

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**Papel da pectinase pectina metil-esterase no processo de infecção  
de *Eucalyptus grandis* por *Puccinia psidii*, agente causador da  
ferrugem em eucalipto**

**Nathalia Brancalleão**

Monografia apresentada para obtenção do  
título de Bacharel em Ciências Biológicas.  
Área de concentração Genética de  
microrganismos

**Piracicaba  
2015**

**Nathalia Brancalleão**  
**Graduanda em Ciências Biológicas - Bacharelado**

**Papel da pectinase pectina metil-esterase no processo de infecção de *Eucalyptus grandis* por *Puccinia psidii*, agente causador da ferrugem em eucalipto**

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

Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração Genética de microrganismos

**Piracicaba**  
**2015**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio incondicional, sem eles nada seria possível.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Labate, pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

A todos do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas da ESALQ-USP pelo apoio durante o projeto. Em especial à Dra. Mônica T. V. Labate por toda ajuda profissional e colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

À Professora Dra. Maria Carolina Quecine e à doutoranda Andressa Peres Bini por todo aprendizado e dedicação.

Ao Departamento de Genética da ESALQ-USP pelo suporte oferecido para o desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Nº processo: 2013/18115-9) pelo apoio financeiro concedido.

À República Forfé pela amizade e companheirismo durante a minha graduação.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. A importância do eucalipto	9
2.2. O patógeno	10
2.3. A ferrugem no eucalipto	10
2.4. Pectinases e seus inibidores	12
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Material Biológico	15
4.2. Desenho dos <i>primers</i>	15
4.3. Teste de especificidade dos <i>primers</i>	18
4.4. Purificação dos <i>amplicons</i> e sequenciamento	19
4.5. Coleta dos esporos de <i>P.psidii</i>	20
4.6. Delineamento experimental e coleta do material vegetal	20
4.7. Extração de RNA total e isolamento de mRNA	23
4.8. Síntese de cDNA	23
4.9. PCR quantitativo e análise da expressão gênica	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1. Desenho dos <i>primers</i>	24
5.2. Teste de especificidade dos <i>primers</i>	24
5.3. PCR quantitativo e análise da expressão gênica	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

## RESUMO

### **Papel da pectinase pectina metil-esterase no processo de interação de *Eucalyptus grandis* por *Puccinia psidii*, agente causador da ferrugem em eucalipto**

As pectinases são enzimas fundamentais para compreender o mecanismo de patogenicidade de alguns microrganismos. Elas são uma das primeiras enzimas que agem na degradação de polímeros encontrados na parede celular da célula vegetal, possibilitando a colonização do hospedeiro. A planta por sua vez, em resposta de defesa, ativa genes que vão produzir inibidores de pectinases para evitar a entrada desses microrganismos nos tecidos vegetais. Apesar da sua importância, pouco se conhece sobre esse mecanismo de resposta no sistema *Eucalyptus grandis* - *Puccinia psidii*. O presente projeto de pesquisa teve como objetivo avaliar a expressão da enzima pectina metil-esterase (PME) do patógeno *P. psidii* Winter, agente causal da ferrugem em mirtáceas, e dos inibidores de pectina metil-esterase (PMEI) da planta, durante o processo de interação. Para tanto, foram desenhados seis pares de *primers* para PME e quatro para PMEI. Dos dez pares testados, o par PME<sub>PpC2-FII</sub>/ PME<sub>PpC2-RII</sub> se mostrou eficiente na amplificação de PMEs e foi selecionado para avaliação da expressão gênica. Os *primers* para PMEIs se mostraram inespecíficos para o qPCR de *E. grandis*. Para os *primers* de PMEIs testados foram gerados, por meio de PCR convencional, *amplicons* tanto com o DNA da planta (D901) quanto com o do fungo (MF-1). O experimento foi realizado com plantas de *E. grandis*, clone S04 susceptíveis à ferrugem e com uredósporos do isolado monopustular MF-1 de *P. psidii*. As plantas foram inoculadas com os uredósporos e para a obtenção do RNA total foi realizada a amostragem de folhas dos eucaliptos em diferentes tempos após inoculação do patógeno: zero hora (primeiro contato do patógeno com a planta), 6 horas (formação do apressório), 12 horas (penetração do patógeno), 18 horas (estabelecimento da resposta de defesa), 24 horas (formação do haustório) e 72 horas (início da formação das hifas secundárias). A partir dos dados obtidos pela análise de PCR quantitativo foi possível identificar que ao longo do processo de infecção o patógeno tem a expressão do gene PME reprimida, corroborando com dados de literatura que indicam que as PMEs são enzimas que fazem parte do grupo das pectinases secretadas no processo de infecção e com papel fundamental no processo de colonização do patógeno no hospedeiro. Os dados obtidos colaborarão para aprofundar o conhecimento dos mecanismos relacionados à patogenicidade e à interação planta-patógeno, visando o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

**Palavras-chave:** Pectinase; *Puccinia psidii*; Interação planta-patógeno; PCR quantitativo

## ABSTRACT

### **The role of a pectin methyl-esterase from *Puccinia psidii* during its infection process in *Eucalyptus grandis*.**

The pectinases are key enzymes for the mechanism of pathogenicity of some microorganisms. They are one of the first enzymes that can act in the degradation of plant cell wall polymers, allowing the pathogen colonization in their hosts. In response to the attack, the plants start to express pectinase inhibitors trying to block the pathogen development. Despite its importance, little is known about this mechanism in *Eucalyptus grandis* - *Puccinia psidii* interaction. The present work aimed to analyze the expression levels of the pectin methyl-esterase (PME) from *P. psidii* and the pectin methyl esterase inhibitors (PMEI) from *E. grandis*, during this interaction process. For this purpose, six sets of primers were designed for PMEs and four for PMEIs. Among the ten sets of primers tested, the PMEppC2-FII/PMEppC2-RII was efficient to generate amplicons of PMEs and was selected for the gene expression assay. However, the primers developed for PMEIs showed to be non-specific for *E. grandis* and could not be used in the gene expression steps. The experiment was carried out with *P. psidii* susceptible clones of *E. grandis* (S04) and uredospores of a monopustular isolate of *P. psidii* (MF-1). Plants were inoculated with uredospores, and their leaves were sampled in a time-course experiment (Leite, 2012). The total RNA extraction from the leaves and the cDNA synthesis were performed for real-time quantitative PCR assay (qPCR). Based on the data obtained by qPCR analysis, it was observed that over the time sampled, the PME expression was suppressed. These results corroborate with the literature data and indicate that PMEs play a fundamental role in host colonization process and are enzymes that belong to the group of secreted pectinases in the pathogen infection process. Certainly these results obtained in the present work can help to increase knowledge of the mechanisms related to pathogenicity and host-pathogen interactions.

**Keywords:** Pectinase; *Puccinia psidii*; host-pathogen interactions; qPCR

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é composto por espécies arbóreas da família *Myrtaceae*, originárias da Austrália e Indonésia, que se adaptaram muito bem a terras brasileiras. No Brasil, o *Eucalyptus* apresenta vantagens em relação a outras espécies florestais, tais como o rápido crescimento em ciclo de curta rotação e alta produtividade. Esses fatores despertaram interesse na indústria, principalmente para a produção de papel e celulose, carvão vegetal, movelaria, construção civil e energia.

Segundo a ABRAF (2013), o Brasil é classificado como um dos países com maiores áreas plantadas de eucalipto do mundo. Atualmente a área total de floresta plantada no país é de 6,66 milhões de hectares, sendo que desse valor 76,6% correspondem a áreas de eucalipto, aproximadamente 5,5 milhões de hectares (SNIF, 2014). Até 2030, a estimativa é que se tenha um crescimento de 45% na demanda da indústria por madeira (SBS, 2009). Para suprir essa demanda será necessário um aumento significativo na área plantada e na produtividade dessas florestas.

Apesar do panorama favorável à cultura de *Eucalyptus*, ainda há perdas significativas de produtividade pela presença de várias doenças, com destaque à ferrugem das mirtáceas, doença causada pelo fungo biotrófico *Puccinia psidii* Winter. Este fungo infecta várias espécies de eucaliptos com diferentes graus de severidade, afetando drasticamente a produtividade das florestas plantadas, sendo que *E. grandis* é a espécie mais susceptível à doença (Dianese et al., 1984).

Estudos recentes sugerem que esse fungo se originou nas mirtáceas da América Central e Sul, visto que só recentemente foi detectada a presença desse patógeno no centro de origem do eucalipto (Carnegie e Cooper, 2011). Entre as estratégias de controle da *P. psidii* estão a utilização de fungicidas, a colheita de árvores para o aproveitamento da rebrota em épocas desfavoráveis à ferrugem e o uso de plantas resistentes (De Carvalho et al., 1998).

A utilização de plantas resistentes é o método mais utilizado atualmente no setor, devido ao seu baixo custo, praticidade e menor impacto ambiental, reduzindo o uso de fungicidas para o controle desse fungo na cultura de eucalipto (De Carvalho et al., 1998). Diante disso, a indústria vem selecionando clones de *E. grandis* resistentes a partir de infecções naturais em campo, onde a doença é encontrada de forma severa, ou em condições controladas de infecção artificial (De Carvalho et al., 1998). Entretanto, é

frequente a quebra da resistência dos clones selecionados, sendo fundamental o estudo dos mecanismos de patogenicidade do fungo.

No processo de infecção fúngica, os patógenos produzem e secretam grande quantidade de enzimas hidrolíticas (Jonge et al., 2011), dentre elas estão as pectinases, enzimas degradam a pectina presente na parede celular da planta, possibilitando a colonização do hospedeiro pelo patógeno (Romão et al., 2011). Entre as pectinases secretadas pelo fungo, a pectina metil-esterase (PME) atua alterando a estrutura das pectinas da parede celular (Fischer e Bennett, 1991).

Como resposta, a planta produz diversas substâncias inibidoras de pectinases na tentativa de evitar a ação dessas enzimas. O inibidor proteico de pectina metil-esterase (PMEIs) foi encontrado em várias espécies de plantas, e atua especificamente na inibição das pectinas metil-esterases produzidas pelo fungo (Jolie et al., 2010). A presença dessas substâncias durante a interação planta-patógeno é relevante para o estudo da patogenicidade, podendo servir como uma potencial barreira de inibição da infecção da planta (Jolie et al., 2010).

Vários genes de pectinases foram encontrados para *P. psidii* a partir do genoma parcialmente sequenciado desse patógeno (Quecine et al., 2012), demonstrando a importância dessa enzima na interação *P. psidii* - Eucalipto. Segundo o trabalho publicado por Romão et al (2011), as pectinases são uma das primeiras enzimas secretadas durante o processo de infecção, garantindo o sucesso da colonização do hospedeiro pelo patógeno.

Assim, o presente projeto de monografia teve como objetivo estudar o papel das pectinases e de seus inibidores na interação planta-patógeno, por meio da análise da expressão gênica de PME e de PMEIs durante o processo de infecção do hospedeiro pelo patógeno, contribuindo para que no futuro torne-se possível o desenvolvimento de melhores estratégias para controle da ferrugem.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A importância do eucalipto

O gênero *Eucalyptus* spp. é originário da Austrália, local onde encontra-se seu principal centro de diversidade, com cerca de 600 espécies desse gênero. Nas ilhas da Indonésia também há ocorrências desse gênero, sendo considerados centros secundários (Andrade et al., 1961). No Brasil, a chegada dessas espécies ocorreu no ano de 1825, com a finalidade de ornamentação, encontrando condições favoráveis para seu crescimento e desenvolvimento.

A cultura de eucalipto passou a ter importância comercial por volta de 1909, nos arredores da cidade de Rio Claro – SP, com a finalidade de produção de madeira para a obtenção de lenha para as locomotivas e a construção de estações e vilas (Mora e Garcia, 2000). Porém, a cultura de eucalipto só recebeu maior atenção após 1954, com o desenvolvimento de pesquisas pela Universidade da Flórida (EUA) para a obtenção de celulose a partir de eucalipto. Em 1957, foi instalada a primeira empresa produtora de celulose de eucalipto no Brasil.

Atualmente, do total de floresta plantada de eucalipto, a maior parte esta destinada para produtos madeireiros, como carvão vegetal, construção civil e produção de papel e celulose. O segmento papel e celulose é o principal consumidor de madeira em tora de eucalipto, correspondendo a 35,2% do total segundo a ABRAF (2013). A cultura de eucalipto para obtenção de fibra curta no Brasil tem uma rotatividade de sete anos, com rendimento de 44 m<sup>3</sup>/ha/ano, fazendo com que o país ocupe o 4º lugar no ranking mundial de produção de celulose, com uma produção de cerca de 13.922 toneladas em 2012 (Bracelpa, 2014).

Os valores dos dados citados acima mostram o enorme potencial do setor florestal, que exigirá aumento da produtividade e da área de floresta plantada. Porém, com o aumento da área plantada há o favorecimento para surgimento de várias doenças, que podem trazer sérios prejuízos ao setor, reduzindo significativamente a produtividade, como a ferrugem causada por *P. psidii* Winter.

## 2.2. O Patógeno

O gênero *Puccinia* compreende fungos basidiomicetos biotróficos, pertencente à ordem Puccinales (Uredinales), que causam a doença denominada ferrugem em diversas culturas de importância econômica, como a cana-de-açúcar, trigo, milho, eucalipto, entre outros (Cummins, 2004; Aime MC et al., 2006; Duplessis et al., 2011).

Diferente dos outros gêneros da ordem Puccinales, que afetam apenas gramíneas, o fungo *P. psidii* é um dos poucos do gênero que infectam dicotiledôneas, sendo conhecido como “Ferrugem das Mirtáceas” (Figueiredo, 2001). No Brasil foram relatadas mais de 25 espécies, entre exóticas e nativas, que são infectadas por *P. psidii*, dentre elas o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), a goiaba (*Psidium guajava*), a uvaia (*Eugenia uvalha* L.) e a jaboticaba (*Myrcia jaboticaba*) (Viégas, 1961).

Apenas recentemente o fungo *P. psidii* foi detectado no centro de origem do Eucalipto, na Austrália (Carnegie e Lidbetter, 2012). Provavelmente esse fungo originou-se nas *Myrtaceae* da América do Sul, e posteriormente com a entrada de espécies exóticas no país como o eucalipto, passou a infectá-las de forma agressiva (Coutinho et al., 1998).

O fungo foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1884 em goiabeira (*Psidium guajava* L.) por Winter (Winter, 1884). Em *Eucalyptus* a primeira descrição foi relatada por Joffily em 1944. Porém, foi apenas em 1973 que surgiram os primeiros relatos de perdas em viveiros e plantações jovens em *E. grandis* por *P. psidii*, totalizando perda de mais de 400 mil mudas no estado do Espírito Santo (Ferreira, 1981; Ferreira 1983). Desde então, já se tem relato da doença em diversos países das Américas do Sul, Central e do Norte, Ilhas do Caribe e do Pacífico, Ásia (Glen et al., 2007) e África do Sul (Roux et al., 2013).

## 2.3. A Ferrugem no eucalipto

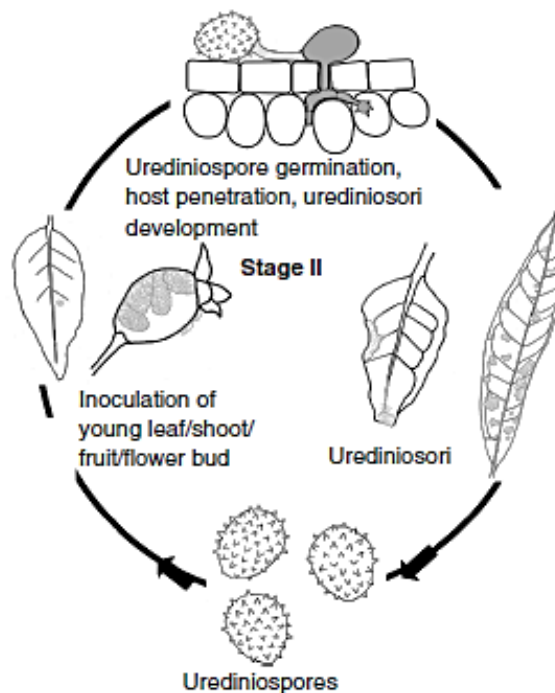
Nos últimos anos, a ferrugem vem sendo amplamente disseminada e, com isso, vem causando prejuízos em viveiros e plantios comerciais de eucalipto (Alfnas et al., 2004, Quecine et al., 2014). A ferrugem no eucalipto dificilmente mata seu hospedeiro, porém em plantas mais susceptíveis, pode ocorrer uma diminuição de 60% do crescimento de planta jovem (Dianese et al., 1984).



**Figura 1.** Infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto: A) Uredósporos nas folhas e gemas; B) pústulas de uredósporos; e C) Morte apical (Fonte: Glen et al, 2007)

A infecção pelo fungo *P. psidii* ocorre em tecidos jovens como folhas, inflorescências e gemas, frequentemente quando o hospedeiro está no início de suas brotações (Ferreira, 1983). Alguns fatores podem ser grandes agravadores da doença, como as condições ambientais favoráveis, entre elas temperaturas amenas e umidade elevada. No processo de infecção as primeiras horas são críticas para garantir a efetividade da colonização da planta pelo fungo. Após 6 horas da infecção, a maior parte dos uredinias já germinaram e após 18 horas grande parte já teve a formação do apressório (Glen et al 2007).

Os primeiros sintomas da doença podem ser vistos após 2 a 4 dias da infecção, caracterizado pelo aparecimento de pequenas pústulas amarelas nas folhas (Ferreira, 1983). Após 3 a 5 dias, essas pústulas estão cheias de uredósporos e uredinias tornando-se visível sobre cortes microscópicos (Coutinho et al., 1998). Em poucos dias ocorre a liberação de uredósporos e a infecção secundária nos tecidos jovens.



**Figura 2.** Ciclo de vida somático da *Puccinia psidii* (Fonte: Glen et al, 2007).

Por ser um fungo biotrófico, a invasão das hifas desse fungo no tecido vegetal não causa lise direta e morte celular, mas há o contato com o plasma celular, possibilitando a transferência de nutrientes da planta para o fungo. Dentre as substâncias que estão diretamente relacionadas com a invasão da planta por esses patógenos estão as enzimas pectinases (Romão, 2011).

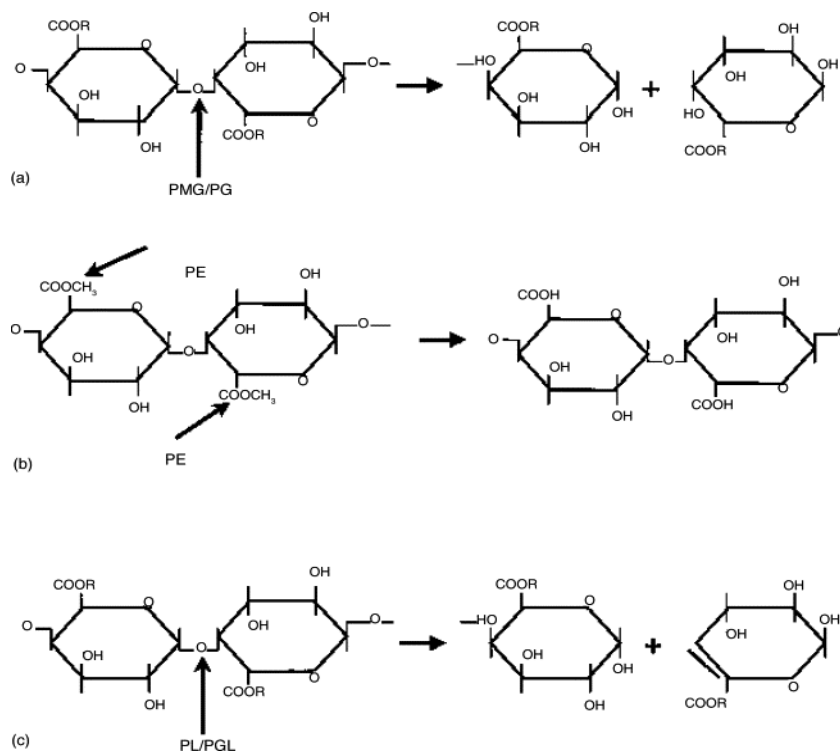
#### 2.4. Pectinases e seus inibidores

As plantas apresentam diversos mecanismos para barrar a penetração dos fungos nas células, como ceras, cutículas e a parede celular. As pectinas são um dos principais polímeros presentes na parede celular das plantas, que podem ser clivadas por enzimas secretadas pelo fungo, resultando na produção transitória de elicitores durante a degradação de pectina denominada oligogalacturonides (OGAs) (Ferreira e Monteiro, 2004).

Durante o processo de infecção fúngica, grande quantidade de enzimas hidrolíticas são secretadas para ajudar a colonização do hospedeiro. Dentre essas enzimas, os fungos fitopatógenos secretam pectinases, enzimas capazes de degradar a pectina. As

pectinases são as primeiras enzimas que degradam os polímeros da parede celular, abrindo caminho para outras enzimas necessárias no processo de colonização do hospedeiro.

Entre as diferentes pectinases, as poligalacturonases (PG) e as pectinas liases (PL) são enzimas que despolarizam o suporte principal das pectinas, diferentes das pectinas metil-esterases (PME) que alteram a estrutura das pectinas. As PME catalisam a desmetilação do C6 do grupo carboxílico de resíduos de galacturosil, desesterificando-os. (Fischer e Bennett, 1991), como mostrado na Figura 3.



**Figura 3.** Modo de ação das pectinases na estrutura das pectinas. (a) Poligalacturonase (PG); (b) Pectina metil-esterase (PME); (c) Pectina liase (PL). Fonte: Artigo Microbial pectinolytic enzymes: A review (Jayani et al., 2005).

As plantas produzem substâncias inibidoras dessas pectinases para tentar barrar a ação dessas enzimas. Além da utilização de inibidores gerais, como o iodo, detergentes (SBS), ácidos fenólicos, açúcares e gliceróis, as plantas produzem inibidores específicos para as pectinases, como os inibidores proteicos de pectina metil-esterases.

Os inibidores proteicos de pectina metil-esterases (PMEIs) são produzidos por várias espécies de plantas, e especificamente agem inibindo as pectinas metil-esterases secretadas pelo fungo (Jolie et al, 2010). Esses inibidores são relevantes para o estudo da patogenicidade pela possibilidade de inibirem essas pectinases, enzimas que degradam as pectinas da parede celular da planta possibilitando a colonização do hospedeiro, podendo servir como barreiras, impedindo a infecção da planta pelo patógeno (Jolie et al, 2010).

A identificação de genes expressos nos fungos e seus inibidores durante a interação com a planta e a determinação do papel dos produtos desses genes é fundamental para o melhor entendimento da patogenicidade de *P. psidii*.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto foi estudar o papel das pectinases e seus inibidores durante o processo de infecção de *E. grandis* pelo patógeno *P. psidii*, por meio da análise da expressão diferencial de genes.

Para tanto, as etapas específicas do projeto foram:

- I. Desenhar *primers* para genes da pectinase pectina metil-esterase (PME) e para inibidores de pectina metil-esterase (PMEI) e testar sua especificidade;
- II. Inocular plantas *E. grandis*, clone Suceptível S4, com uredósporos de *P. psidii*, isolado MF – 1, e coletar material vegetal ao longo do processo de infecção;
- III. Extrair RNA total de folhas de *E. grandis* infectadas com o fungo em diferentes intervalos de tempos durante o processo de infecção;
- IV. Isolar o RNA mensageiro (mRNA) e sintetizar o cDNA a partir do RNA total extraído;
- V. Analisar, por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), a expressão diferencial da pectinase pectina metil-esterase do patógeno e a expressão de seu inibidor pelo hospedeiro, ao longo do processo de infecção.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Material biológico

No presente trabalho utilizou-se a linhagem monopustular MF-1 de *P. psidii*, isolada de *E. grandis*, pertencente ao Laboratório Max Feffer de Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil (Quecine et al. 2012).

O material vegetal utilizado foi o clone de *E. grandis* Suscetível 04 (S04), selecionado no laboratório a partir da progênie de meios irmãos do clone Brasuz (Leite, 2012). Rotineiramente para multiplicação, manutenção do isolado MF-1 e testes preliminares dos *primers*, utilizou-se *E. grandis*, genótipo D901, altamente susceptível ao patógeno (Quecine et al., 2014).

### 4.2. Desenho dos *primers*

Os *primers* específicos para amplificação de fragmentos do gene de pectinases presentes no genoma de *P. psidii* e de seus inibidores presentes no genoma de *E. grandis* foram desenhados a partir dos *contigs* provenientes de MF-1 (Tabela 1) pertencentes ao banco local do Laboratório Max Feffer de Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil (Quecine et al. 2012) e dos *contigs* provenientes do genótipo de Brasuz (Tabela 1) retirados do banco de dados *Genolyptus* respectivamente.

Os *contigs* foram alinhados (Blast-n) com sequências de *Puccinia* sp. e *Eucalyptus* sp. já existentes no Banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de forma que a região selecionada para o desenho dos *primers* foi a que possuía sequência de nucleotídeos semelhantes às sequências já depositadas no banco.

Os pares de *primers* sintetizados foram desenhados por meio do programa Invitrogen *primers* design (<http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>). Sendo restrita a sequência para o desenho dos *primers* somente regiões conservadas. Os *primers* sintetizados foram desenhados para gerar *amplicons* de aproximadamente 200 pares de bases, ideal para o qPCR (Tabela 2).

**Tabela 1.** *Contigs* dos genes de pectina metil-esterase e seus inibidores utilizados para o desenho dos *primers*.

<b>Contigs</b>	<b>Sequências (5' – 3')</b>
<b>Contig08561</b>	CAGTACACTCTCAATGGTTCGCGGCTGGTTCAACATACGCCCAAAGCGGCGTCGTCGACCTGCTACC AAGACCTGTATTGGAGAATTCCTCAAACCTGGATGTGTTTCAGTGTGGCCGATCAGTTTTCCAAGCAGA
<b>Pectina</b>	CCATCCTTCGGGATGAATTATGTTGGAAAAGTCACAAAATTGATAGGTGACAGCTGCGTATGACGACC AAGGTCGTCCTCAAGGTATGTTGTGTGCGGTGGAGTTCATTAAGCCCCAGAATTCTGCATTTATTGAATA
<b>Metil-esterase</b>	CAAACCTTGTCTGAACCTGTAGTAGCCACTTTTTTTGAGCCGTGATACTTGAAGATTTTGATAATTCATAGT ATTAGTTAGGATTCGAAAAAATCCAGAATGATCAAGTTAAACCTTAGTTCAGGCTTCAAAGATG ACATGAGAGAAAAAGATATCCAATCATGCAAAATTTGACCCACGTGCTAGAGTGGAGCGGCTTTTTGAC TGCAATTTGTGCCTTTTCAAACCAAGCCGTCCAGGACCACAAATGAAATCTTCAAGGATGATGGATTT CAGGTTGGAATAGAAAACGAAATGAATATCTTACTTGGGTAAGCCTAAACCCTTACCAACAGTTCCT TGTATCAGGCATTTGTTAAAGTAGGCTCGAGTTGCTTTGATATACAACGTATCTTGGTAACTGCTAAAA ACGCAGGCTTTGAAGACTGGGTGTTTAGAAGAGACAGCCAAGATTTGGGTTATTGAGAAAGAATAGGT TGAATCATCTTTAGGAGAAAGTACAGTATAATTACCCTGTTGTTCTCCTTCAGCAGTTAAGGCTACTGC TTGAGTATCACTTCCCGAACCGAAAGAATTGATCAGGTTACTACGTTACGATTTTAAATGGTGTTCCTG AAAAAATCCGTCAACGCTGTTATAATATGTAACGAATTTCTTGTAACCCAAGGCTCAAACGCCACTC ACACATTGCGCATTTCAAAGCTTTCAACGTTTCGAAAAATAGTATCCATTGAAAAGAATTTGTCCAAA ACCATAAGTTTTAAGCACTCGTTACGCTTTTTTCAGCATCAAGAAGACGAAGCGGTTGTAGCCTACCAG GAGCTTTTGGCCCAACACTGAGCTTTTTGAATCAGAACCTGTAGAACCAGGCTCCGAGCCTCTGT GATAAACACCGTATTCCGAACAAAGGATCGGGTGTGGTGAAGTCCCTTGAATTAACAACGGCTGGA AAATTTGAGAAAAGGGAGGGATTACGTCAATCTGGAAGAAGTCAATAGTTTCTGTAGCCACTGCGAGC ATTTTGGAAAAGGAAAGCTATACTAACGTGCTCATAGTCAGCTATCATTTGTTCTTTATAAGTACCTGA GAAGAATAGTTCAATTTATATGAACATATGTATCTAAAAAAGGCCCTTAAATATAGAGATCGCAAGATT GTCACAAAATCATGACCGACCAGGGTAGATGA
<b>Contig02242</b>	ATATGTAAGTACTCTATAAGTAGTCTTCTCTAAGAGAGAGTGCATAACTAAAAGATAGTATTTGAAAGTTGTTCT TGCAGTTAATCTCTCCAAAAAGAGTATAATATTATTTTATTCAGCTCTTTAACTATGGAAAAAGAAAATTT TTGAGTGTATTTGGGGGCATGTTTCAAAGATTCTGCTTGATATAGCCAGTACAGTTTGGGAAGTTTTT TTATAAATGTCTTCGGAGGGATTTTTTATGACACAAAGTTTCAAACGATTTCGATTCTATTTATCTATTTA ATTGAGGATTGATTTTATGGAAGAATAAACTTTAAATTTTTTTCATAAAATTTGGATTCCGACTTTTTGCT TGACATTAATTTTACGGGTTGAGGAAAAGTGAAGAAATCTACTTGAAGTTCTCTCTCAATAATCAATTT AGCTTCTTAGTTCATTATCTCGAACCATTTCCTCACTGTGAAGAAAAATCCACTTGAGAAGTTACTT GAAGCAAAAATGATGATTTGGTAAATGCTTGAAGTGAATTTCTCCTTGTAAATTTTTCAGGAATTGGCT TTTGGAGCAGTAGTATGAGAGACATTATCATTGATATTTGTCATGTTGCTCATCTAAACGAATTTAA GTGATATACATTTTATGATCAGAAAAAGGTTCAAACAAATCAATCGATACTGTCTTAATAAATATACAGC GTGAGAACGATGGTTTTTGGAGAAATAATCTAGTCTAATTTTTCTGAGCTGCGACATTTATTTGTGTCAC ACCTTTAGACATGTTGATTGCTTTAACGTGTCCACTCAGCAAAACCCTGACGCAAAGCAAGATAAAAAT CGCACACAAGTCAGAAATCAGACACGCTCTGGCTCGATGTTTGGGAAGACCCAAATGCAAAAATCAGC GCCCCCAAGACTTTTTTCGATGCTAAGTATTCTTCGAGATGCGACCCAAATTCGGTGTCTACGAGA ACCTGGGCCAGTGTGTTGAAAATCTTCAAATTTGATGCTTTGAGTGCAGGATCGGAAGGCGGATTCC ATGGCGACCACCTTCCGGTTTTTATTATGTCTGACAACTCGCAAGATTGAAACATGACCGCCGATTT GATGACCAAGGTCTTCTAAGAAAGTTGAATTTGTAGGAGTCCCGGAAGTCCATAAACCTTTGCTTTG TTAAAAACAAACCTCGTCTGAAGGTCAGGTGGACTCCTTTGGGCGGTGATCCTGATGTGCGGTTAATT AGGGATAAGCAAAAATAAGGAGTGCTAGAATCTAATGAAAGACTTGAAGGGTTTTGTTCAAAGCAAAC CCACGTTGAAACAGATTGTGGCGGTTTTACTCCAATTTTTATGCTTTCAAACCAAGCTGTTCCAGGACC AAAGATGAAATCTACGTAGTTTGAAGTGAACAGAAACAAAATCCTGTTAGACGCTGACAAGTCTTTTG CTTAGTTGATAAATGGTTGGCTTGATGAACCTTTTGTGATCTGAAAAGCTACCAACGGCCCTTCTAC



	<p>TTGACATCCATAAAAGAAGGCTTTGTTTGCTTTAATATAGAGAGTATCTTGATACTACTGAAGGTGCAC  ATCATGTAAACTGACAGGTTTGAATATAAAATGGAAAGACCTCACAATAAGTCATCAGAACTTCTCC  CAATGGGCTAAGGGTGATTTGAACTGAAAATCAGATATTCCACAAAGGGACAAGACATACCATGCTC  GTCTCCCCTGCTGTTAACGCTACTGCCTGCGTATCAGTCCCAGTTCCAAATGAATTGATGACGTTTCT  AGGTTGAGAAGAAGGATAGTAACAACAGCGGAGAAAGAGACAACACACATCAATTTTAAGATTTAGGC  TGATAGATGAGATAGGAGTTACTCACATATTTTCGCATCTCAATACTTTCAAGTCAGCCGCGACAGATTC  CAGTATACCAAAAACAGAAAGTGCACATAGAATAAGCCTCAAAGAAAAC TAAGCAAATTTGCCACTTTA  AGGATGCTAGGAAGGCGTCTACTTACCAGGAAGCTCTGGCCCAAATTTGCTGAACCTTTCTGCATTACCA  CCTT</p>
<p><b>Contig28600</b>  <b>Pectina</b>  <b>Metil-esterase</b>  <b>(CONTIG 3)</b></p>	<p>C TAAATACACTTTAGCCTCTGAGAATCCAAGGCTTCACAAAGAACTCCAGACATTGGTCTGACAATCAA  GTAACAGTAAACGTAGCTATGAGTGCAGAAAGATAAAAATGGTAATGCAGAAAGCTCTGGAGTTTGGGT  CTCAGGCTCTTGGTAAGAGGACACCTATCTAGCCATATATAATAACTTGATCAACTTTGATAAACTTTG  AAGCTCATTGTCCTAAAATCTTCTATTTCTCGAATTATTGCGATTACCTCCTGTTATGAAAGTTTTGA  GATGCGAAATGTGTGAGAGATAATTTCACTCGTTTCGTGATGATTGCTATCTTTGGTTTTGCTAATAA  ACATCTTGGTTATTGCCCTTACCCCTTCAGCAATGTGGTCAATTCATTTGGTACTGGGACTGATACTCAG  GCAGTAGCCTTAACGGCAAGTGGAGAGGAGCATAGTATGTCTTATCCCTTTGTGCGATTAATCCACA  TCACCCTCAGCCAATTGGGAAAAGCTTCTGACGACTTATTGTGAGGTGTTTCCATTTGACATTCCAAAC  TCATAAGTTTATAGGATGTGCGCCTTCAGCAGTTATCAAGATACCCTCTATGTTGAAACAAACAAAGCC  TTGTTTTATCGGTGCCACGTAGAGGGGGCTGTTGGTAAGCATTCTTATGAAAGGACAGCCTTATCTA  GAAAGCCCTTTATAAGAATAAAAATAAGACTTGTCAATTGCTAATACCTGCTTGCCTATTTGCCTTTTCA  CCCTCCATAGATTTTCATCTTTGGTACGGGAACAGCTTGGTTTGAGCATTATATATCGCAGTAAACCA  CCACGAGCTTTTGCAGTGTGGGTCCGATTTAAATCTTTGAGTTTCTAACCAAATTTTTCGATTTTCCAT  TAGATGCTGATAATCTTCATTTTTTTTCGGTATGGCCCTTGAATTGAAAACACATAAGAATTACCGCCCAA  AGAA</p>
<p><b>Contig1176ur- xy</b>  <b>Inibidor</b>  <b>Pectina</b>  <b>Metil-esterse</b>  <b>(CONTIG 4)</b></p>	<p>ACGCGGACGCGTGGGCTCGCTGCCAGCCTCCACTTCACCCAAACAAAGTCGTCTGAGAAAATGGCA  ACGCCCCGGCCTTTGCTTCCCTCCTCCTAGTCTCCACCTTCGCTACTCCATCTCCTCCGCCTCAGCCGC  CGCCGCTACCCCATCTTCCCTCCTCCTCCGCCGCCGCTGCCAACTTCATCAAGGCCTCGTGACGCGCG  ACCAGCTACCCGGCGGTGTGCGTCCAGTCCCTCTCGGCCACGCAACACCGTCAAGCTCAGCCGCA  AGGAGCTGGCCCAAGCAGCGCTGACCGTGACCCTAGCCAAGGCCCAAGCCACGAGGGACTTCGTCA  CCCCTGACCAAGCTGAAGGGGCTCAAGGCCAGGGAGTACGAGGCGGTGAAGGACTGCCTGGAG  GAGATGGGGGACACGGTGGACCGTCTGAGCAAGTCGATGAAGGAGCTCAAGGGGATGGGGTCCCAA  TCCAAGGCCCAGGACTTCCAGTGGCAGCTCAGCAACGTGGAGACGTGGGTGAGCGCCGCACTGACC  GACGAGAACACCTGCATGGATGTTTCTCCGGGAAGGCCACGGAAGGGCGGCTCAAGAAGTCGATTC  GGACCAGGATCGTGAAGTGGCTCAGGTACCAGCAACGCCCTCGCTCTCGTCAACCGCTTCGCCGC  CAAGCACTGAGCTTTATTGGTCCGAGTCCGAGTGTGTCATCGTGTGTCGACGTTGTTGCTGTT  TTAGCTTTGGCTGATAGTGAAGAGCATGCGTGGCTATGTTTTTGTGCATGTAAGTACCGGTGTTTTT  GATGTTTGAAGTAAGGTTTTACAGAGTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>
<p><b>Contig2582gl- xy</b>  <b>Inibidor</b>  <b>Pectina</b>  <b>Metil-esterase</b>  <b>(CONTIG 5)</b></p>	<p>ACTTCACCCAAACAAGGTCGTCTGAGAAAATGGCAACGCCCGGCTTTGCTTCTCCTACTAGTCTCC  ACCTTCGTCTACTCCATCTCCTCCGCCTCAGCCGCCGCGCTACCCCATCTTCCCTCCTCCTCCGCCGC  CGCTGCCAACTTCATCAAGGCCTCGTGACGCGGACCAGCTACCCGGCGGTGTGCGTCCAGTCCCTC  TCGGCCTACGCCAACACCGTCAAGCTCAGCCGCAAGGAGCTGGCCCAAGCAGCGCTGACCGTGACC  CTAGCCAAGGCCAAGCCACGAGGGACTTCGTACCCGGTGCACCAAGCTGAAGGGGCTCAAGGCC  AGGGAGTACGAGGCGGTGAAGGACTGCCTGGAGGAGATGGGGGACACGGTGGACCGTCTGAGCAA  GTGATGAAGGAGCTCAAGGGGATGGGGTCCCAATCCAAGGCCCAGGACTTCCAATGGCAGTCCAG  CAACGTGGAGACGTGGGTGAGCGCCGCACTGACCGACGAGAACACCTGCATGGATGTTTCTCCGG  GAAGGCCACGGAAGGGCGGCTCAAGAAGTCGATCCGGACCAGGATCGTGAAGTGGCTCAGATCAC  CAGCAACGCCCTCGCTCTCGTCAACCGCTTCGCCGCCAAGCACTGAGCTTTGTTGGTCCGAGTCCCTG  AAGTGTGTCATCGTGTGGTCCGACGTTGTTGCTGTTTTAAGCTTTTGGCTGATAGTGAAGAGCATGT  GTGGCTATGTTTTTGTGCATGTAAGTATCGGTGTTTTTGTGTTTTAAGTAAAGTTTTACAGAGTGTGA</p>

---

ATCACTACACTTTAGACTACAGTTCANAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAG

---

### 4.3. Teste de especificidade dos *primers*

Para testar a especificidade dos pares de *primers* para *P. psidii* e *E. grandis* realizou-se a extração do DNA de plantas de *E. grandis* (genótipo D901) e de uredósporos do fungo *P. psidii* (MF-1) por meio do Kit “DNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose (1%), a 3 V/cm. Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 mg/mL) e fotodocumentado com auxílio de luz U.V.

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* desenhados para pectina metil-esterase do fungo *P. psidii* (MF-1) e para o inibidor de pectina metil-esterase de *E. grandis*.

Gene	Primer	Contig de Origem*	Sequência (5'-3')
PME	PMEPpC1-FI	CONTIG 1	GTG TTT GGC CGA TCA GTT TT
PME	PMEPpC1-FII		GCG TTG TAG CCT ACC AGG AG
PME	PMEPpC1-RI		CAA ATT TTC CAG CCG TTG TT
PME	PMEPpC2-FI	CONTIG 2	TCG AAC CGA TTT TTC CTC AC
PME	PMEPpC2-RI		CCA AAA GCC AAT TCC TGA AA
PME	PMEPpC2-FII		GAC CAC CCT TCC GGT TTT AT
PME	PMEPpC2-RII		TTA ACC GCA CAT CAG GAT CA
PME	PMEPpC3-RI	CONTIG 3	TGA ATG CTC AAA CCA AGC TG
PME	PMEPpC3-FI		AAT TCC ACA TCA CCC TCA GC
PME	PMEPpC3-FII		TGT TTT ATC GGT GCC ACG TA
PME	PMEPpC3-RII		AGC TGT TCC CGT ACC AAA GA
PMEI	PMEEgl1-FI	CONTIG 4	GTC GAT GAA GGA GCT CAA GG
PMEI	PMEEgl1-RI		AGG TGT TCT CGT CGG TCA GT
PMEI	PMEEgl1-FII		CCC ACT TCA CCC AAA CAA AG
PMEI	PMEEgl1-RII		GAG GAG GAA GAT GGG GTA GC
PMEI	PMEEgl2-FI	CONTIG 5	CTT CAC CCA AAC AAG GTC GT

<b>PMEI</b>	PMEEgl2-RI	GAG GAG GAA GAT GGG GTA GC
<b>PMEI</b>	PMEEgl2-FII	ACC TGC ATG GAT GGT TTC TC
<b>PMEI</b>	PMEEgl2-RII	GAC TCC GAC CAA CAA AGC TC

\*Nomenclatura interna utilizada pelo grupo, especificada na Tabela 1.

Na reação de PCR com os *primers* desenhados foram utilizados 1 µl de DNA (10ng/µl), 1x taq DNA Buffer, 3,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM DNTP, 2 pmol de cada *primer* e 1,25 U de taq DNA polimerase, em uma reação com volume final de 25 µl. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°, 45 s 50°C - 63°C, 30 s a 72°C, e extensão final a 72°C por 10 min. Foram testadas as seguintes temperaturas de anelamento: 50°C, 54°C, 58°C, 60°C e 63°C.

Para os testes de especificidade e eficiência dos *primers* desenhados para *P. psidii* e *E. grandis*, foram utilizados DNA do fungo (MF-1) e da planta (D901). Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose (1%), a 3 V/cm. Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 mg/mL) e fotodocumentado com o auxílio de luz U.V.

#### 4.4. Purificação dos *amplicons* e sequenciamento

Os *amplicons* gerados pelos diferentes pares de *primers* foram purificados a partir da extração das bandas do gel de eletroforese, seguido da extração do DNA por meio do kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE).

As amostras purificadas foram enviadas para o Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, São Paulo, Brasil, que utiliza o sistema de análise de DNA “ABI 3730 DNA Analyser” (Applied Biosystems).

As sequências geradas foram então alinhadas com os *contigs* que lhe deram origem (Tabela 1), por meio do CLUSTAL-W 1.7 (Thompson et al. 1994). A identificação das sequências foi realizada usando o Blast-x.

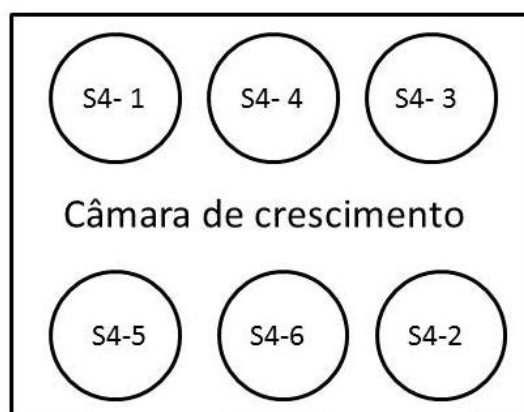
#### 4.5. Coleta dos esporos de *P. psidii*

Os esporos utilizados no experimento foram obtidos a partir da inoculação de uredósporos em material susceptível D901, clone considerado muito susceptível à ferrugem, e coletados com o auxílio de um pincel. Somente a área com pústulas foi raspada e os uredósporos foram coletados em placa de Petri. Aos uredósporos adicionou-se 600 mL de água destilada acrescida de 0,5% (v/v) de Tween 20, deixados sob agitação branda por 15 minutos. A contagem dos uredósporos foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer e a concentração ajustada a  $10^5$  uredósporos/ mL, para ser utilizada como o inóculo do experimento.

#### 4.6. Delineamento experimental e coleta do material vegetal

Seis plantas de *E. grandis*, clones susceptíveis S04, foram aclimatadas e inoculadas com esporos do isolado MF1 na concentração de  $10^5$  uredósporos/ mL, utilizando-se aproximadamente 50 mL por planta em ambas as faces das folhas dos clones. As plantas foram alocadas em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura (19°C), luminosidade (12 horas) e umidade, e foram dispostas aleatoriamente (Figura 4).

Dessa forma, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições biológicas sendo que cada repetição biológica foi composta por folhas de duas plantas.

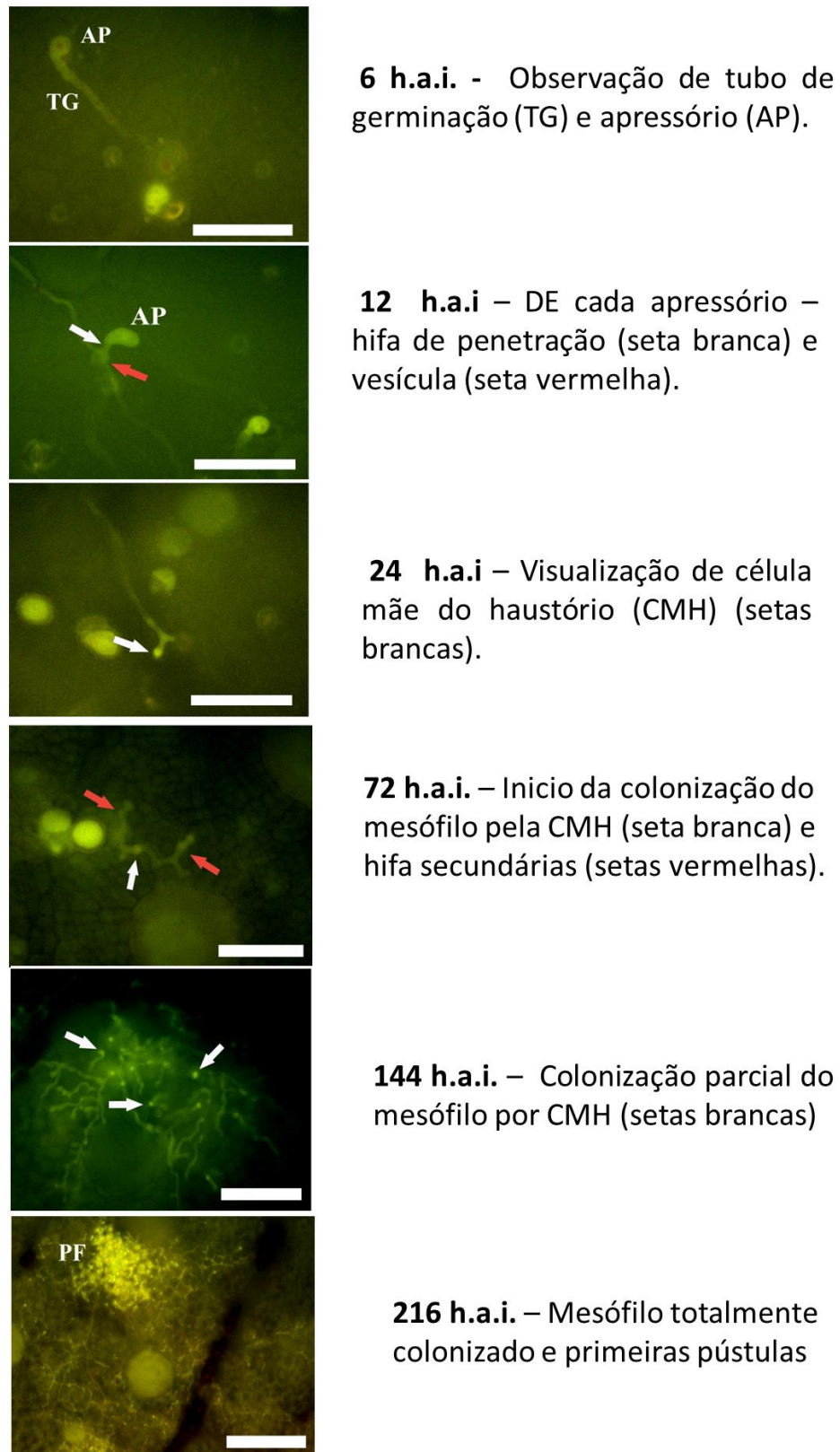


**Figura 4.** Instalação do experimento para as análises de qPCR. As plantas foram dispostas aleatoriamente em câmara de crescimento Conviron E15. O clone susceptível 04 está representado por S4 e os números separados indicam a repetição biológica que cada planta representa.

As plantas foram cobertas individualmente com sacos plásticos transparentes para manter a umidade necessária nas superfícies foliares, e foram mantidas no escuro por 24 horas a aproximadamente 19° C. Posteriormente as plantas foram submetidas à luminosidade com fotoperíodo de 12 horas de luz (170  $\mu\text{mols}$  de fótons fotossinteticamente ativos  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e 12 horas de escuro. Durante o período de luz as plantas eram descobertas e cobertas durante o período escuro, com a irrigação ocorrendo duas vezes ao dia com água e solução nutritiva (2g/L), com cuidado para não irrigar diretamente as folhas inoculadas.

Tendo como base a dinâmica do desenvolvimento do patógeno durante a infecção do hospedeiro (Leite, 2012 – Figura 5), foram estabelecidos seis intervalos de estudo: 1) zero hora, primeiro contato do patógeno com a planta; 2) 6 horas após a inoculação, formação do apressório; 3) 12 horas após a inoculação, penetração do patógeno; 4) 18 horas após a inoculação, estabelecimento da resposta de defesa; 5) 24 horas após a inoculação, formação do haustório; e 6) 72 horas após a inoculação, início da formação das hifas secundárias (Xavier et al., 2001; Leite, 2012).

Em cada intervalo, folhas provenientes dos dois primeiros pares de cada ramo de duas plantas foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas separadamente a -80°C.



**Figura 5.** Dinâmica do processo de infecção de *P.psidii* em folhas de *E. grandis* (S04). h.a.i.= horas após inoculação. Fonte: Leite, 2012.

#### 4.7. Extração do RNA total e isolamento do mRNA

Para a extração de RNA, utilizou-se o material vegetal armazenado à temperatura de -80°C. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e o protocolo utilizado para a extração de RNA total seguiu o método de ZENG e YANG (2002). A purificação do RNA mensageiro foi realizada com o auxílio do kit “Dynabeads mRNA Purification” da Invitrogen, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, e eluídos em 20 µL de água Milli-Q tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) a 1%. As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro *nanocell* (Thermo Scientific).

#### 4.8. Síntese de cDNA

Para síntese do cDNA utilizou-se o kit SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum® *Taq* (Invitrogen) em uma reação com volume final de 12,5 µL, contendo 4 µL do mRNA eluído a partir de RNA total, 1 µL (10 µM) de cada par de *primers* específicos, 6,25 µL do tampão de reação (2X) e 0,25 µL do tampão contendo a enzima RT/Platinum *Taq*. As condições da PCR foram: 50°C, 30 s; 94 °C, 2 min e 94 °C, 45 s; 58 °C, 1 min; 72 °C, 2 min por 10 ciclos. Somente 10 ciclos foram utilizados, a título de pré-amplificação para início das reações de qPCR. Para a pré-amplificação das amostras utilizou-se o termociclador GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems.

#### 4.9. PCR quantitativo e análise da expressão gênica.

As reações de análise de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizadas com o kit SYBR Green real-time RT-PCR SuperMix-UDG utilizando o termociclador IQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad), em programa com 35 ciclos, e temperatura de anelamento igual a 58° C, temperatura de anelamento pré-estabelecida para os *primers* selecionados no estudo.

As reações foram preparadas com 12,5 µl de *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG*, 9,5 µl água ultrapura tratada com DEPC, 3 µl cDNA (1ª fita) e 1 µl de cada *primer* 10 mM (*forward* e *reverse*). As amostras foram feitas em triplicata e o cDNA diluído 2x. A análise foi realizada com o auxílio do aparelho IQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio Rad). As condições de amplificação foram uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C

por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão com leitura da fluorescência a 72°C por 30 segundos. Para formação da curva de *melting* foram realizados 47 ciclos com temperatura inicial de 72°C por 30 segundos, e aumento progressivo de 0,5 °C a cada ciclo.

A eficiência das reações foi analisada por meio do programa *LinRegPCR* 11.0 (<http://LinRegPCR.HFRC.nl>). Os genes beta-tubulina e fator de alongação foram utilizados como controle endógeno do fungo para o qPCR, sendo selecionados na literatura (Coelho et al. 2010, Shalom & Lichter, 2010 ) e após análise de eficiência das amostras no software *LinRegPCR*. A análise da expressão gênica foi realizada pelo método Pfaffl (Pfaffl et al., 2001).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

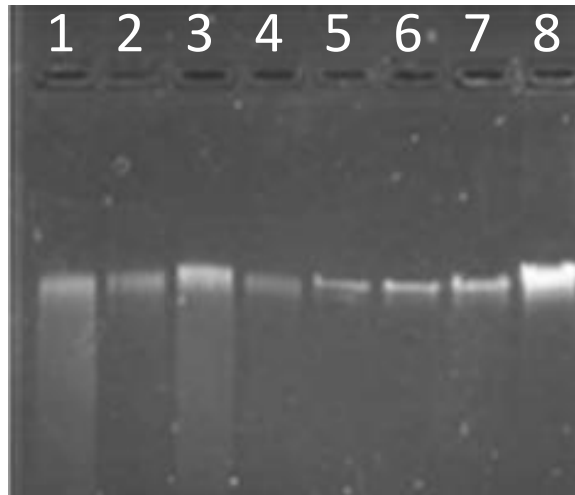
### 5.1. Desenho dos *primers*

A partir dos *contigs* relacionados ao gene de pectina metil-esterase de MF-1 foram sintetizados onze *primers* que combinados geraram seis pares de *primers* para pectina metil-esterase do fungo. A partir dos *contigs* do clone Brasuz de *E. grandis* foram sintetizados oito *primers* para o gene inibidor de pectina metil-esterase da planta, que combinados geraram quatro pares de *primers*. Assim, no total foram desenhados e avaliados dez pares de *primers*.

### 5.2. Teste de especificidade dos *primers*

A extração do DNA foi realizada com folhas de *E. grandis* (monoprogênie D901) e com uredósporos de *P. psidii* (MF-1), para o teste da especificidade dos pares de *primers* desenhados. A quantificação do DNA extraído foi realizada a partir de gel de agarose (1%) e marcador de peso molecular  $\lambda$ -*HindIII* (Fermentas), como mostrado na Figura 6.





**Figura 6.** Quantificação da extração de DNA de uredósporos de *P. psidii* MF-1 e folhas de *E. grandis* (D901). Foram aplicados 5  $\mu$ L de DNA em cada poço do gel de agarose na seguinte ordem: (1) MF-1-extração 1, (2) MF-1-extração 2, (3) D901-extração 1, (4) D901-extração 2, (5)  $\lambda$ -*HindIII* 12,5ng, (6)  $\lambda$ -*HindIII* 25ng, (7)  $\lambda$ -*HindIII* 50ng, (8)  $\lambda$ -*HindIII* 200ng.

A partir da análise da intensidade das bandas de cada amostra e do marcador  $\lambda$ -*HindIII* com concentrações pré-estabelecidas, foram calculadas a concentração de DNA de cada extração (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentração de DNA extraído.

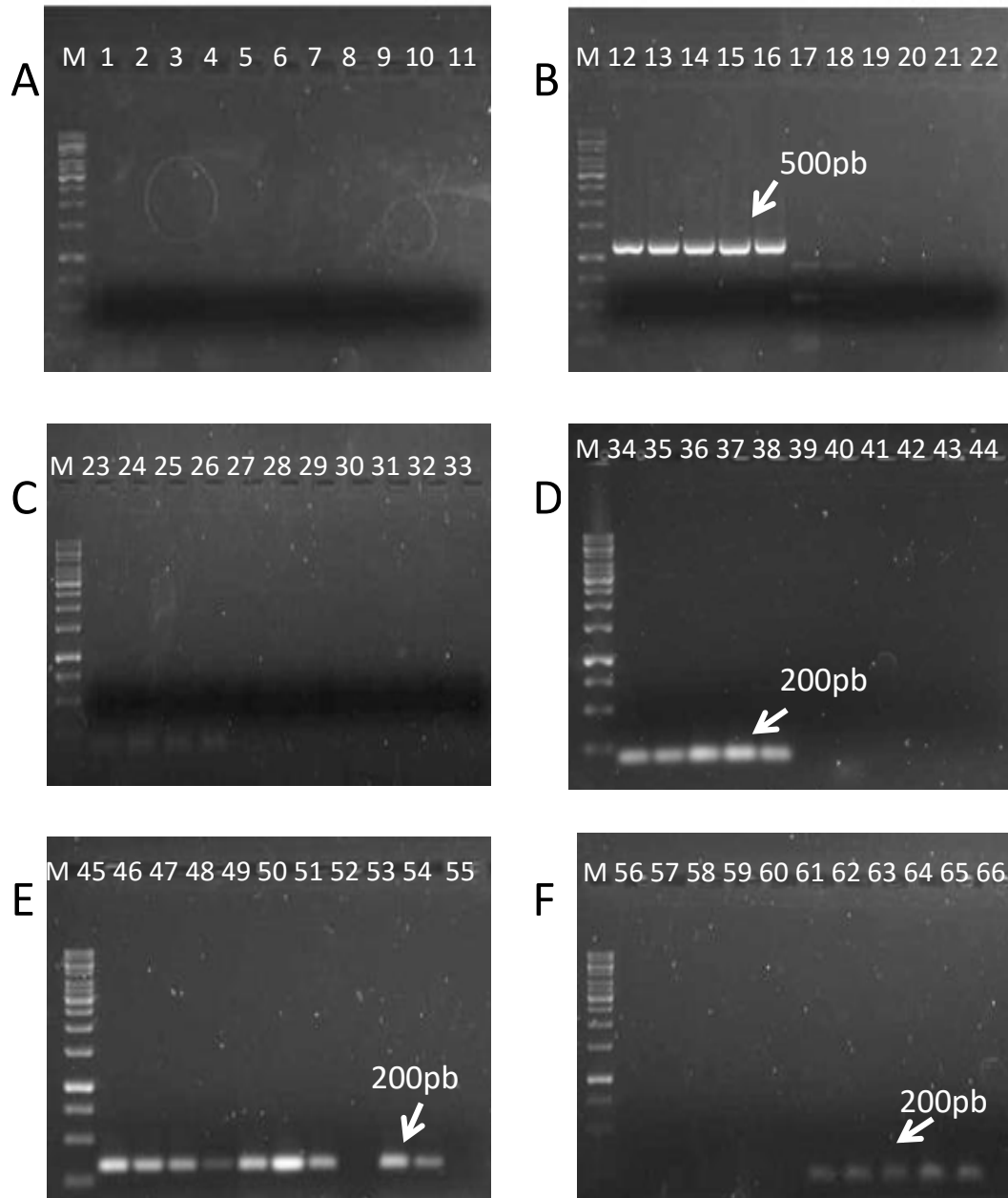
Amostras	Concentração de DNA
MF-1 (extração 1)	20 ng / $\mu$ L
MF-1 (extração 2)	15 ng / $\mu$ L
D901 (extração 1)	24 ng / $\mu$ L
D901 (extração 2)	15 ng / $\mu$ L

A especificidade dos *primers* na reação de PCR foi realizada por PCR convencional. Um gradiente de temperatura de anelamento (50°C, 53°C, 58°C, 60°C e 63°C.) foi testado para otimizar as condições de amplificação dos fragmentos desejados. Foram então selecionados seis pares, que geraram *amplicons* com tamanho aproximado de 200 pares de bases, o que indica a provável amplificação da região alvo.

Para as PME foram selecionados os pares de *primers* que amplificaram fragmentos de 200 pares de base e não amplificaram nenhum fragmento nas reações com DNA das plantas D901, ou seja, eram específicos apenas para *P. psidii*.

Os pares de *primers* PME PpC1-FII/PME PpC1-FI (Figura 7-A) e o PME PpC2-FI/PME PpC2-RI (Figura 7-C) não geraram *amplicons* utilizando-se o DNA extraído de uredósporos de *P. psidii*. O par de *primers* PME PpC1-FII/PME PpC1-RI (Figura 7-B) amplificou um fragmento de tamanho maior do que esperado (aproximadamente 500 pares de bases), sugerindo que os *primers* estão se anelando em outra região ou a região apresenta intróns. O par PME PpC3-RI/PME PpC3-FI (Figura 7-E) amplificou a região alvo utilizando o DNA fúngico e o vegetal como molde, sendo esse par de *primers* considerado inespecífico.

Os pares de *primers* PME PpC2-FII/ PME PpC2-RII (Figura 7-D) e PME PpC3-FII/PME PpC3-RII (Figura 7-F), mostraram-se promissores, amplificando um fragmento de 200 pares de bases, como esperado, em todas as temperaturas testadas e apenas quando utilizado o DNA fúngico (MF-1), sendo considerados específicos para *P. psidii* e portanto candidatos para serem utilizados nas etapas posteriores do projeto.



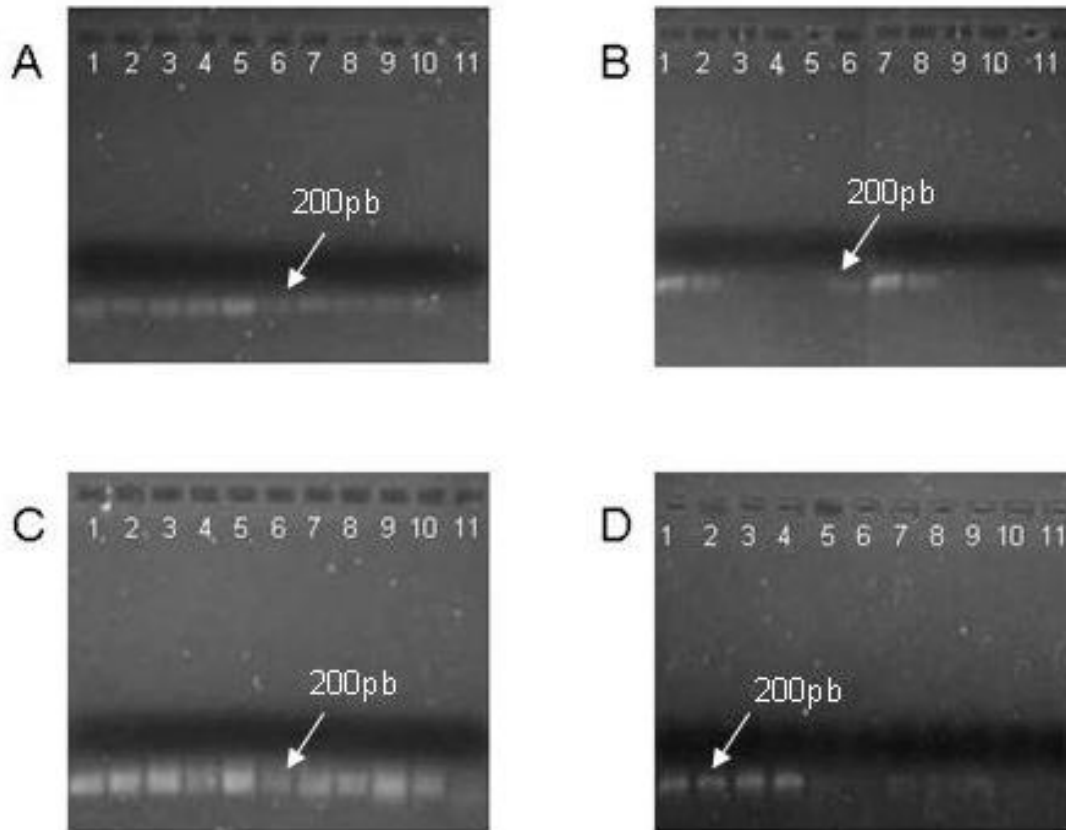
**Figura 7.** Teste de especificidade e eficiência dos *primers* para DNA de uredósporos de *P. psidii* e folhas de *E. grandis*, em reação com gradiente de temperatura de anelamento de 50 a 63 °C. Reação de amplificação com os pares de *primers*: (A) PMEPPc1-FII/PMEPPc1-FI, (B) PMEPPc1-FII/PMEPPc1-RI, (C) PMEPPc2-FI/PMEPPc2-RI, (D) PMEPPc2-FII/ PMEPPc2-RII, (E) PMEPPc3-RI/PMEPPc3-FI, (F) PMEPPc3-FII/PMEPPc3-RII. M = marcador de peso molecular (1Kb Thermo). A identificação de cada amostra aplicada no gel encontra-se na tabela 4.

**Tabela 4.** Identificação das amostras aplicadas nos géis de agarose da figura 7.

Amostras	DNA	Temp. de Alinhamento (°C)	Amostras	DNA	Temp. de Alinhamento (°C)	Amostras	DNA	Temp. de Alinhamento (°C)
1	MF-1	50	23	MF-1	50	45	MF-1	50
2	MF-1	53	24	MF-1	53	46	MF-1	53
3	MF-1	58	25	MF-1	58	47	MF-1	58
4	MF-1	60	26	MF-1	60	48	MF-1	60
5	MF-1	63	27	MF-1	63	49	MF-1	63
6	D901	50	28	D901	50	50	D901	50
7	D901	53	29	D901	53	51	D901	53
8	D901	58	30	D901	58	52	D901	58
9	D901	60	31	D901	60	53	D901	60
10	D901	63	32	D901	63	54	D901	63
11	-	50	33	-	50	55	-	50
12	MF-1	50	34	MF-1	50	56	D901	50
13	MF-1	53	35	MF-1	53	57	D901	53
14	MF-1	58	36	MF-1	58	58	D901	58
15	MF-1	60	37	MF-1	60	59	D901	60
16	MF-1	63	38	MF-1	63	60	D901	63
17	D901	50	39	D901	50	61	MF-1	50
18	D901	53	40	D901	53	62	MF-1	53
19	D901	58	41	D901	58	63	MF-1	58
20	D901	60	42	D901	60	64	MF-1	60
21	D901	63	43	D901	63	65	MF-1	63
22	-	50	44	-	50	66	-	50

O par de *primer* PMEEgl1-FII/PMEEgl1-RII (Figura 8-B) e PMEEgl2-FI/PMEEgl2-RI (Figura 8-C) amplificaram a região alvo tanto para as reações que continham como DNA molde o DNA da planta quanto as com o DNA do fungo, sendo considerados *primers* inespecífico para a análise com qPCR.

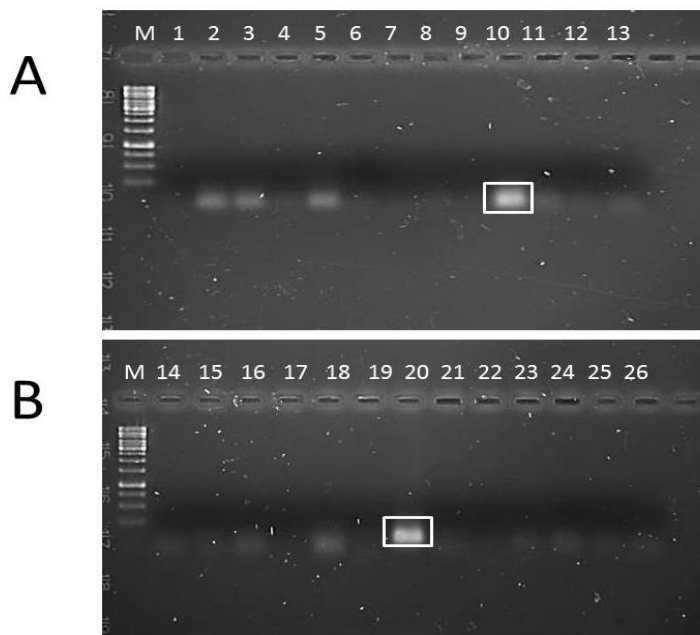
Já os pares de *primers* PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI (Figura 8-A) e o PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII (Figura 8-D), apesar de não serem totalmente específicos, apresentaram maior intensidade de amplificação para o DNA da planta (D901) em todas as temperaturas.



**Figura 8.** Teste de especificidade e eficiência dos *primers* para DNA de uredosporos de *P. psidii* e folhas de *E. grandis*, em reação com gradiente de temperatura de anelamento de 50 a 63 °C. Reação de amplificação com os pares de *primers*: (A) PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI, (B) PMEEgl1-FII/PMEEgl1-RII, (C) PMEEgl2-FI/PMEEgl2-RI e (D) PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII. Amostras 1, 2, 3, 4, 5 = DNA *P. psidii* (MF-1) e 6, 7, 8, 9, 10 = DNA *E. grandis* (D901), com gradiente de temperatura de 50, 53, 57, 60 e 63 °C respectivamente, 11 = Branco.

Para otimizar a reação da PCR para os genes inibidores de pectina metil-esterase foram escolhidos os dois melhores pares de *primers* PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI e o PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII, que apresentaram maior intensidade de amplificação para o DNA de *E. grandis*.

Para os pares de *primers* PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI (Figura 9-A) e PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII (Figura 9-B) utilizou-se as temperaturas 63°C e 60°C, respectivamente. Houve a amplificação somente da região alvo para o DNA da planta (D901), sendo esses *primers* selecionados para os próximos passos do projeto.



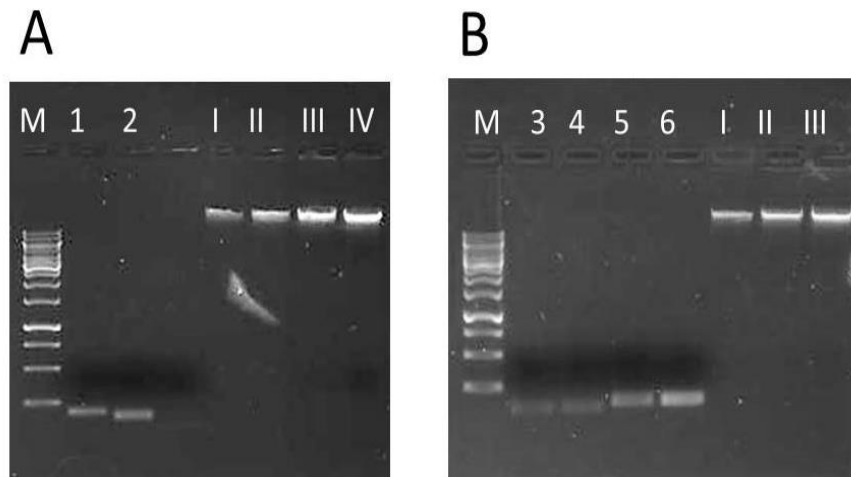
**Figura 9.** Teste de especificidade e eficiência dos *primers* para DNA de uredósporos de *P. psidii* e folhas de *E. grandis*, em reação com gradiente de temperatura de anelamento de 60 a 65 °C. Reação de amplificação com os pares de *primers*: (A) PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI e (B) PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII. M = marcador de peso molecular (1Kb Thermo). A identificação de cada amostra aplicada no gel encontra-se na tabela 5.

**Tabela 5.** Identificação das amostras aplicadas nos géis de agarose da figura 9.

Amostra	DNA	Temp. de Alinhamento (°C)	Amostra	DNA	Temp. de Alinhamento (°C)
1	MF-1	60	14	MF-1	60
2	MF-1	61	15	MF-1	61
3	MF-1	62	16	MF-1	62
4	MF-1	63	17	MF-1	63
5	MF-1	64	18	MF-1	64
6	MF-1	65	19	MF-1	65
7	D901	60	20	D901	60
8	D901	61	21	D901	61
9	D901	62	22	D901	62
10	D901	63	23	D901	63
11	D901	64	24	D901	64
12	D901	65	25	D901	65
13	-	60	26	-	60

A partir desses resultados, os *amplicons* gerados pelos pares de *primers* PMEPPc2-FII/ PMEPPc2-RII (Figura 7-D), PMEPPc2-FII/ PMEPPc2-RII (Figura 7-F), PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI (Figura 8-A) e PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII (Figura 8-B) foram selecionados para serem sequenciados.

Após a purificação das amostras, a quantificação do produto de PCR realizou-se a partir de gel de agarose (1%) e marcador de peso molecular  $\lambda$ -HindIII (Fermentas) (Figura 10).



**Figura 10.** Quantificação da purificação dos *amplicons* oriundos da reação PCR com os *primers* PMEPPc2-FII/ PMEPPc2-RII e PMEPPc3-FII/ PMEPPc3-RII (A) e os *primers* PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI e PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII (B). M = marcador de peso molecular (1Kb Thermo),  $\lambda$ -HindIII 12,5ng (I),  $\lambda$ -HindIII 25ng (II),  $\lambda$ -HindIII 50ng (III) e  $\lambda$ -HindIII 200ng (IV). A identificação das amostras encontra-se na tabela 6.

**Tabela 6.** Concentração de produto de PCR enviado para o sequenciamento.

Amostras	Primers	DNA	Concentração de DNA
1	PMEPPc2-FII/ PMEPPc2-RII	MF-1	6,5 ng / $\mu$ L
2	PMEPPc3-FII/ PMEPPc3-RII	MF-1	6,5 ng / $\mu$ L
3	PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI	MF-1	3,3 ng / $\mu$ L
4	PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI	D901	3,3 ng / $\mu$ L
5	PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII	MF-1	6,5 ng / $\mu$ L
6	PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII	D901	8 ng / $\mu$ L

Após sequenciamento, as sequências geradas foram alinhadas com os *contigs* precursores das mesmas e depois identificadas por meio do Blast-x. As sequências geradas pelos pares *primers* PMEPPC2-FII/ PMEPPC2-RII e PMEPPC3-FII/ PMEPPC3-RII foram identificadas como pectina metil-esterase, já que alinharam com pectinas esterases de outros fungos como *Puccinia graminis*, *Phytothora infestans* e *Phytothora capsii*, comprovando que os *primers* amplificaram a sequência alvo desejada.

Os *primers* PMEEgl1-FI/PMEEgl1-RI e PMEEgl2-FII/PMEEgl2-RII, com as sequências geradas a partir de DNA de *E. grandis* (D901) foram identificadas como inibidores de pectina metil-esterase já que tiveram parte de sua sequência similar à sequência desse gene para diversas espécies vegetais tais como *Citrus sinensis*, *Arabidopsis lyrata*, *Theobroma cacao* e *Populus trichocarpa*. Entretanto os *primers* desenhados para PMEIs também amplificaram sequências quando usado DNAs de *P. psidii* (MF-1) e o produto entretanto apresentou similaridade com sequências de inibidores de pectina metil-esterase de plantas e de fungo. Desse modo, temos amplificação inespecífica do *primer* já que geram *amplicons* quando utilizado DNA de *P. psidii* como molde, descartando assim a possibilidade de utilização desses *primers* para os próximos passos do projeto.

Com os resultados obtidos no sequenciamento, foram desenhados novos *primers* de inibidores de pectina metil-esterase a partir dos mesmos *contigs* utilizados anteriormente, porém buscando regiões mais conservadas dos *contigs* para o desenho dos *primers*, para tentar garantir maior especificidade dos mesmos. A identificação dos novos *primers* de PMEI encontra-se na tabela 7.



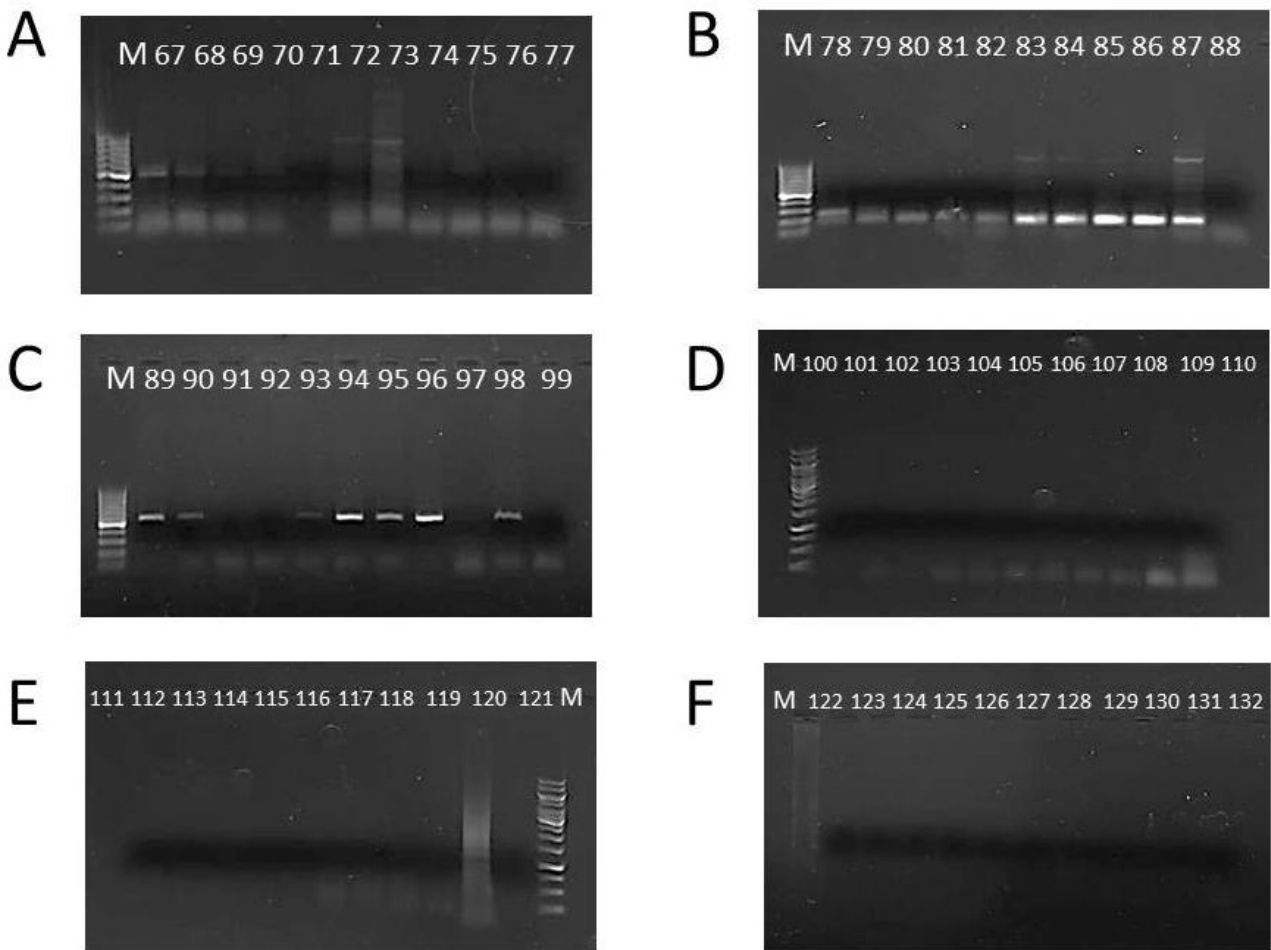
**Tabela 7.** Sequência dos *primers* desenhados para inibidor de pectina metil-esterase de *E. grandis*.

<b>Primer</b>	<b>Contig de Origem*</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
<b>PMEEgl1-FIII</b>	Contig 4	CGT CTG AGC AAG TCG ATG AA
<b>PMEEgl1-FVI</b>		ACC TGC ATG GAT GGT TTC TC
<b>PMEEgl1-RVI</b>		ACG ACG ATG ACG ACA CTT CA
<b>PMEEgl1-RV</b>		ACC ATC CAT GCA GGT GTT CT
<b>PMEEgl2-FIII</b>	Contig 5	GTC GAT GAA GGA GCT CAA GG
<b>PMEEgl2-RIII</b>		AGG TGT TCT CGT CGG TCA GT
<b>PMEEgl3-FI</b>		AGT CTC GTG GGT CCA TCA AA
<b>PMEEg3-RII</b>		CAC CAT ATA CCA TGC CCA CA
<b>PMEEg3-RIII</b>		ACA AAC GTG AAC ACG GAC AC

Para testar a especificidade dos novos *primers* foi utilizada a PCR convencional, a reação e amplificação foram realizadas do mesmo modo que os testes já descritos acima, com gradiente de temperatura de anelamento (50°C, 53°C, 58°C, 60°C e 63°C.), para tentar otimizar as condições de amplificação dos fragmentos desejados.

Para os novos *primers* de PMEs desenvolvidos serem considerados específicos para *E. grandis*, era preciso que amplificassem fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases e apenas com o DNA das plantas D901 como molde. O par de *primer* PMEEgl2-FI/PMEEgl1-RVI (Figura 11-A), PMEEgl1-FVI/PMEEgl1-RVI (Figura 11-B), PMEEgl2-FI/PMEEgl1-RV (Figura 11-C) e PMEEgl2-FIII/PMEEgl1-RIII (Figura 11-D) amplificaram a região alvo tanto para as reações que continham como DNA molde o DNA da planta quanto as com o DNA do fungo, sendo considerados inespecíficos.

Já os pares de *primers* PMEEgl3-FI/PMEEgl3-RI (Figura 11-E) e o PMEEgl3-FI/PMEEgl3-RIII (Figura 11-F), não apresentaram produtos de amplificação da região alvo para o DNA molde da planta e do fungo, e não puderam ser utilizados.



**Figura 11.** Teste de especificidade e eficiência dos *primers* para DNA de uredosporos de *P. psidii* e folhas de *E. grandis*, em reação com gradiente de temperatura de anelamento de 50 a 63 °C. Reação de amplificação com os pares de *primers*: PMEEgl2-FI/PMEEgl1-RVI (A), PMEEgl1-FVI/PMEEgl1-RVI (B), PMEEgl2-FI/PMEEgl1-RV (C), e PMEEgl2-FIII/PMEEgl1-RIII (D), PMEEgl3-FI/PMEEgl3-RI (E) PMEEgl3-FI/PMEEgl3-RIII (F). M = marcador de peso molecular (1Kb Thermo). A identificação de cada amostra aplicada no gel encontra-se na tabela 4.

Com os resultados obtidos para os testes de especificidade, os novos *primers* desenvolvidos para PME1 de *E. grandis* não foram considerados específicos, portanto até o momento não foi possível encontrar *primers* para a avaliação de um PME1 ao longo do processo inicial de infecção em *E. grandis*, por meio da análise da expressão gênica dessa PME1 por qPCR.

**Tabela 8.** Identificação das amostras aplicadas nos géis de agarose da figura 11.

Amostras	DNA	Temp. de Alinhamento (°C)	Amostras	DNA	Temp. de Alinhamento (°C)	Amostras	DNA	Temp. de Alinhamento (°C)
67	MF-1	50	89	MF-1	50	111	MF-1	50
68	MF-1	53	90	MF-1	53	112	MF-1	53
69	MF-1	58	91	MF-1	58	113	MF-1	58
70	MF-1	60	92	MF-1	60	114	MF-1	60
71	MF-1	63	93	MF-1	63	115	MF-1	63
72	D901	50	94	D901	50	116	D901	50
73	D901	53	95	D901	53	117	D901	53
74	D901	58	96	D901	58	118	D901	58
75	D901	60	97	D901	60	119	D901	60
76	D901	63	98	D901	63	120	D901	63
77	-	50	99	-	50	121	-	50
78	MF-1	50	100	MF-1	50	122	MF-1	50
79	MF-1	53	101	MF-1	53	123	MF-1	53
80	MF-1	58	102	MF-1	58	124	MF-1	58
81	MF-1	60	103	MF-1	60	125	MF-1	60
82	MF-1	63	104	MF-1	63	126	MF-1	63
83	D901	50	105	D901	50	127	D901	50
84	D901	53	106	D901	53	128	D901	53
85	D901	58	107	D901	58	129	D901	58
86	D901	60	108	D901	60	130	D901	60
87	D901	63	109	D901	63	131	D901	63
88	-	50	110	-	50	132	-	50

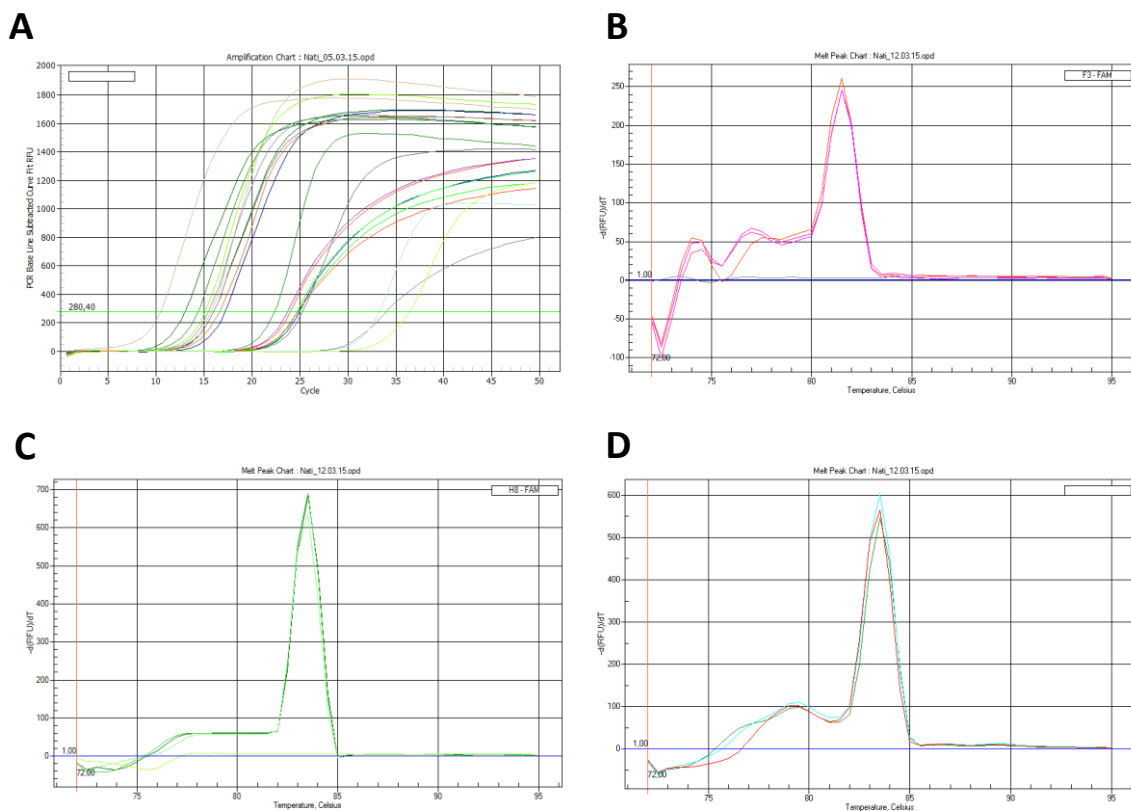
### 5.3. PCR quantitativo e análise da expressão gênica.

A partir dos resultados acima apresentados, para a análise da expressão diferencial de genes por qPCR foi escolhido o par de *primers* PMEppC2-FII e PMEppC2-RII desenvolvido no presente estudo e que amplifica o gene PME de *P.psidi*, e os *primers* Beta tub1-F/Beta tub3-R (5'-GGACTCTGTTTTAGATGTCGTC-3'/5'-TTGATGGACTGATAGGGTAGCG-3') e EF-5F/EF-2R (5'-CAGTTATGGAAGTTTGAACTCC-3'/5'-GACAATAAGCTGTCTGAACACCAAGG-3') desenvolvidos para *P.psidi* e que amplificam os genes de beta-tubulina (Beta tub) e fator de alongação (EF), respectivamente, e que para fungos são utilizados como genes para controle endógeno da reação de qPCR.

A especificidade dos *primers* é importante, nas reações de qPCR, principalmente quando a reação está associada ao SYBR Green, pois o mesmo não é específico e detecta qualquer fragmento de DNA dupla fita ou produtos de amplificação de DNA não

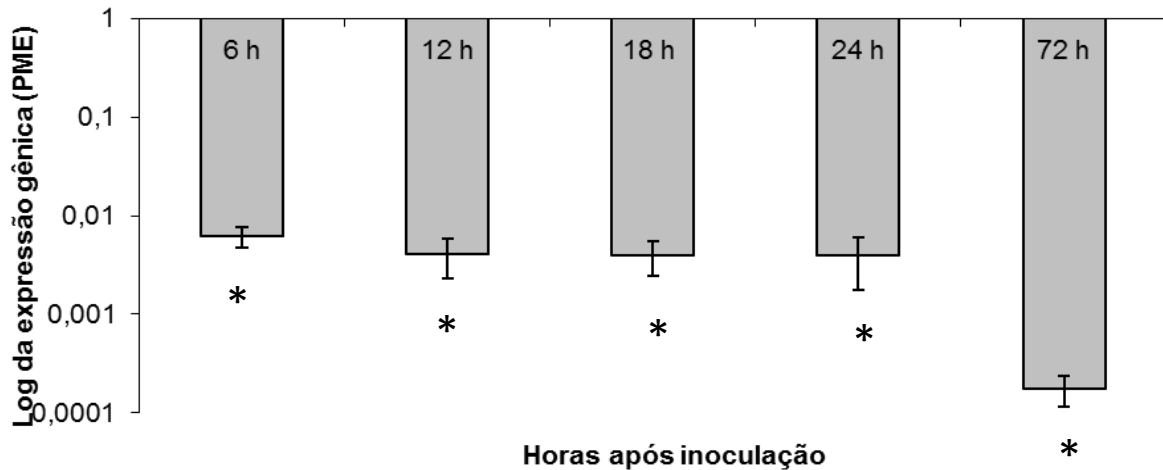
específicos. As dissociações são geradas no fim da reação de qPCR por aumento progressivo da temperatura na reação, calculando a proporção de emissão da fluorescência, chamada de curva de *melting* (Stropa, 2009).

O nível de especificidade dos *primers* é obtido indiretamente por meio da desnaturação do *amplicon* gerado, que foi amplificado em apenas um pico, sendo que no presente estudo foi aproximadamente 82 °C para PME (Figura 12-B), e 84 °C para Beta-Tubulina e Fator de Elongação (Figura 12-C e 12- D). Sendo assim, os *primers* que amplificam o gene alvo e os genes endógenos se mostraram específicos (Figura 12- B, C, D), e todas as amostras analisadas apresentaram resultados positivos no experimento testado, gerando um valor de  $C_T$  para análise da expressão gênica (Figura 12-A).



**Figura 12.** Aquisição dos dados por PCR quantitativo (qPCR).  $C_T$ s obtidos para análise de expressão (A), e curva de desnaturação dos primers (Curva de Melting) que amplificam os genes: PME (B), Beta-tubulina (C) e Fator de alongação (D), respectivamente.

Os resultados da análise de expressão gênica da pectina metil-esterase (PME) selecionada no presente estudo e avaliada ao longo do processo de infecção de *E.grandis* por *P. psidii* podem ser vistos no gráfico abaixo (Figura 13).



**Figura 13.** Expressão relativa da pectina metil-esterase em relação a média dos valores dos genes endógenos do fungo (Beta-tubulina e Fator de alongação) ao longo do processo inicial de infecção de *P.psidii* em *E.grandis*.

A partir da Figura 13 é possível observar que a expressão gênica de pectina metil-esterase é reprimida em relação ao controle de zero hora em todos os tempos. Esse resultado foi comprovado estatisticamente a partir de um teste T com comparação de controle zero hora com cada horários após a inoculação.

Nos tempos de 6 h.a.i., 12 h.a.i., 18 h.a.i. e 24 h.a.i., que correspondem ao processo inicial de penetração do fungo na planta, a expressão do gene PME apresenta-se constante. Durante esses tempos amostrados o patógeno inicialmente produz as estruturas tubo germinativo e apressório que auxiliam mecanicamente para que a hifa de penetração se projete para dentro do hospedeiro e a partir de cada hifa que consegue se estabelecer no mesófilo das folhas, começa a ser formada as células mãe do haustório (Leite,2012),. No tempo 72 h.a.i., quando o fungo já se encontra estabelecido dentro do tecido vegetal é possível observar uma brusca queda da expressão do gene PME em relação aos horários iniciais da infecção. Nesse tempo amostrado as células mãe do haustório já colonizam os tecidos internos da planta e existe a formação intensa de hifas

secundárias, que confirmam que o fungo já se estabeleceu no interior do tecido foliar (Leite, 2012).

*P. psidii* é um fungo biotrófico que cresce e se multiplica apenas na presença de um hospedeiro vivo. A invasão das hifas desse fungo no tecido foliar leva ao contato com o plasma celular, podendo assim haver a transferência de nutriente da planta para o fungo.

No processo de infecção fúngica, as pectinases são enzimas importantes por degradar as pectinas da parede celular da planta, conseguindo assim colonizar o hospedeiro. Entre essas enzimas, a pectina metil-esterase atua alterando a estruturas das pectinas (Romão et al. 2011). Essa pectinase catalisa a desmetilação do C6 do grupo carboxílico de resíduos de galactosil, desesterificando-os (Fischer e Bennett, 1991).

Fungos fitopatogênicos secretam pectinases que degradam as pectinas, principais polímeros presentes na parede celular das plantas. Alguns estudos que envolvem a disruptura de genes alvo mostram que essas enzimas desenvolvem funções importantes na patogenicidade e virulência de vários fungos que causam maceração do tecido como *Alternaria citri* em citros, *Botrytis cinerea* em tomate e *Nectria haematococca* em ervilha (Isshiki et al., 2001; Rogers et al., 2000; Ten Have et al., 1998).

Provavelmente, *P. psidii* também se utiliza de mecanismos parecidos ao de outros fungos patogênicos para colonizar o hospedeiro. As pectinases são as primeiras enzimas a serem secretadas durante a infecção fúngica, como mostrado pelos resultados de qPCR a expressão de PME é maior nas primeiras horas (6, 12, 18 e 24h) após a inoculação do patógeno. É nesse espaço de tempo que *P. psidii* está penetrando nas células de *E. grandis* e provavelmente secretando as pectinases para quebrar as barreiras da parede celular. Já, nas horas mais tardias quando o fungo já se estabeleceu dentro de seu hospedeiro, a expressão dessa enzima é reprimida.

Estudos recentes têm mostrado que as pectinases apresentam papel importante no desenvolvimento de fungos biotróficos. Segundo Oeser et al (2002) as pectinases endopoligalacturonase são os verdadeiros fatores de patogenicidade na interação do fungo *Claviceps purpurea* com centeio, em que a enzima facilita o desenvolvimento biotrófico do fungo sem causar excessiva necrose nos tecidos infectados.

Os resultados obtidos no presente estudo para *P. psidii* sugerem que a pectina metil-esterase (PME) também possui papel importante no desenvolvimento de fungos biotróficos, e provavelmente está relacionada à função de auxiliar o fungo a entrar em seu

hospedeiro e conseqüentemente se desenvolver e se multiplicar. O estudo das pectinases é fundamental para entender os mecanismos de patogenicidade na interação *P. psidii* - *E. grandis*, e abre portas para próximos estudos que visam tentar desenvolver estratégias para impedir a entrada do fungo na planta, melhorando os mecanismos de resistência das plantas de eucalipto e diminuindo as perdas de produtividade encontradas atualmente por causa da ferrugem.

No trabalho de Fu et al. 2015 observou-se que as pectinases pectina liase (PL) de *Phytophthora capsici* estão relacionadas à morte celular na infecção fúngica de pimenta, por meio de técnicas de qPCR. Os resultados desse trabalho mostram que a maior expressão de determinados genes de PL estão relacionados com aumento da virulência da espécie fúngica, mostrando a importância desses genes no sucesso da penetração do fungo *P. capsici* no hospedeiro. Comparando com os resultados obtidos para *P. psidii* no presente trabalho, é possível supor que as pectinases, como PMEs e PLs são fundamentais na interação planta-patógeno, pois elas podem aumentar a virulência do patógeno conforme a expressão gênica das mesmas durante o início do processo de infecção, garantindo a penetração do fungo e o surgimento de doenças.

A partir dos dados obtidos pelo sequenciamento parcial do genoma de *P. psidii* foram observadas a presença de várias pectinases, mostrando a importância dessas enzimas no mecanismo de patogenicidade da *P. psidii* em *E. grandis* (Quecine et al. 2012). Assim, a análise de expressão gênica dessas enzimas durante diferentes estágios do processo de infecção em *E. grandis* é de extrema importância para o entendimento da patogenicidade de *P. psidii*, para que se tenha futuramente resultados efetivos no desenvolvimento de estratégias de controle desse fungo.

Os resultados de expressão gênica da PME durante a infecção de *P. psidii* em *E. grandis* corroboram com resultados observados na literatura. Segundo Romão et al. 2011 as pectinases são as primeiras enzimas extracelulares sintetizadas pelos fungos durante o processo de infecção, visto que essas enzimas degradam a parede celular da planta, tornando-a mais susceptível ao patógeno.

Assim, foi observado no presente trabalho a maior expressão dessa pectinase nos tempos 6, 12, 18 e 24 h.a.i., tempos esses que correspondem ao início da infecção, com a repressão da expressão do gene PME bruscamente em 72 h.a.i., horário onde já ocorre o processo de estabelecimento do fungo na planta, corroborando com os dados obtidos na literatura.

No trabalho publicado por Leite 2012, pelo método de microscopia, foi possível observar a dinâmica do processo de infecção de *E. grandis* pelo fungo *P. psidii*, estabelecendo os horários estudados em relação a essa dinâmica. Leite (2012) observou que nos horários iniciais ocorre a penetração do fungo na planta, sendo seguido pela colonização, estabelecimento e formação de pústulas.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os resultados obtidos por Leite (2012), visto que a expressão de PME foi maior nas horas iniciais da infecção, quando o fungo está penetrando e invadindo os tecidos da planta, visto que é provável que a PME estudada é uma das primeiras enzimas secretadas para auxiliar na degradação das pectinas da parede celular da planta permitindo a infecção. Ao longo do tempo, o gene de PME já não é mais necessário e começa a ser reprimido como observado em 72 h.a.i., visto que o fungo já se encontra estabelecido na planta e inicia a formação das hifas secundárias.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho analisou a expressão gênica da pectinase pectina metil-esterase ao longo do processo de infecção de *Eucalyptus grandis* pelo fungo *Puccinia Psidii*, agente causal da doença ferrugem. Com os resultados das análises de PCR quantitativo em tempo real foi constatada uma repressão na expressão da enzima ao longo do tempo.

Os resultados corroboram com os resultados vistos na literatura consultada, já que as pectinases são enzimas fundamentais nas etapas iniciais do processo de infecção, especialmente a pectina metil-esterase que atua na alteração da estrutura da pectina presente na parede celular do hospedeiro, permitindo que o fungo colonize a planta. Os inibidores de pectina metil-esterase não foram possíveis de serem analisados, pois não foram encontrados *primers* específicos para serem utilizados nas análises de PCR quantitativo.

Os resultados obtidos nesse trabalho se mostraram promissores para um melhor entendimento do processo da interação *Eucalyptus grandis* - *Puccinia psidii*, pouco conhecido até o momento. A inibição da expressão de pectina metil-esterase pode ser uma estratégia para o combate da ferrugem, que causa perdas graves na produção de



eucalipto. Para isso é necessário mais estudos do processo para complementar este trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF (2010) Associação Brasileira de Produtores de Floresta Plantada. **Anuário Estatístico da ABRAF** 2010 Ano Base 2009. 136 p.
- ABRAF (2013) Associação Brasileira de Produtores de Floresta Plantada. **Anuário Estatístico da ABRAF** 2013 Ano Base 2012. 28 p.
- Aime M. C., et al. (2006) An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. **Mycologia** 98:896–905.
- Alfenas A. C., Zauza E.A.V., Maffia R.G., Assis T.F. (2004) Clonagem e Doenças do Eucalipto. 1st Ed. Viçosa MG. Editora UFV
- Andrade, E. N. O Eucalyptus. São Paulo, Companhia Paulista de Estrada de Ferro, 1961. 667p.
- Bracelpa (2014) Dados do setor. Março de 2014. <http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>
- Carnegie A. J., Cooper K (2011). Emergency response to the incursion of an exotic myrtaceous rust in Australia. **Australas Plant Path** 40: 346–359.
- Carnegie, A. J.; Lidbetter, J. R. (2012) Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 13-29, 2012.
- Coutinho, T. A. et al. (1998). Eucalyptus Rust: A disease with the potential for serious implications. **Plant Disease** 82: 819-825.
- Cummins, G. B. e Hiratsuka, Y. (2004) Illustrated Genera of Rust Fungi (APS Press, St. Paul) 3rd Ed., p.407.
- Da Silva Coelho, Irene et al. Identification of differentially expressed genes of the fungus *Hydnangium* sp. during the pre-symbiotic phase of the ectomycorrhizal association with *Eucalyptus grandis*. **Mycorrhiza**, v. 20, n. 8, p. 531-540, 2010.

- De Carvalho, A. D. O.; Alfenas, A.C.; Maffia, L.A.; Do Carmo, M.G.F.(1998). Resistance of *Eucalyptus* Species, Progenies and Provenances to *Puccinia psidii* Winter. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, 33, 139-147.
- Dianese, J. C. (1984). Response of *Eucalyptus* species to field infection by *Puccinia-psidii*. **Plant Disease** 68: 314-316.
- Duplessis, S. et al. (2011). Obligat e biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of National Academy of Sciences**. 108: 9166–9171.
- FAO. State of the World's Forests. Roma, 2009
- Ferreira, F. A. (1981) Eucalyptus rust – occurrence, temperature for the germination of urediniospores, the production of teliospores, alternative hosts and resistance. **Fitopatologia Brasileira** 5: 603-604.
- Ferreira, F. A. (1983). Ferrugem do eucalipto. **Revista árvore** 7: 91-109.
- Figueiredo, M. B.(2001) Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. **O Biológico**, São Paulo, v.63, n.1, p.29-32.
- Fisher, R. L.; Bennett, A. B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.42, p.675-703, 1991.
- Fu, Li et al. Characterization of cell death-inducing members of the pectate lyase gene family in *Phytophthora capsici* and their contributions to infection of pepper. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, n. ja, 2015.
- Glen, M. et al. (2007). *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy a review. **Australasian Plant Pathology** 36: 1-16.
- Ish-Shalom, S.; Lichter, A. Analysis of fungal gene expression by real time quantitative PCR. In: **Molecular and Cell Biology Methods for Fungi**. Humana Press, 2010. p. 103-114.
- Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M. and Yamamoto, H. (2001) Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interact.** 14, 749–757.
- Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

- Joffily, J. (1944) Ferrugem do Eucalipto. **Bragantia**, v.4, n.8, p.475-487
- Jolie, R.P.; Duvetter T.; Van Loey A. M.; Herdrickx M. E. (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. **Carbohydrate Research**, V 345, I 18, p 2583-2595, 10 dec, 2010.
- Jonge, R. , Bolton, M D, Thomma, BPHJ (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. **Current Opinion in Plant Biology** 2011, 14:400–406.
- Leite, T. F. (2012). Análise histológica da interação planta patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter e identificação de genes diferencialmente expressos em plantas resistentes e susceptíveis inoculadas com o patógeno por meio da técnica de *RNA-Seq*. 2012. 178p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luíz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba
- Mora, A.L.; Garcia, C.H. (2000) Eucalypt Cultivation in Brazil. **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, 112p.
- Oeser, B., Heidrich, P. M., Muller, U., Tudzynski, P., Tenberge, K.B. (2002). Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction **Fungal Genetics and Biology** 36: 176–186.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2002-2007, 2001.
- Quecine M. C., Bini A. P., Romagnoli E. M., Andreote F. D., Moon D. H., Labate C. A. (2014). Genetic variability of *Puccinia psidii* populations revealed by PCR-DGGE and T-RFLP markers. **Plant Disease**. 94: 16-23.
- Quecine, M. C., Moon, D. H., Franceschini, L. M., Bini, A., Leite, T. F., Labate, M. T. V., Labate, C. A. (2012) De novo partial genome assembly of the biotrophic eucalyptus rust pathogen *Puccinia psidii*. In: **XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interaction**, Kioto, Japão. (2012).
- Rogers, L. M., Kim, Y.-K., Guo, W., González-Candelas, L., Li, D. and Kolattukudy, P. E. (2000) Requirement for either a host- or pectininduced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 97, 9813–9818.

- Romão, A. S.; Spósito, M. B.; Andreote, F.D.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. (2011) Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. **Genetics and Molecular Research**, 10 (1), 243 - 252
- Roux, J.; Greyling, I.; Coutinho, T. A.; Verleur, M.; Wingfield, M. J. The Myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. **IMA Fungus** · volume 4 · no 1: 155–159, 2013.
- SBS. (2009). O Papel das Florestas Plantadas Para Atendimento das Demandas Futuras da Sociedade. Position Paper apresentado no XIII **Congresso Florestal Mundial /FAO**, Buenos Aires, Argentina
- SNIF, Sistema Nacional de Informações Florestais. Novembro de 2015.  
<http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/as-florestas-plantadas>
- Stropa, C. K. (2009). Enumeração celular pela quantificação absoluta por pcr em tempo real de culturas de bradirrizóbios (Tese de mestrado). Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”. p.108, Jaboticabal, São Paulo.
- Ten Have A., Mulder W., Visser, J. van Kan. J. A. L. (1998), The Endopolygalacturonase Gene *Bcpg1* Is Required for Full Virulence of *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 11: 1009–1016.
- Viégas, A. P. **Índice de fungos da América do sul**. Campinas: Instituto Agronômico. 921p. 1961.
- Winter G (1884). Repertorium. Rabenhorstii fungi europaei et extraeuraopaei. Cent. XXXI et XXXII. **Hedwigia** 23:164–172
- Xavier, A. A. et al. (2001). Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. **Australasian Plant Pathology** 30: 277-281.
- Zeng, Y. e Yang, T. (2002). RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter, Athens** 20: 417a-417e .