001, partial
6	comp35690_c0_seq1	---NA---
7	comp70781_c1_seq1	---NA---
8	comp76079_c0_seq2	---NA---
9	comp76079_c0_seq3	---NA---
10	comp87576_c0_seq1	secreted protein
11	comp89478_c2_seq4	protein tar1
12	comp92828_c4_seq4	conserved protein

(NA) no hit. Sem descrição nas bases de dados.

Os *contigs* comp107749_c3_seq2 e comp92828_c4_seq4 representam proteínas conservadas envolvidas no metabolismo de carboidratos e polissacarídeos, respectivamente. Já o contig comp110960_c5_seq1 (proteína hipotética HMPREF9610_00001) está descrita nos bancos de dados como não caracterizada, assim como o contig comp87576_c0_seq1 que está caracterizado como proteína secretada, mas não possui ontologia.

TARI é um gene que codifica uma aminotransferase relacionada ao triptofano envolvida na biossíntese de auxina. O metabolismo da auxina, por sua vez, é influenciado pelo metabolismo secundário do sistema de defesa (NORMANLY, 2010), o que explica sua expressão diferencial durante a infecção em Toropi.

O fato de não possuírem homologia ou pequena homologia (não significativa estatisticamente) em Chinese Spring e de serem expressos na condição de presença do patógeno, nos diz que esses genes em Toropi possuem uma peculiaridade no sistema de defesa dessa cultivar. O fato de quatro *contigs* não possuírem descrição/anotação funcional ressalta a importância desses *contigs* no entendimento de mecanismos ainda não descritos envolvidos na defesa de trigo contra a ferrugem-da-folha.

4 CONCLUSÕES

- A resposta de defesa na cv. Toropi se inicia logo nos primeiros momentos de contato com o patógeno, sendo que a maior expressão gênica se dá no momento da formação do haustório pelo patógeno;
- O tempo pós-infecção onde mais *contigs* são diferencialmente expressos é 24 h, tanto ao longo do tempo como em comparação ao seu respectivo controle;
- As principais rotas metabólicas alteradas durante o processo de infecção por ferrugem-da-folha em Toropi são: geração de precursores metabólicos e energia; catabolismo; resposta a estímulos bióticos e abióticos e ao estresse; e transporte;
- Vários *contigs* não possuem resultado de BLAST, podendo representar novos genes a serem utilizados no melhoramento genético da cultura assim como outros genes com função conhecida, mas ainda não utilizados;
- Doze *contigs* são expressos somente na presença do patógeno e não possuem homologia na cultivar Chinese Spring;
- Quatro *contigs* dentre os doze não possuem anotação funcional e podem representar uma nova visão no entendimento de mecanismos ainda não descritos envolvidos na defesa de trigo contra a ferrugem-da-folha.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As pesquisas com a cv. Toropi se iniciaram em 1994 e, desde então, vários trabalhos foram e estão em desenvolvimento. O presente estudo buscou identificar quais mecanismos e genes estão envolvidos na resistência de planta adulta duradoura na cultivar Toropi, o que, por sua vez, propicia a geração de conhecimento sobre esse tipo de resistência e sua potencial aplicação no melhoramento genético da cultura do trigo.

Os resultados obtidos foram inéditos e extremamente significativos, sendo que a partir destes, muitos outros trabalhos poderão ser desenvolvidos e/ou complementares, principalmente do ponto de vista genético-fitopatológico. A partir dos dados gerados nesta tese, se tem como perspectivas:

- Mapear a totalidade de sequências diferencialmente expressas obtidas nos cromossomos de trigo;
- Avaliar o total de *contigs* diferencialmente expressos, sua sequência e função *in concerto*;
- Ancorar as sequências diferencialmente expressas via marcadores moleculares, previamente utilizados por Brammer (2000) e identificar possíveis sequências referentes aos genes *Trp-1* e *Trp-2*, via enriquecimento de função;
- Avaliar a expressão dos genes de *Puccinia triticina* informados nesta tese e estudar seu comportamento ao longo do tempo de infecção;
- Identificar outros possíveis genes candidatos para serem utilizados como constitutivos nos estudos de expressão gênica em trigo.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, G. K.; YONEKURA, M. I. Y.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *Journal of Chromatography B*, Groningen, v. 815, n. 1-2, p. 137-145, 2005.

AL-WHAIBI, M. H. Plant heat-shock proteins: a mini review. *Journal of King Saud University – Science*, Riyadh, v. 23, n. 2, p. 139-150, 2011.

ALEXOPOULUS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*, 4. ed. Nova Jersey: John Wiley and Sons, 1996. 880p.

ALMAGRO, L.; GÓMEZ ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELÓ, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v. 60, p. 377-390, 2009.

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 63, n. 10, p. 3523-3543, 2012.

BANSAL, B.; MIAN, M. A. R.; MITTAPALLI, O.; MICHEL, A. P. RNA-Seq reveals a xenobiotic stress response in the soybean aphid, *Aphis glycines*, when fed aphid-resistant soybean. *BMC Genomics*, Londres, v. 15, p. 972, 2014.

BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. *Origem e Evolução de Plantas Cultivadas*. Brasília, Editora Embrapa, 2008. 909p.

BARCELLOS, A. L.; ROELFS, A. P.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi. *Plant Disease*, Ames, v. 84, n. 1, p. 90-93, 2000.

BARCELLOS, A. L.; CHAVES, M. S. Epidemias de ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo - alterações na população do

patógeno de 1993 a 2002. In: SEMINARIO INTERNACIONAL RESITENCIA A ROY AS EM TRIGO, 3., 2003, La Estanzuela, Argentina. *Resúmenes ...* La Estanzuela: INIA, 2003. p. 13.

BESSUDO, A. *Molecular characterization of HSP80: a microtubule-associated protein in common wheat. Its gene copy number, location and expression*. Tese de Doutorado. Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 1996. Disponível em: <<http://lib-phds1.weizmann.ac.il/vufind/Record/000067583/Description>>. Acesso em: 17 jul. 2013.

BHATTARAI, K. K.; LI, Q.; LIU, Y.; DINESH-KUMAR, S. P.; KALOSHIAN, I. The MI-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 144, p. 312-323, 2007.

BOAVA, L. P.; CRISTOFANI-YALY, M.; MAFRA, V. S.; KUBO, K.; KISHI, L. T.; TAKITA, M. A.; RIBEIRO-ALVES, M.; MACHADO, M. A. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics*, Londres, v. 12, p. 39, 2011.

BOHNERT, H. J.; SHEVELEVA, E. Plant stress adaptations – making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology*, Saint Louis, v. 1, n. 3, p. 267-274, 1998.

BOLTON, M. D.; KOLMER, J. A.; XU, W. W.; GARVIN, D. F. *Lr34*-mediated leaf rust resistance in wheat: transcript profiling reveals a high energetic demand supported by transient recruitment of multiple metabolic pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 21, n. 12, p. 1515-1527, 2008.

BONASERA, J. M.; KIM, J. F.; STEVEN, V. B. PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology*, Londres, v. 6, n. 23, 2006. doi:10.1186/1471-2229-6-23.

BRAMMER, S. P. *Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (Triticum aestivum L. em Thell)*. 2000. 105 f. Tese (Doutorado em Genética e

Biologia Molecular) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BRENCHLEY, R.; SPANNAGL, M.; PFEIFER, M.; BARKER, G. L.; D'AMORE, R.; ALLEN, A. M.; MCKENZIE, N.; KRAMER, M.; KERHORNOU, A.; BOLSER, D.; KAY, S.; WAITE, D.; TRICK, M.; BANCROFT, I.; GU, Y.; HUO, N.; LUO, M. C.; SEHGAL, S.; GILL, B.; KIANIAN, S.; ANDERSON, O.; KERSEY, P.; DVORAK, J.; MCCOMBIE, W. R.; HALL, A.; MAYER, K. F.; EDWARDS, K. J.; BEVAN, M. W.; HALL, N. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*, Londres, v. 491, n. 7426, p.705-710, 2012.

BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; HAMMOND, P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. *New Phytologist*, Lancaster, v. 173, n. 4, p. 677-702, 2007.

BRODERICK, S. R.; WIJERATNE, S.; WIJERATN, A. J.; CHAPIN, L. J.; MEULIA, T.; JONES, M. L. RNA-sequencing reveals early, dynamic transcriptome changes in the corollas of pollinated petunias. *BMC Plant Biology*, Londres, v. 14, p. 307, 2014.

BRUCE, M.; NEUGEBAUER, K. A.; JOLY, D. L.; MIGEON, P.; CUOMO, C. A.; WANG, S.; AKHUNOV, E.; BAKKEREN, G.; KOLMER, J. A.; FELLERS, J. P. Using transcription of six *Puccinia triticina* races to identify the effective secretome during infection of wheat. *Frontiers in Plant Science*, Lausanne, v. 4, p. 520, 2014.

CASASSOLA, A.; BRAMMER, S. B.; CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; GRANDO, M. F.; DENARDIN, N. D. Gene expression: a review on methods for the study of defense-related gene differential expression in plants. *American Journal of Plant Sciences*, Irvine, v. 4, n. 12C, p. 64-73, 2013.

CHANDRA-SHEKARA, A. C.; VENUGOPAL, S. C.; BARMAN, S. R.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Plastidial fatty acid levels regulate resistance gene-dependent defense signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 104, n. 17, p. 7277-7282, 2007.

CHASSOT, C.; NAWRATH, C.; MÉTRAUX, J. P. The cuticle: Not only a barrier for plant defence. *Plant Signaling & Behavior*, Bonn, v. 3, n. 2, p. 142-144, 2008.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L.; GERMÁN, S.; SCHEEREN, P. L. ; DEL DUCA, L. J. A. ; SÓ-SILVA, M.; CAIERÃO, E. Population dynamics of *Puccinia triticina* in the South Cone region of South America from 1997 to 2004. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 7., 2005, Mar del Plata. *Abstracts...* Mar del Plata: INTA, 2005. p. 130.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L. Especialização fisiológica de *Puccinia triticina* no Brasil em 2002. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 31, n. 1, p. 57-62, 2006.

CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J. A.; WESP-GUTERRES, C.; GRAICHEN, F. A. S.; BRAMMER, S. P.; SCAGLIUSI, S. M.; DA-SILVA, P. R.; WIETHÖLTER, P.; TORRES, G. A. M.; LAU, E. Y.; CONSOLI, L.; CHAVES, A. L. S. The importance for food security of maintaining rust resistance in wheat. *Food Security*, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 157-176, 2013.

CHEN, A. A Superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 126, n. 2, p. 473-476, 2001.

CHOI, J.; KIM, K. T.; JEON, J.; LEE, Y. H. Fungal plant cell wall-degrading enzyme database: a platform for comparative and evolutionary genomics in fungi and Oomycetes. *BMC Genomics*, Londres, v. 14, p. S7, 2013.

CLAUS, J.; CHAVARRÍA-KRAUSER, A. Modeling regulation of zinc uptake via ZIP transporters in yeast and plant toots. *PLoS ONE*, São Franscisco, v. 7, n. 6, e37193, 2012.

COHEN, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2. ed. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, 1988. 590 p.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Acompanhamento da safra brasileira de grãos*. Décimo primeiro levantamento.

Agosto/2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 14 ago. 2014.

CONSORTIUM, A. I. M. Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science*, Washington, v. 333, p. 601-607, 2011.

CORAM, T. E.; SETTLES, M. L.; CHEN, X. M. Transcriptome analysis of high-temperature adult-plant resistance conditioned by *Yr39* during the wheat – *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction. *Molecular Plant Pathology*, Malden, v. 9, p. 479-493, 2008.

COUEY, H. M.; SMITH, F. G. Effect of cations on germination & germ tube development of *Puccinia coronata* uredospores. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 36, p. 14-19, 1961.

DA-SILVA, P. R. *Identificação de marcadores e caracterização de mecanismos moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo*. 2006. 137 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

DA-SILVA, P. R.; BRAMMER, S. P.; GUERRA, D.; MILACH, S. C. K.; BARCELLOS, A. L.; BAGGIO, M. I. Monosomic and molecular mapping of adult plant leaf rust resistance genes in the Brazilian wheat cultivar Toropi. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 11, n. 3, p. 2823-2834, 2012.

DANCEY, C.; REIDY, J. *Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 608 p.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, Washington, v. 341, n. 6147, p. 746-751, 2013.

DING, L.; XU, H.; YI, H.; YANG, L.; KONG, Z.; ZHANG, L.; XUE, S.; JIA, H.; MA, Z. Resistance to hemi-Biotrophic *Fusarium*

graminearum infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 6, n. 4, e19008, 2011.

DUVEILLER, E.; SINGH, P. K.; MEZZALAMA, M.; SINGH, R. P.; DABABAT, A. A. *Wheat diseases and pests: a guide for field identification*. Mexico: CIMMYT, 2012. 138 p.

DYCK, P. L.; KERBER, E. R. Resistance of the race-specific type. IN: ROELFS, A. P.; BUSHNELL, W. R. (Eds). *The Cereal Rusts: Diseases, distribution, epidemiology and control*. 2. ed. Orlando: Academic Press, 1985. p. 469-500.

DYCK, P.; SAMBORSKI, D. Adult-plant leaf rust resistance in PI 250413, an introduction of common wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 59, n. 2, p. 329-332, 1979.

ECKARDT, N. A. Aquaporins and chloroplast membrane permeability. *Plant Cell*, Norwich, v. 20, n. 3, p. 499, 2008.

ELLIS, J. G.; LAGUDAH, E. S.; SPIELMEYER, W.; DODDS, P. N. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in Plant Science*, Lausanne, v. 5, p. 641, 2014.

ESPINDULA, L. F.; MINELLA, E.; DELATORRE, C. A. Low-P tolerance mechanisms and differential gene expression. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1100-1105, 2009.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Raven Biology of Plants*. 8. ed. Columbus: McGraw-Hill Science, 2013. 880 p.

FAOSTAT. 2014. *Searchable online statistical database from Food and Agriculture Division of the United Nations*. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 03 jan 2015.

FERNANDES, J. M. C.; PICININI, E. C. *Controlando as doenças de trigo na hora certa*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999 (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 22). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co22.htm>. Acesso em: 12 ago 2013.

FLEMING, G. R.; SCHLAU-COHEN, G. S.; AMARNATHAB, K.; ZAKS, J. Design principles of photosynthetic light-harvesting. *Faraday Discussions*, Cambridge, v. 155, p. 27-41, 2012.

FOFANA, B.; BANKS, T. W.; MCCALLUM, B.; STRELKOV, S. E.; CLOUTIER, S. Temporal gene expression profiling of the wheat leaf rust pathosystem using cDNA microarray reveals differences in compatible and incompatible defence pathways. *International Journal of Plant Genomics*, Nova York, v. 2007, p. 17542, 2007.

FRAAIJE, B. A.; LOVELL, D. J.; COELHO, J. M.; BALDWIN, S.; HOLLOMON, D. W. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 107, n. 9, p. 905-917, 2001.

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. *An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores*. 2008. Disponível em: <<http://www.apsnet.org>>. Acesso em: 29 out. 2014.

FREY, M.; CHOMET, P.; GLAWISCHNIG, E.; STETTNER, C.; GRÜN, S.; WINKLMAIR, A.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; MEELEY, R. B.; BRIGGS, S. P.; SIMCOX, K.; GIERL, A. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*, Washington, v. 277, n. 5326, p. 696-699, 1997.

GAO, L.; TU, Z. J.; MILLETT, B. P.; BRADEEN, J. M. Insights into organ-specific pathogen defense responses in plants: RNA-seq analysis of potato tuber-*Phytophthora infestans* interactions. *BMC Genomics*, Londres, v. 14, p. 340, 2013.

GARRIDO, C.; SCHMITT, E.; CANDE, C.; VAHSEN, N.; PARCELLIER, A.; KROEMER, G. HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle*, Buffalo, v. 2, p. 579-584, 2003.

GE, X.; XIA, Y. The role of AtNUDT7, a Nudix hydrolase, in the plant defense response. *Plant Signaling & Behavior*, Bonn, v. 3, n. 2, p. 119-120, 2008.

GECHEV, T. S.; BREUSEGEM, F. V.; STONE, J. M.; DENEV, I.; LOLOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, Malden, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.

GENNARO, A.; KOEBNER, R. M.; CEOLONI, C. A candidate for *Lr19*, an exotic gene conditioning leaf rust resistance in wheat. *Functional and Integrative Genomics*, Heidelberg, v. 9, n. 3, p. 325-334, 2009.

GERMÁN, S. E.; CAMPOS, P.; CHAVES, M. S.; MADARIAGA, R.; KOHLI, M. Challenges in controlling leaf rust in the Southern Cone region of South America. In: BORLAUG GLOBAL RUST INITIATIVE, Technical Workshop, 2011, Saint Paul. *Anais...* Saint Paul: BGRI, 2011.

GRDC (Grains Research and Development Corporation). *Adult Plant Resistance Fact Sheet*. November, 2012. Disponível em: <<http://www.grdc.com.au>>. Acesso em: 8 ago. 2014.

GUEST, D. I.; BROWN, J. F. Plant defences against pathogens. In: BROWN, J.F.; OGLE, H.J. (Orgs.) *Plant Pathogens and Plant Diseases*. Rockvale Publications: Armidale, 1997. p. 263-286.

GUTZAT, R.; BORGHI, L.; FÜTTERER, J.; BISCHOF, S.; LAIZET, Y.; HENNIG, L.; FEIL, R.; LUNN, J.; GRUISSEM, W. Retinoblastoma-related protein controls the transition to autotrophic plant development. *Development*, Cambridge, v. 138, p. 2977-2986, 2011.

GUTZAT, R.; BORGHI, L.; GRUISSEM, W. Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends in Plant Science*, Cambridge, v. 17, p. 139-148, 2012.

HANANIA, U.; FURMAN-MATARASSO, N.; RON, M.; AVNI, A. Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death. *The Plant Journal*, Malden, v. 19, p. 533-541, 1999.

HERRERA-FOESSEL, S. A.; LAGUDAH, E. S.; HUERTA-ESPINO, J.; HAYDEN, M. J.; BARIANA, H. S.; SINGH, D.; SINGH, R. P. New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked. *Theoretical and Applied Genetics*, Heidelberg, v.122, n. 1, p.239-49, 2011.

HIEBERT, C. W.; THOMAS, J. B.; MCCALLUM, B. D.; HUMPHREYS, D. G.; DEPAUL, R. M.; HAYDEN, M. J.; MAGO, R.; SCHIPPENKOETTER, R.; SPIELMEYER, W. An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher*6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). *Theoretical and Applied Genetics*, Heidelberg, v.121, n. 6, p.1083-1091, 2010a.

HIEBERT, C. W.; FETCH, T. G.; ZEGEYE, T.; THOMAS, J. B.; SOMERS, D. J.; HUMPHREYS, D. G.; MCCALLUM, B. D.; CLOUTIER, S.; SINGH, D.; KNOTT, D. R. Genetics and mapping of seedling resistance to Ug99 stem rust in Canadian wheat cultivars 'Peace' and 'AC Cadillac'. *Theoretical and Applied Genetics*, Heidelberg, v. 122, v. 1, p. 143-149, 2010b.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, Oxford, v.42, n.5, p.462-468, 2001.

HIRANO, H.; HARASHIMA, H.; SHINMYO, A.; SEKINE, M. Arabidopsis retinoblastoma-related protein 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation. *Plant Molecular Biology*, Secaucus, v. 66, p. 259-275, 2008.

HORN, R.; PAULSEN, H. Early steps in the assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex: time-resolved fluorescence measurements. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 279, n. 43, p. 44400-6, 2004.

HU, G.; RIJKENBERG, F. H. J. Scanning electron microscopy of early infection structure formation by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on and in susceptible and resistant wheat lines. *Mycological Research*, Cambridge, v. 102, p. 391-399, 1998.

HULBERT, S. H.; BAI, J.; FELLERS, J. B.; PACHECO, M. G.; BOWDEN, R. L. Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance genes *Lr34/Yr18*. *Phytopathology*, Salinas, v. 97, n. 9, p. 1083-1093, 2007.

HWANG, C. S.; RHIE, G. E.; OH, J. H.; HUH, W. K.; YIM, H. S.; KANG, S. O. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*, Londres, v. 148, p. 3705-3713, 2002.

IBRAHEEM, O.; ADEWALE, I. O.; AFOLAYA, A. Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, Malden, v. 38, p. 584-590, 2005.

IBRAHIM, H. M. M.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; HUSSEIN, E. H. A.; EL-DIN, A. E. K. Y. G.; MOHAMMED, A. M. A.; MATTHEWS, B. F. Analysis of Gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. *BMC Genomics*, Londres, v. 12, p. 220, 2011.

JOHANSSON, I.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U.; LARSSON, C.; KJELLBOM, P. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta*, Cambridge, v. 1465, p. 324-342, 2000.

JOHNSON, R. A critical review analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 22, p. 309-330, 1984.

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

KACHROO, A.; VENUGOPAL, S. C.; LAPCHYK, L.; FALCONE, D.; HILDEBRAND, D.; KACHROO, P. Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 101, n. 14, p. 5152-5157, 2004.

KACHROO, A.; FU, D. Q.; HAVENS, W.; NAVARRE, D.; KACHROO, P.; GHABRIAL, S. A. An oleic acid-mediated pathway induces constitutive defense signaling and enhanced resistance to multiple pathogens in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 21, n. 5, p. 564-575, 2008.

KAMAL, A. H. M.; KIM, K. H.; SHIN K. H.; CHOI, J. S.; BAIK, B. K.; TSUJIMOTO, H.; HEO, H. Y.; PARK C. S.; WOO, S. H. Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. *Australian Journal of Crop Science*, Truro, v. 4, p. 196-208, 2010.

KENENI, G.; BEKELE, E.; IMTIAZ, M.; DAGNE, K. Genetic vulnerability of modern crops cultivars: causes, mechanism and remedies. *International Journal of Plant Research*, Rosemead, v. 2, n. 3, p. 69-79, 2012.

KLINK, V. P.; KIM, K. H.; MARTINS, V.; MACDONALD, M. H.; BEARD, H. S.; ALKHAROUF, N. W.; LEE, S. K.; PARK, S. C.; MATTHEWS, B. F. A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*. *Planta*, Heidelberg, v. 230, n. 1, p. 53-71, 2009.

KOHLI M. M. *Taller sobre la fusariosis de la espiga en America del Sur*. Mexico: CIMMYT, 1989. 144 p.

KOLMER, J. A. Enhanced leaf rust resistance in wheat conditioned by resistance gene pairs with *Lr13*. *Euphytica*, Secaucus, v. 61, n. 2; p. 123-130, 1992.

KOLMER, J. A. Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review in Phytopathology*, Palo Alto, v. 34, p. 435-55, 1996.

KOLMER, J. Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests*, Basel, v. 4, n. 1, p. 70-84, 2013.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. J. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 146, n. 3, p. 839-844, 2008.

KRATTINGER, S. G.; LAGUDAH, E. S.; SPIELMEYER, W.; SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; MCFADDEN, H.; BOSSOLINI, E.; SELTER, L. L.; KELLER, B. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, Washington, v. 323, p.1360-1363, 2009.

KRATTINGER, S. G.; LAGUDAH, E. S.; WICKER, T.; RISK, J. M.; ASHTON, A. R.; SELTER, L. L.; MATSUMOTO, T.; KELLER, B. *Lr34* multi-pathogen resistance ABC transporter: molecular analysis of homoeologous and orthologous genes in hexaploid wheat and other grass species. *The Plant Journal*, Malden, v. 6, n. 3, p. 392-403, 2011.

KRATTINGER, S. G.; JORDAN, D. R.; MACE, E. S.; RAGHAVAN, C.; LUO, M. C.; KELLER, B.; LAGUDAH, E. S. Recent emergence of the wheat *Lr34* multi-pathogen resistance: insight from haplotype analysis in wheat, rice, sorghum and *Aegilops tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics*, Heidelberg, v. 126, p. 663-672, 2013.

LAU, D.; SANTANA, F. M.; MACIEL, J. L. N.; FERNANDES, J. M. C.; COSTAMILAN, L. M.; CHAVES, M. S.; LIMA, M. I. P. M. Doenças do trigo no Brasil. In: PIRES, J.L.F.; VARGAS, L.; CUNHA, G.R. *Trigo no Brasil: bases para a produção competitiva sustentável*. 1. ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. p. 283-324.

LEONARD, K. J.; SZABO, L. J. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology*, Malden, v. 6, n. 2, p. 99-111, 2005.

LI, L.; POPKO, J. L.; ZHANG, X. H.; OSAKABE, K.; TSAI, C. J.; JOSHI, C. P.; CHIANG, V. L. A novel multifunctional O-methyltransferase implicated in a dual methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 94, p. 5461-5466, 1997.

LI, S.; TIGHE, S. W.; NICOLET, C. M.; GROVE, D.; LEVY, S.; FARMERIE, W.; VIALE, A.; WRIGHT, C.; SCHWEITZER, P. A.;

GAO, Y.; KIM, D.; BOLAND J.; HICKS, B.; KIM, R.; CHHANGAWALA, S.; JAFARI, N.; RAGHAVACHARI, N.; GANDARA, J.; GARCIA-REYERO, N.; HENDRICKSON, C.; ROBERSON, D.; ROSENFELD, J.; SMITH, T.; UNDERWOOD, J. G.; WANG, M.; ZUMBO, P.; BALDWIN, D. A.; GRILLS, G. S.; MASON, C. E. Multi-platform assessment of transcriptome profiling using RNA-seq in the ABRF next-generation sequencing study. *Nature Biotechnology*, Nova York, v. 32, n. 9, p. 915-925, 2014.

LIU, Y.; BURCH-SMITH, T.; SCHIFF, M.; FENG, S.; DINESH-KUMAR, S. P. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 279, p. 2101-2108, 2004.

LIU, G.; SHENG, X.; GREENSHIELDS, D. L.; OGIEGLO, A.; KAMINSKYJ, S.; SELVARAJ, G.; WEI, Y. Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 18, n. 7, p. 730-741, 2005.

LIU, B.; LU, Y.; XIN, Z.; ZHANG, Z. Identification and antifungal assay of a wheat beta-1,3-glucanase. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 31, n. 7, p. 1005-1010, 2009.

LIU, D.; CHEN, L.; DUAN, Y. Differential proteomic analysis of the resistant soybean infected by soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Race 3. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 160-167, 2011.

LONG, D. L.; KOLMER, J. A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. The American Phytopathological Society, Saint Paul, v. 79, p. 525-529, 1989.

LORAIN, A. E.; MCCORMICK, S.; ESTRADA, A.; PATEL, K.; QIN, P. RNA-Seq of Arabidopsis pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 162, n. 2, p. 1092-1109, 2013.

MAIMBO, M.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y.; YOSHIOKA, H.; KIBA, A. Induction of a small heat shock protein and its functional roles in *Nicotiana* plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 145, n. 4, p. 1588-1599, 2007.

MANICKAVELU, A.; KAWAURA, K.; OISHI, K., SHIN-I, T.; KOHARA, Y.; YAHIAOUI, N.; KELLER, B.; SUZUKI, A.; YANO, K.; OGIHARA, Y. Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines in common wheat infected by *Puccinia triticina*. *DNA Research*, Oxford, v. 17, n. 4, p. 211-222, 2010.

MARASAS, C. N.; SMALE, M.; SINGH, R. P. *The economic impact in developing countries of leaf rust resistance breeding in CIMMYT-related spring bread wheat*. 2004. Disponível em: <<http://econpapers.repec.org/>>. Acesso em: 18 ago. 2013.

MARSALIS, M. A.; GOLDBERG, N. P. *Leaf, stem and stripe rust diseases of wheat*. 2006. Disponível em: <<http://aces.nmsu.edu/>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

MAYER, K. F.; ROGERS, J.; DOLEŽEL, J.; POZNIAK, C.; EVERSE, K.; FEUILLET, C.; GILL, B.; FRIEBE, B.; LUKASZEWSKI, A. J.; SOURDILLE, P.; ENDO, T. R.; KUBALÁKOVÁ, M.; CÍHALÍKOVÁ, J.; DUBSKÁ, Z.; VRÁNA, J.; SPERKOVÁ, R.; SIMKOVÁ, H.; FEBRER, M.; CLISSOLD, L.; MCLAY, K.; SINGH, K.; CHHUNEJA, P.; SINGH, N. K.; KHURANA, J.; AKHUNOV, E.; CHOLET, F.; ALBERTI, A.; BARBE, V.; WINCKER, P.; KANAMORI, H.; KOBAYASHI, F.; ITOH, T.; MATSUMOTO, T.; SAKAI, H.; TANAKA, T.; WU, J.; OGIHARA, Y.; HANDA, H.; MACLACHLAN, P. R.; SHARPE, A.; KLASSEN, D.; EDWARDS, D.; BATLEY, J.; OLSEN, O. A.; SANDVE, S. R.; LIEN, S.; STEUERNAGEL, B.; WULFF, B.; CACCAMO, M.; AYLING, S.; RAMIREZ-GONZALEZ, R. H.; CLAVIJO, B. J.; WRIGHT, J.; PFEIFER, M.; SPANNAGL, M.; MARTIS, M. M.; MASCHER, M.; CHAPMAN, J.; POLAND, J. A.; SCHOLZ, U.; BARRY, K.; WAUGH, R.; ROKHSAR, D. S.; MUEHLBAUER, G. J.; STEIN, N.; GUNDLACH, H.; ZYTNIICKI, M.; JAMILLOUX, V.; QUESNEVILLE, H.; WICKER, T.;

FACCIOLI, P.; COLAIACOVO, M.; STANCA, A. M.; BUDAK, H.; CATTIVELLI, L.; GLOVER, N.; PINGAULT, L.; PAUX, E.; SHARMA, S.; APPELS, R.; BELLGARD, M.; CHAPMAN, B.; NUSSBAUMER, T.; BADER, K. C.; RIMBERT, H.; WANG, S.; KNOX, R.; KILIAN, A.; ALAUX, M.; ALFAMA, F.; COUDERC, L.; GUILHOT, N.; VISEUX, C.; LOAEC, M.; KELLER, B.; PRAUD S. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, Washington, v. 345, n. 6194, p. 1251788, 2014. doi: 10.1126/science.1251788.

MCDOWELL, J. M.; WOFFENDEN, B. J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, Cambridge, v. 21, n. 4, p. 178-183, 2003.

MCGRANN, G. R. D; TOWNSEND, B. J.; ANTONIW, J. F.; ASHER, M. J. C.; MUTASA-GÖTTGENS, E. S. Barley elicits a similar early basal defence response during host and nonhost interactions with *Polymyxa* root parasites. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 123, p. 5-15, 2009.

MCINTOSH, R. A.; YAMAZAKI, Y.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, J.; MORRIS, C.; APPELS, R.; XIA, X. C. *Catalogue of gene symbols for wheat*. 2013. Disponível em: <<http://www.shigen.nig.ac.jp>>. Acesso em: 23 dez 2014.

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

MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, Karnataka, v. 38, n. 2, p. 433-449, 2013.

NELSON, D. E.; REPETTI, P. P.; ADAMS, T. R.; CREELMAN, R. A.; WU, J.; WARNER, D. C.; ANSTROM, D. C.; BENSON, R. J.; CASTIGLIONI, P. P.; DONNARUMMO, M. G.; HINCHEY, B. S.; KUMIMOTO, R. W.; MASZLE, D. R.; CANALES, R. D.;

KROLIKOWSKI, K. A.; DOTSON, S. B.; GUTTERSON, N.; RATCLIFFE, O. J.; HEARD, J. E. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 104, n. 42, p. 16450-16455, 2007.

NIEMEYER, H. M. Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one: key defense chemicals of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Davis, v. 57, n. 5, p. 1677-1696, 2009.

NORMANLY, J. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Woodbury, v. 2, a001594, 2010.

OHM, H. W.; SHANER, G. E. Three components of slow leaf rusting at different growth stages in wheat. *Phytopathology*, Salinas, v. 66, p. 1356-1360, 1976.

OONO, Y.; KOBAYASHI, F.; KAWAHARA, Y.; YAZAWA, T.; HANDA, H.; ITOH, T.; MATSUMOTO, T. Characterization of the wheat (*Triticum aestivum* L.) transcriptome by de novo assembly for the discovery of phosphate starvation-responsive genes: gene expression in Pi-stressed wheat. *BMC Genomics*, Londres, v. 14, p. 77, 2013.

PARLEVLIET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, Lavras, v. 22, p. 7-15, 1997. Suplemento.

PRESCOTT, J. M.; BURNETT, P. A.; SAARI, E. E.; RANSON, J.; BOWMAN, J.; MILLIANO, W.; SINGH, R. P.; BEKELE, G. *Wheat diseases and pests: a guide for field identification*. México: CIMMYT, 1986. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov>>. Acesso em: 3 jan. 2015.

PUNJA, Z. K.; ZHANG, Y. Y. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology*, Loudonville, v. 25, n. 4, p. 526-540, 1993.

RIZHISKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 134, p. 1683-1696, 2004.

ROELFS, A. P. Resistance to leaf and stem rusts in wheat. In: SIMMONDS, N.W.; RAJARAM, S. (Eds.). *Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat*. México: CIMMYT, 1988. p. 10-22.

ROMEIS T.; PIEDRAS, P.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase (CDPK) in the plant defense response. *Plant Cell*, Norwich, v. 12, n. 5, p. 803-815, 2000.

ROMEIS, T.; LUDWIG, A. A.; MARTIN, R.; JONES, J. D. G. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *The EMBO Journal*, Malden, v. 20, n. 20, p. 5556-5567, 2001.

ROY, S. S.; WHEATLEY, R. W.; KAPOOR, M. Homology modeling, ligand docking and in silico mutagenesis of neurospora Hsp80 (90): insight into intrinsic ATPase activity. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, Nottingham, v. 44, p. 54-69, 2013.

RUBIALES, D; NIKS, R. E. Combination of mechanisms of resistance to rust fungi as a strategy to increase durability. In: ROYO, C.; NACHIT, M.; DI FONZO, N.; ARAUS, J. L. (Eds.). *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges*. Options Méditerranéennes: Séria A. Séminaires Méditerranées, v. 40, p. 333-339, 2000.

RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 104, n. 4, p. 1109-1112, 1994.

SAREEN, P.; KUMAR, S.; KUMAR, U.; PRASAD, L.; SINGH, A. K.; SINGH, R.; JOSHI, A. K. Pathological and molecular characterizations of slow leaf rusting in fifteen wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) genotypes. *African Journal of Biotechnology*, Bowie, v. 11, n. 84, p. 14956-14966, 2012.

SAWHNEY, R. N.; SHARMA, J. B.; SHARMA, D. N. Adult plant resistance genes with potential for durability to *Puccinia recondita* in wheat. *Wheat Information Service*, Yokohama, v. 83, p. 33-34, 1996.

SELA-BUURLAGE, M. B.; PONSTEIN, A. S.; BRES-VLOEMANS, S. A.; MELCHERS, L. S.; VAN DER ELZEN, P. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 101, p. 857-863, 1993.

SENTHILKUMAR P.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; MANDAL, A. K. Suppressive subtractive hybridization approach revealed differential expression of hypersensitive response and reactive oxygen species production genes in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) leaves during *Pestalotiopsis thea* infection. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Philadelphia, v. 168, n. 7, p. 1917-1927, 2012.

SEO, P. J.; LEE, A. K.; XIANG, F.; PARK, C. M. Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell Physiology*, Oxford, v. 49, p. 334-44, 2008.

SHAMRAI, S. N. Plant immune system: basal immunity. *Cytology and Genetics*, Heidelberg, v. 48, n. 4, p. 258-271, 2014.

SHEN, W.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus infection up-regulates the expression of two *Arabidopsis* protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 142, p. 1642-1655, 2006.

SINGH, R. P. Genetic association of gene *Bdv1* for tolerance to barley yellow dwarf virus with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rusts in bread wheat. *Plant Disease*, Ames, v. 77, p. 1103-1106, 1993.

SINGH, A.; MANTRI, S.; SHARMA, M.; CHAUDHURY, A.; TULI, R.; ROY, J. Genome-wide transcriptome study in wheat identified candidate genes related to processing quality, majority of them

showing interaction (quality x development) and having temporal and spatial distributions. *BMC Genomics*, Londres, v. 15, p. 29, 2014.

SMITH, M.; BHASKAR, V.; FERNANDEZ, J.; COUREY, A. J. *Drosophila Ulp1*, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cytoplasmic SUMO conjugates. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 279, p. 43805-43814, 2004.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, Malden, v. 67, n. 1, p. 6-20, 2009.

SOUSA, C. N. A. *Contribuição das cultivares de trigo de Strampelli para o melhoramento de trigo no Brasil*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 5 p. html, 2 tab. (Embrapa Trigo. Documentos Online; 7). Disponível em <<http://www.cnpt.embrapa.br>>. Acesso em: 3 set. 2014.

SPIELMEYER, W.; MCINTOSH, R. A.; KOLMER, J.; LAGUDAH, E. S. Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, Heidelberg, v. 111, n. 4, p. 731-735, 2005.

SUN, B.; LI, D. C.; CI, X. Y.; GUO, R. F.; WANG, Y. Induction, purification and antifungal activity of beta-1, 3-glucanase from wheat leaves. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, Beijing, v.30, n.4, p. 199-404, 2004.

TAYLOR, C. B. Defense responses in plants and animals - more of the same. *Plant Cell*, Norwich, v. 10, n. 6, p. 873-876, 1998.

TUFAN, H. A.; STEFANATO, F. L.; MCGRANN, G. R. D.; MACCORMACK, R.; BOYD, L. A. The Barley stripe mosaic virus system used for virus-induced gene silencing in cereals differentially affects susceptibility to fungal pathogens in wheat. *Journal of Plant Physiology*, Toronto, v. 168, n. 9, p. 990-994, 2011.

UEHLEIN, N.; OTTO, B.; HANSON, D. T.; FISCHER, M.; MCDOWELL, N.; KALDENHOFF, R. Function of *Nicotiana*

tabacum aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell*, Norwich, v. 20, p. 648-657, 2008.

USDA (United States Department of Agriculture). *World agricultural supply and demand estimates*. October 10, 2014. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 15 out. 2014.

VALE, F. X. R.; PARLEVLIET, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 3, p. 577-589, 2001.

VALLURU, R.; VAN DEN ENDE, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v. 59, p. 2905-2916, 2008.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Michigan, v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review in Phytopathology*, Palo Alto, v. 44, p. 135-62, 2006.

VAN DEN ENDE, W.; DE CONINCK, B.; VAN LAERE, A. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends in Plant Science*, Cambridge, v. 9, p. 523-528, 2004.

VAN RIET, L.; NAGARAJ, V.; VAN DEN ENDE, W.; CLERENS, S.; WIEMKEN, A.; VAN LAERE, A. Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v. 57, p. 213-223, 2006.

WALLING, L. L. The myriad of plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, Heidelberg, v. 19, p. 195-216, 2000.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics*, Londres, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WANG, Z.; ZHANG, J.; JIA, C.; LIU, J.; LI, Y.; YIN, X.; XU, B.; JIN, Z. *De Novo* characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* tropical race 4 infection. *BMC Genomics*, Londres, v. 13, p. 650, 2012.

WESP-GUTERRES, C.; MARTINELLI, J. A.; GRAICHEN, F. A. S.; CHAVES, M. S. Histopathology of durable adult plant resistance to leaf rust in the Brazilian wheat variety Toropi. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 181-196, 2013.

WILCOXSON, R. D. Genetics of slow rusting in cereals. *Phytopathology*, Salinas, v. 71, n. 9, p. 898-992, 1981.

WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence response. *Acta Physiologiae Plantarum*, Heidelberg, v. 19, n. 4, p. 581-589, 1997.

YANG, B.; SRIVASTAVA, S.; DEYHOLOS, M. K.; KAV, N. N. V. Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Science*, Davis, v. 173, p. 156-171, 2007.

YANG, F.; LI, W.; JORGENSEN, H. J. L. Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e81606, 2013.

YE, G.; SMITH, K. F. Marker-assisted gene pyramiding for inbred line development: basic principles and practical guidelines. *International Journal of Plant Breeding*, Kagawa, v. 2, n. 1-2, p. 1-10, 2008.

YIN, C.; TENG, Y.; LUO, Y.; CHRISTIE, P. Proteomic response of wheat embryos to fosthiazate stress in a protected vegetable soil.

Journal of Environmental Sciences, Edmonton, v. 24, n. 10, p. 1843-1853, 2012.

YOSHIOKA, M.; UCHIDA, S.; MORI, H.; KOMAYAMA, K.; OHIRA, S.; MORITA, N.; NAKANISHI, T.; YAMAMOTO, Y. Quality control of photosystem II: cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 281, p. 21660-21669, 2006.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, Malden, v.14, n. 6, p.415-421, 1974.

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

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

ZHANG, H.; YANG, Y.; WANG, C.; LIU, M.; LI, H.; FU, Y.; WANG, Y.; NIE, Y.; LIU, X.; JI, W. Large-scale transcriptome comparison reveals distinct gene activations in wheat responding to stripe rust and powdery mildew. *BMC Genomics*, Londres, v. 15, p. 898, 2014.

ZHONG, R.; MORRISON, W. H.; HIMMELSBACH, D. S.; POOLE, F. L.; YE Z. H. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiology*, Glasgow, v. 124, n. 2, p. 563-578, 2000.

ZHOU, X.; WANG, K.; LV, D.; WU, C.; LI, J.; ZHAO, P.; LIN, Z.; DU, L.; YAN, Y.; YE, X. Global analysis of differentially expressed genes and proteins in the wheat callus infected by *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS One*, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e79390, 2013.

ZOU, J.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; ALDEA, M.; LI, M.; ZHU, J.; GONZALEZ, D. O.; VODKIN, L. O.; DELUCIA, E.; CLOUGH, S. J. Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 18, n. 11, p. 1161-1174, 2005.

ZUBIETAA, C.; KOTAC, P.; FERRERD, J. L.; DIXONC, R. A.; NOEL, J. P. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. *The Plant Cell*, Norwich, v. 14, n. 6, p. 1265-1277, 2002.

ANEXOS



Contents lists available at ScienceDirect

Physiological and Molecular Plant Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pmpp

Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. Toropi

Alice Casassola^{a,*}, Sandra P. Brammer^b, Márcia S. Chaves^b, José A. Martinelli^c,
Francesca Stefanato^d, Lesley A. Boyd^{d,e}^a Agronomy Post-Graduate Program, University of Passo Fundo, BR285, Passo Fundo, Rio Grande do Sul 99052900, Brazil^b Department of Biotechnology and Phytopathology, Brazilian Agricultural Research Corporation, BR285, Km294, Passo Fundo, Rio Grande do Sul 99001970, Brazil^c Department of Fitossanidade, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 7712, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91540000, Brazil^d Department of Genetics and Pre-Breeding, National Institute of Agricultural Botany, Huntingdon Road, Cambridge, Cambridgeshire CB3 0LE, UK^e Department of Life and Medical Sciences, University of Hertfordshire, Hatfield, Hertfordshire AL10 9AB, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 19 December 2014

Available online 27 December 2014

Keywords:

*Puccinia triticina**Triticum aestivum* (L.) thell

Pre-haustorial

Wheat breeding

Quantitative PCR

ABSTRACT

Leaf rust, caused by the foliar pathogen *Puccinia triticina* is a major disease of wheat in the southern region of Brazil and invariably impacts on production, being responsible for high yield losses. The Brazilian wheat cultivar Toropi has proven, durable adult plant resistance (APR) to leaf rust, which uniquely shows a pre-haustorial resistance phenotype. In this study we aimed to understand the interaction between *P. triticina* and the pre-haustorial APR in Toropi by quantitatively evaluating the temporal transcription profiles of selected genes known to be related to infection and defense in wheat. The expression profiles of 15 selected genes varied over time, grouping into six expression profile groups. The expression profiles indicated the induction of classical defence pathways in response to pathogen development, but also the potential modification of Toropi's cellular status for the benefit of the pathogen. Classical defence genes, including peroxidases, β -1,3-glucanases and an endochitinase were expressed both early (pre-haustorial) and late (post-haustorial) over the 72 h infection time course, while induction of transcription of other infection-related genes with a potential role in defence, although variable was maintained through-out. These genes directly or indirectly had a role in plant lignification, oxidative stress, the regulation of energy supply, water and lipid transport, and cell cycle regulation. The early induction of transcription of defence-related genes supports the pre-haustorial resistance phenotype in Toropi, providing a valuable source of genes controlling leaf rust resistance for wheat breeding.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations: APR, adult plant resistance; qPCR, quantitative PCR; hai, hours after inoculation; PR, pathogenesis-related; MIP, major intrinsic proteins; ROS, reactive oxygen species; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; G6DPH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; ZIP5, putative zinc transporter; COMT1, caffeic acid O-methyltransferase; HSP80, heat shock protein 80; PRA2, class III peroxidase; LTP, type I non-specific lipid transfer protein precursor; WCAB, chlorophyll *a/b*-binding protein WCAB precursor; AQP1, aquaporin; FRFX, fructan exohydrolase; RBR1, retinoblastoma related protein 1; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; LHC, light-harvesting complex; PTI, PAMP-Triggered-Immunity; ETI, Effector-Triggered-Immunity.

* Corresponding author. Tel.: +55 54 33165944.
E-mail addresses: 69976@upf.br (A. Casassola), sandra.brammer@embrapa.br (S.P. Brammer), marcia.chaves@embrapa.br (M.S. Chaves), jamfito@ufrgs.br (J.A. Martinelli), francesca.stefanato@niab.com (F. Stefanato), lesley.boyd@niab.com (L.A. Boyd).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.12.004>

0885-5765/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

In 2012/2013 Brazilian wheat production reached 5.5 million tons, of which 94.5% was produced in the southern region of the country [1]. Leaf rust is a major constraint to wheat production in this area, causing yield losses of up to 80% [2,3]. Chemical control of leaf rust in Brazil costs around US\$ 30/ha and generally requires two sprays per crop [4]. In South America lost wheat production due to leaf rust is estimated to cost the industry 172 million dollars per year.

Breeding for wheat leaf rust resistance is complicated by the high level of genetic variation within the Brazilian *Puccinia triticina* population, exemplified by the pathogen's ability to rapidly overcome major resistance genes, resulting in new races [5].

Therefore, sources of durable APR, such as that found in the Brazilian cv. Toropi, have considerable value for Brazilian wheat breeding.

The bread wheat cv. Toropi (*Triticum aestivum* L.) was released as a commercial cultivar in 1965 with a partial level of APR to leaf rust (Fig. 1) which still remains effective despite 50 years of cultivation [6]. The APR in Toropi is a valuable “slow-rusting” type of resistance, being effective, while producing little or no selection pressure on the pathogen [7,8]. The APR in Toropi also displays a unique, pre-haustorial phenotype, restricting the formation of the primary infection structures; stomatal appressoria and sub-stomatal vesicles [9].

Although Toropi is derived from the cultivar Frontana there is no evidence that it contains the well characterized slow-rusting leaf rust APR gene *Lr34* [10]. Two recessive genes have been reported to be associated with the leaf rust APR in Toropi, temporary designated *Trp-1* and *Trp-2* [10]. *Trp-1* and *Trp-2* were located to chromosomes 1A and 4D, respectively [11]. In addition to leaf rust APR Toropi has a number of other agronomically important characteristics, including increased phosphorus absorption, translocation and distribution, tolerance to aluminum toxicity [12] and resistance to Fusarium head blight [13].

To identify the resistance mechanisms, genes and genetic pathways underlying the slow-rusting leaf rust APR in Toropi transcriptomics analyses were undertaken, looking at differential gene expression in Toropi flag leaf tissue at defined time points after *P. triticina* inoculation. Leaf tissue was sampled at eight time points after inoculation, including time points that represented the early stages of the pathogen’s development and the pre-haustorial resistance in Toropi. The transcript profiles of 15 selected genes, previously identified as having a role in the cellular interactions between wheat, and both adapted and non-adapted isolates of the foliar pathogens causing leaf rust, powdery mildew and wheat blast (L. Boyd, unpublished data), were measured over the eight time points by quantitative PCR (qPCR). The putative function of these wheat infection-related genes in the colonization of wheat tissues by *P. triticina* and the pre-haustorial, leaf rust APR in Toropi is discussed.

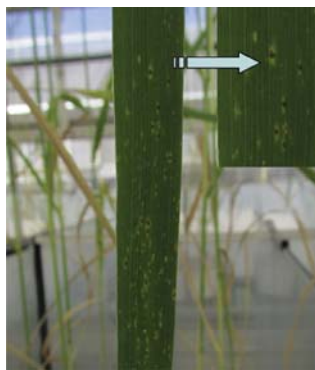


Fig. 1. Leaf rust phenotype on the wheat cv. Toropi. The adult plant leaf rust resistance in Toropi is characterized by a mixture of small, off-white to yellow flecks characteristic of necrotic and chlorotic plant reactions, and by the occasional leaf rust pustule. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Material and methods

Wheat-*P. triticina* inoculations and sampling

The wheat cv. Toropi was grown at 14 h light/10 h dark and 80% humidity until full expansion of the first flag leaf. Flag leaves were inoculated with urediniospores of *P. triticina*, race MDT-MR – Lr virulence: *Lr1*, *Lr3*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr17*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr30* [14] – in a mineral oil suspension. Mock inoculations were carried out using the same mineral oil without urediniospores. After inoculation plants were maintained at 80% humidity, in total darkness for 24 h, before being returned to normal growing conditions. Leaf rust infection was verified 15 days post inoculation (Fig. 1).

Twelve *P. triticina* inoculated flag leaves and six mock-inoculated flag leaves were collected from individual plants at each of the following time points; 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h after inoculation (hai). Total RNA was extracted from all flag leaf samples using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) and DNA removed using TURBO DNA-free™ Kit (Ambion), according to the manufacturer’s protocols.

Selection of candidate infection-related genes and quantitative PCR analysis

Wheat genes were selected for analysis from a global wheat transcriptomics study involving inoculation with adapted and nonadapted isolates of the fungal pathogens *Blumeria graminis*, *Magnaporthe grisea/oryzae*, and *P. triticina/hordei* (L. Boyd; unpublished data). Differentially expressed probe sets were selected from the Agilent wheat microarray (<http://www.genomics.agilent.com>) that represented unique wheat unigenes. Ten wheat genes (Table 1) were selected that showed differential transcript profiles across 4 time points (12, 24, 36 and 48 hai) following inoculation with *P. triticina* and/or *P. hordei* (data not shown).

Primers were designed for qPCR using Primer3Plus. Toropi RNA samples from each time point were converted to cDNA using the SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™) according to the manufacturer’s protocol. PCR amplification levels were normalized using geNorm (geNorm program v3.5) and three reference genes, ubiquitin [15], GAPDH and elongation factor-1 α [16]. GeNorm calculates the normalization factor based on multiple control genes, resulting in more accurate and reliable normalization of gene expression data than is normally obtained using a single gene for normalization [17].

All qPCR were performed using SYBR® Green JumpStar™ Taq ReadyMix™ (Sigma–Aldrich) at 95 °C for 2 min; 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 15 s; and then 95 °C for 15 s, 60 °C for 15 s and 95 °C for 15 s. The specificity of the reaction was verified by melt curve analysis and the efficiency of each primer was checked using the standard curve method [16,18]. Primers with slopes between –3.1 and –3.6, and reaction efficiencies between 90 and 110% were selected for the analysis (Table 1). Primers previously designed by Tufan et al. [18] for standard defence-related genes were also assessed (Table 2). The qPCR for each gene, on each of 3 biological replicates, was repeated 3 times.

Transcript levels of all 15 infection-related wheat genes in *P. triticina* inoculated flag leaf tissue were compared to the levels of transcript in the mock-inoculated control samples, at each time point, providing relative transcript levels for each gene. Three biological replicates were analyzed at each time point. The expression value for each biological replicate was an average of the normalized technical replicates. Relative expression values of the three inoculated biological replicates, at each time point were obtained by dividing each biological replicate by the average of the mock expression values at each time point.

Table 1
Agilent probe sets selected for qPCR.

Probe	Gene annotation	Abbreviation	Sequence (forward and reverse)	GenBank accession no.
A_99_P156537	glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6DPH	TCGTGTCAGTTC AAGGATG CATGTAGCATGGCTTCTGATGGC	AB029454
A_99_P136820	putative zinc transporter ZIP 5	ZIP5	AGTTGGGTATTGTGTGCAAC ACATCTGGTGAAGCTCAAGG	AK331366
A_99_P589522	caffeic acid O-methyltransferase	COMT1	ACCTGCACATGATCATCTC ACTCGATGGCAATGCCTTG	AY226581
A_99_P238786	heat shock protein 80	HSP80	TGATTGGCCAGTTTGGTGTG TGTGCTTGTGCTGTCACAATG	U55859
A_99_P421267	class III peroxidase	PRA2	AACATCAACACTGCCTTCGC AGGTTGGTGTAGTGGCGTTG	AY506496
A_99_P446157	type 1 non-specific lipid transfer protein precursor	LTP	TGCCATCGTTGCTATCG TGCGTGTATGTGACCTCAAC	TC400994
A_99_P215566	chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	WCAB	TGTGCAAGCTATCTCAGG ACAAAGTGTGGTGGCAATGC	TC382127
A_99_P624287	aquaporin	AQP1	TGCTCAGACACTGGATCTTC TGCATCTTCTTTCAGCAG	DQ867075
A_99_P112790	fructan exohydrolase	FREX	TTGACACCGAGAAGCATTCG TGCAACACAGTTTGTCTCTC	AB089271
A_99_P105865	retinoblastoma related protein 1	RBR1	TACCCTCAAGCCTTGTGTG TGATCGCCACCACTTTTG	AY941772

Relative gene transcript levels were analyzed using ANOVA to identify significant differences between the expression levels of the 15 genes. The Tukey's test was used to determine which time points were significantly different, using the software InfoStat, version 2012 [19]. The relative abundance of gene transcripts at each time point was compared as a proportion of the total transcript abundance across all time points. This provides a time course transcript profile for each infection-related gene allowing genes with similar profiles to be placed in to expression groups.

Results and discussion

P. triticina enters wheat leaf tissues via stomata. Urediniospores germinate on the leaf surface forming an appressorial swelling above a stomatal opening within 3 hai. An appressorial hyphae grows through the stomatal opening, into the sub-stomatal cavity, where a sub-stomatal vesicle forms by 6 hai [20]. Infection hyphae develop from the sub-stomatal vesicle and contact with plant mesophyll cells results in the differentiation of haustorial mother cells around 12 hai, leading to the formation of haustorial feeding structures within living plant cells around 24 hai [20,21]. Wesp-Guterres et al. [9] demonstrated that in Toropi a large proportion of infection attempts were stopped before the formation of haustoria, i.e. pre-haustorial resistance. Significantly fewer appressoria developed on Toropi compared to the susceptible wheat genotype, with a significantly smaller number of these appressoria going on to form sub-stomatal vesicles, infection hyphae and haustorial mother cells. Plant cell death, measured by trypan blue staining, was associated with up to 37% of attempted infection sites in Toropi, but not until much later in the infection process (120 hai), after *P. triticina* ingress had been halted [9].

Transcript analysis of ten selected infection-related genes (Table 1), plus 5 common defence-related genes (Table 2) in Toropi

at 8 time points after inoculation with *P. triticina* showed that the genes broadly grouped into six expression profiles (Fig. 2).

Profile 1 included a glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6DPH), a putative zinc transporter (ZIP5), a heat shock protein 80 (HSP80), a fructan exohydrolase (FREX), a retinoblastoma related protein 1 (RBR1) and PR10 (Fig. 2). These six genes exhibited fairly constant expression throughout the 72 h time course, with no significant differences being found across time points (Table 3; Supp. Fig. 1). Although FREX appeared to exhibit slightly higher levels of gene transcription at 12 hai (Fig. 2), this was not significant (Table 3). The plant Lipid Transfer Protein (LTP) and caffeic acid O-methyltransferase (COMT1) genes were identified as significantly different by the ANOVA analysis, so were placed in separate groups, Profile groups 2 and 3, respectively (Fig. 2). LTP peaked at 1 and 12 hai and COMT1 peaked at 24 hai (Table 3, Fig. 2).

While expression of these eight genes (Profiles 1, 2 and 3) occurred throughout the *P. triticina* infection time course, these genes may still play an important role in plant defence (Supp. Fig. 1). The well characterized pathogenesis-related gene PR10 encodes a phenylalanine ammonia-lyase (PAL), the first enzyme in the phenyl propanoid pathway, being required for the biosynthesis of flavonoids, phenyl propanoids and lignin. LTPs transport lipids across membranes and have been implemented in plant defence, having antibiotic properties [22] and through the creation of mechanical barriers such as cutin [23]. Moreover, as pathogen infection damages the cell wall and associated membrane, lipid transport would be required for tissue repair. COMT1 catalyzes key steps in the biosynthesis of monolignols, precursors of plant lignin. Two distinct methyltransferases are responsible for the methylation of lignin precursors: caffeic acid 3-O-methyltransferase and 5 hydroxyferulic acid. Lignin is a phenolic cell wall polymer covalently linked to the cellulose and hemicellulose components of the plant cell wall, and has been shown to assist in the transport of

Table 2
Primer sequences used for qPCR of common defense-related genes.

Target	Gene annotation	Forward primer	Reverse primer
PR1	β -1,3-glucanase	CAATAACCTCGCGTCTTCATCAC	TTATTACTCGCTCGGTCCCTCTG
PR2	β -1,3-glucanase	AAGCAGTTCGGGTCTTCAATCCG	CCAGCAGCTTATTCGAACCGAAA
PR4	Endochitinase	AAGTGCCTCAGGTGACGAA	TGAGCTGTGACAGATCTT
PR9	Peroxidase	CAAGTGAACCTGTGATGA	TTGAGATTCAACCGTGT
PR10	Phenylalanine ammonia-lyase	CAAGATGGTCCAGGCTTACC	CGAAGTCCATCATGAAGCAA

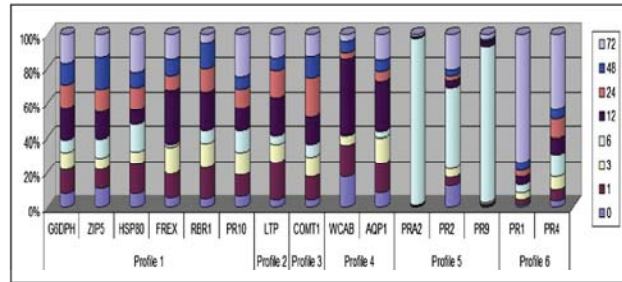


Fig. 2. Gene expression profiles in the wheat cv. Toropi in response to *Puccinia triticina* infection. Each bar represents one gene and the colors the relative transcript levels of that gene at each time point. Time points are hours after inoculation (hai). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

water and nutrients [24], as well as having a significant role in plant defence [25]. Lignification has been shown to be a significant defence mechanism in wheat to the stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [26], so may have a similar role in leaf rust resistance.

G6DPH helps maintain the levels of the co-enzyme NADPH, an important reducing agent that helps protect cells against oxidative damage through the maintenance of glutathione levels. ZIP5 is involved in zinc transport, zinc-superoxide dismutase being important in antioxidant defence [27–29]. Heat shock proteins, such as HSP80 function as molecular chaperones and play a critical role in protein folding and intracellular trafficking of proteins, in particular under heat and other stresses. FREX may release energy required to combat pathogen infection by removing terminal fructose molecules from fructans [15,30]. RBR1 controls the cell cycle transition from G1 to S and an increased expression of this protein in response to stress indicated that plants regulate the cytoskeleton, cell division and cell wall extension to survive [31].

Alternatively these genes could be up-regulated by *P. triticina* to aid the pathogen ingress and development, providing a preferred

carbohydrate source in the release of fructose, a supply of reducing energy in the form of NADPH, and zinc for fungal growth and metabolism. While the pathogen may recruit plant LTPs for the production of fungal membranes associated with fungal structures such as haustoria, maintaining the nutrient supply to the fungus [32], or manipulate plant cell division for its own ends.

AQP1 and WCAB peaked at 12 hai (Fig. 2 – Profile 4; Supp. Fig. 1). Aquaporins (AQP1) are integral membrane proteins, part of a larger family of major intrinsic proteins (MIP) which form pores in cell membranes. The plasma membranes of both animal and plant cells contain aquaporin pores through which water can flow more rapidly than by diffusion through the phospholipid bilayer. Aquaporins selectively conduct water molecules in and out of the cell, while preventing the passage of ions and other solutes. *P. triticina* effectors may stimulate AQP1 expression to increase aquaporin pore formation, thereby allowing a greater flow of water within the plant cell in readiness for haustorial development. On the other hand, some isoforms of aquaporins are known to facilitate H₂O₂ transport across the cell [33], having a role in tolerance to abiotic stresses such as drought, salt and cold [34,35]. AQP1 may therefore have an indirect role in fungal defence, as H₂O₂ serves as a signal molecule for induction of pathogenesis-related (PR) proteins leading to the accumulation of phenyl propanoid compounds and ROS detoxifying enzymes [36,37].

WCAB is part of the photosystem II complex in chloroplast. The light-harvesting complex (LHC) in plants is formed by chlorophylls A and B, and these chlorophyll A–B binding proteins, being involved with adhesion of granal membranes and photo-regulation through reversible phosphorylation of its threonine residues. Molecular oxygen is released as a by-product of the energy conversion process, and this could be used as a precursor for ROS production [38].

PRA2, PR2 and PR9 belong to Profile 5 (Fig. 2; Supp. Fig. 1). PRA2, PR2 and PR9 transcript levels peaked at 6 hai, at which time sub-stomatal vesicles are generally visible in Toropi. The expression profiles of these genes were similar (Table 3), suggesting a complementary role in the Toropi–*P. triticina* interaction. Peroxidases (PRA2 and PR9) are a broad group of enzymes that catalyze the reduction of peroxides, being divided into three classes based on sequence comparisons. Class I peroxidases are intracellular enzymes. Class II and III contain the secretory fungal and plant peroxidases, respectively. Plant peroxidases are involved in many physiological and developmental processes, from germination to senescence, having roles in plant cell wall formation and lignification, and the production of ROS [39]. NCBI defines PRA2 (gene

Table 3
Expression levels of all 15 selected genes analyzed with ANOVA and Tukey's test.

Time points	Profile 1					Profile 2		Profile 3
	G6DPH	ZIP5	HSP80	FREX	RBR1	PR10	LTP	COMT1
0 hpi	0.45 ^a	0.60 ^a	0.52 ^a	0.46 ^a	0.31 ^a	0.45 ^a	0.26 ^a	0.18 ^a
1 hpi	0.77 ^a	0.61 ^a	1.13 ^a	1.19 ^a	1.19 ^a	0.86 ^a	1.47 ^b	0.60 ^{ab}
3 hpi	0.55 ^a	0.39 ^a	0.47 ^a	1.32 ^a	0.91 ^a	0.94 ^a	0.68 ^{ab}	0.52 ^{ab}
6 hpi	0.42 ^a	0.59 ^a	1.04 ^a	0.15 ^a	0.47 ^a	0.87 ^a	0.35 ^a	0.32 ^{ab}
12 hpi	1.00 ^a	0.87 ^a	0.55 ^a	2.64 ^a	1.44 ^a	0.91 ^a	1.47 ^b	0.70 ^{ab}
24 hpi	0.76 ^a	0.71 ^a	0.86 ^a	0.74 ^a	0.89 ^a	0.81 ^a	1.04 ^{ab}	1.00 ^b
48 hpi	0.69 ^a	1.06 ^a	0.59 ^a	0.82 ^a	0.99 ^a	0.50 ^a	0.51 ^a	0.56 ^{ab}
72 hpi	0.95 ^a	0.72 ^a	1.47 ^a	1.24 ^a	0.32 ^a	1.74 ^a	0.91 ^{ab}	0.57 ^{ab}
Time points	Profile 4		Profile 5			Profile 6		
	WCAB	AQP1	PRA2	PR2	PR9	PR1	PR4	
0 hpi	2.73 ^{ab}	0.85 ^a	0.78 ^a	2.33 ^a	0.33 ^a	0.15 ^a	0.39 ^a	
1 hpi	2.78 ^{ab}	1.66 ^{ab}	0.62 ^a	0.84 ^a	0.74 ^a	0.39 ^a	0.75 ^a	
3 hpi	0.85 ^a	1.44 ^{ab}	0.39 ^a	0.98 ^a	0.69 ^a	0.56 ^a	0.91 ^a	
6 hpi	0.05 ^a	0.37 ^a	146.47 ^b	8.72 ^b	57.35 ^b	0.67 ^a	1.47 ^a	
12 hpi	6.82 ^b	2.88 ^b	0.96 ^a	0.79 ^a	1.75 ^a	0.62 ^a	1.06 ^a	
24 hpi	0.57 ^a	0.57 ^a	0.28 ^a	0.47 ^a	0.40 ^a	0.51 ^a	1.29 ^a	
48 hpi	1.01 ^a	0.64 ^a	0.59 ^a	0.64 ^a	0.78 ^a	0.64 ^a	0.69 ^a	
72 hpi	0.62 ^a	1.48 ^{ab}	1.67 ^a	3.85 ^a	1.70 ^a	10.11 ^b	4.98 ^b	

^{a, b} Expression values within rows marked with different lower case letters are those that differ significantly according to Tukey's test ($\alpha < 0.05$).

accession number: AY506496) as a *T. aestivum* class III root peroxidase (<http://www.ncbi.nlm.gov>; [40]), but in this study was found to be expressed in wheat leaves. PR2 is an β -1,3-glucanase, a group of enzymes known to play a major role in plant defense and general stress responses through the regulation of callose deposition [18]. However, glucan is also found in fungal cell walls and plant β -1,3-glucanases are able to hydrolyze fungal glucans. Induction of PRA2, PR2 and PR9 transcription 6 hai with *P. triticina* may therefore be part of a ROS signaling defence pathway, and/or required for cell wall modifications, such as callose deposition [41], to restrict pathogen invasion before the formation of haustoria.

PR1 and PR4 had similar expression profiles, Profile 6 (Fig. 2; Supp. Fig. 1). PR1 being a β -1,3-glucanase and PR-4 an endochitinase [42]. These proteins are involved in the degradation of fungal cell walls, being required for the hydrolysis of glucan and chitin, respectively. PR1 and PR4 transcripts peaked at 72 hai in Toropi, well after the appearance of haustoria, and presumably are targeting secondary hyphal growth. However, PR2, also a β -1,3-glucanase belonged to Profile 5, with the highest transcript levels being seen at 6 hai, followed by 72 hai. This would suggest that expression of PR genes, with potentially similar functions is triggered by different stages of *P. triticina* development.

Conclusions

The pre-haustorial resistance seen in Toropi towards the leaf rust pathogen *P. triticina* and the early levels of expression of LTP, WCAB, AQP1, PRA2, PR2, PR9, before visible haustoria formation at 24 hai indicates a possible PAMP-Triggered-Immunity (PTI) resistance response. While the subsequent expression of genes involved in lignin formation (COMT1) at 24 hai, PR1 and PR4 at 72 hai, would suggest an Effector-Triggered-Immunity (ETI) resistance response, leading to the hypersensitive cell death seen in 37% of *P. triticina*-Toropi infection sites at 120 hai [9]. The pre-haustorial leaf rust resistance in adult plants of Toropi is unusual, and phenotypically resembles non-host resistance in *Arabidopsis* to barley powdery mildew [43,44] and in barley to non-adapted rust species [45], where infection is suppressed early by pre-haustorial mechanisms without cell necrosis, with the few haustoria that may establish eliciting a post-haustorial hypersensitive response. Consequently, leaf rust APR in Toropi is an interesting and valuable source of resistance for Brazilian wheat breeding programs.

Acknowledgments

We thank the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) for the scholarship of Alice Casassola, the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC, UK) BB/K021435/1, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) 407853/2012-0 and Fundação do Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) 11/2075-0 for financial support. We acknowledge Sajid Rehman and Rients Niks, University of Wageningen, The Netherlands who were partners in the ERA-PG, Trit-NonHost project where the Agilent microarray analysis was undertaken.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2014.12.004>.

References

- [1] CONAB. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_14_11_56_28_boletim_graos_abril_2014.pdf [accessed 22.05.14].
- [2] Picinini EC, Fernandes JMC. Efeito de diferentes fungicidas sobre o rendimento de grãos, sobre o peso do hectolitro e sobre o controle da ferrugem da folha (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*), em trigo, cultivar BR 34. *Fitopatol Bras* 1995;20:319.
- [3] Oliveira GM, Pereira DD, Camargo LCM, Balan MG, Canteri MG, Igarashi S, et al. Control of wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) at different timings of fungicide application. *Arq Inst Biol* 2013;80(4):436–41.
- [4] Almeida AB, Chaves MS, Brammer SP, Baggio MIB. Identification of wheat leaf rust resistance accessions of *Aegilops tauschii*. *Fitopatol Bras* 2007;32(4):349–52.
- [5] Kolmer JA, Hanzalova A, Goyeau H, Bayles R, Morgounov A. Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. *Plant Pathol* 2012;62:21–31.
- [6] Zoldan SM, Barcellos AL. Postulation of genes (*Lr*) for resistance to leaf rust in Brazilian wheat cultivars. *Fitopatol Bras* 2002;27:495–9.
- [7] Martinez F, Niks RE, Singh RP, Rubiales D. Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas* 2001;135:111–4.
- [8] Singh RP, Huerta-Espino J. Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. *Euphytica* 2003;129:371–6.
- [9] Wesp-Gutierrez C, Martinelli JA, Graichen FAS, Chaves MS. Histopathology of durable adult plant resistance to leaf rust in the Brazilian wheat variety Toropi. *Eur J Plant Pathol* 2013;137:181–96.
- [10] Barcellos AL, Roelfs AP, Moraes-Fernandes MIB. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi. *Plant Dis* 2000;84:90–3.
- [11] Da-Silva PR, Brammer SP, Guerra D, Milach SC, Barcellos AL, Baggio MIB. Monosomic and molecular mapping of adult plant leaf rust resistance genes in the Brazilian wheat cultivar Toropi. *Genet Mol Res* 2012;11(3):2823–34.
- [12] Espindula LF, Minella E, Delatorre CA. Low-P tolerance mechanisms and differential gene expression. *Pesq Agrop Bras* 2009;44:1100–5.
- [13] Kohli MM. Taller Sobre la Fusariosis de la Espiga en America del Sur. Mexico: CIMMYT; 1989.
- [14] Bianchin V, Barcellos AL, Reis EM, Turra C. Genetic variability of *Puccinia triticina* Eriks. in Brazil. *Summa Phytopathol* 2012;38(2):113–8.
- [15] van Riet L, Nagaraj V, Van den Ende W, Clerens S, Wiemken A, Van Laere A. Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-oxohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot* 2006;57:213–23.
- [16] McGrann GRD, Townsend BJ, Antoniw JF, Asher MJC, Mutasá-Göttgens ES. Barley elicits a similar early basal defence response during host and nonhost interactions with polynymxa root parasites. *Eur J Plant Pathol* 2009;123:5–15.
- [17] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):research0034.1–0034.11.
- [18] Tufan HA, Stefanato FL, McGrann GRD, MacCormack R, Boyd IA. The Barley stripe mosaic virus system used for virus-induced gene silencing in cereals differentially affects susceptibility to fungal pathogens in wheat. *J Plant Physiol* 2011;168:990–4.
- [19] Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2012. Argentina, InfoStat Group. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- [20] Hu G, Rijkersergh FJH. Scanning electron microscopy of early infection structure formation by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on and in susceptible and resistant wheat lines. *Mycol Res* 1998;102(4):391–9.
- [21] Zhang L, Dickinson M. Fluorescence from rust fungi: a simple and effective method to monitor the dynamics of fungal growth in planta. *Physiol Mol Plant Pathol* 2001;59:137–41.
- [22] Boutrot F, Guirao A, Alary R, Joudrier P, Cautier M-F. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. *Biochim Biophys Acta* 2005;1730(2):114–25.
- [23] Kader J-C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 1996;47:627–54.
- [24] Tu Y, Rochfort S, Liu Z, Ran Y, Griffith M, Badenhorst P, et al. Functional analyses of caffeoyl-O-methyltransferase and cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Plant Cell* 2010;22(10):3357–73.
- [25] Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 1980;18:259–88.
- [26] Moldenhauer J, Pretorius ZA, Moerschbacher BM, Prins R, van der Westhuizen AJ. Histopathology and PR-protein markers provide insight into adult plant resistance to stripe rust of wheat. *Mol Plant Pathol* 2008;9:561–9.
- [27] Cakmak I. Possible role of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 2000;146:185–205.
- [28] Hwang C-S, Rhie G-E, Oh J-H, Huh W-K, Yim H-S, Kang S-O. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* 2002;148:3705–13.
- [29] Zhang Y, Qu Z, Zheng W, Liu B, Wang X, Xue X, et al. Stage-specific gene expression during urediniospore germination in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *BMG Genomics* 2008;9:203–13.

- [30] Slewinski TL. Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production. *J Exp Bot* 2012;63:4647–70.
- [31] Yin C, Teng Y, Luo Y, Christie P. Proteomic response of wheat embryos to fos-thiazate stress in a protected vegetable soil. *J Environ Sci* 2012;24(10):1843–53.
- [32] Cano LM, Raffaele S, Haugen RH, Saunders DGO, Leonelli L, MacLean D, et al. Major transcriptome reprogramming underlies floral mimicry induced by the rust fungus *Puccinia monoica* in *Boechera stricta*. *PLoS One* 2013;8(9):e75293.
- [33] Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O, Ludewig U. Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H₂O₂. *Biochem J* 2008;414:53–61.
- [34] Hu W, Yuan Q, Wang Y, Cai R, Deng X, Wang J, et al. Overexpression of a wheat aquaporin gene, TaAQP8, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol* 2012;53(12):2127–41.
- [35] Zhou S, Hu W, Deng X, Ma Z, Chen L, Huang C, et al. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS One* 2012;7(12):1–14.
- [36] Kuzniak E, Urbaneck H. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol Plant* 2000;22(2):195–203.
- [37] Pellinen RI, Korhonen M-S, Tauriainen AA, Palva ET, Kangasjarvi J. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiol* 2002;130(2):549–60.
- [38] Pospisil P. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *BBA-Bioenergetics* 1817:2012:218–31.
- [39] Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 2004;9:534–40.
- [40] Csizsar J, Pintér B, Kolbert Z, Erdei L, Tari L. Peroxidase activities in root segments of wheat genotypes under osmotic stress. *Acta Biol Szeged* 2008;52:155–6.
- [41] Oide S, Bejai S, Staal J, Guan N, Kaliff M, Dixelius C. A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 2013;200(4):1187–99.
- [42] van Loom LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 2006;44:135–62.
- [43] Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrinck E, Qui JL, et al. Snare-protein-mediated disease resistance at plant cell wall. *Nature* 2003;425:973–1007.
- [44] Assaad FF, Qiu J, Youngs H, Ehrhardt D, Zimmerli L, Kalde M, et al. The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell* 2004;15:5118–29.
- [45] Zhang HS, De La Rosa R, Rubiales D, Lubbers HH, Molenveld JW, Niks RE. Role of partial resistance to *Puccinia hordei* in barley in the defence of barley to inappropriate rust fungi. *Physiol Mol Plant Pathol* 1994;45:219–28.