

PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES EM TRIGO EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR FERRUGEM DA FOLHA

Alice Casassola¹, Sandra Patussi Brammer², Márcia Soares Chaves², Antônio Nhani Junior², Paula Kuser-Falcão³, Adhemar Zerlotini³, Francesca Stefenato⁴ e
Lesley Boyd⁴

¹Estudante, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo - UPF, Rodovia BR 285, CEP 99052-900, Passo Fundo - RS. E-mail: 69976@upf.br

²Pesquisador, Centro Nacional de Pesquisa de Trigo - CNPT (Embrapa Trigo), Rodovia BR 285, Km 294, CEP 99050-970, Passo Fundo - RS

³Pesquisador, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CNPTIA (Embrapa Informática Agropecuária), Avenida André Tosello, 209, Campinas - SP

⁴Pesquisadora Líder, National Institute of Agricultural Botany - NIAB, Huntington Road, CB3 0OLE, Cambridge - Cambridgeshire, Inglaterra.

A produção nacional de trigo na safra 2014/2015 foi de aproximadamente 5,9 mil toneladas (Conab, 2015). Um dos principais fatores limitantes da produtividade na região sul do Brasil, a qual é responsável por 92% do total produzido, são as doenças fúngicas como giberela, oídio e ferrugem da folha (Lau et al., 2011).

A ferrugem da folha é causada pelo fungo *Puccinia triticina*. Este patógeno possui elevada taxa de especialização fisiológica (Bruce et al., 2014) e é adaptado às condições climáticas da região sul do Brasil. As ferrugens possuem cinco estágios distintos: teliosporos, basidiosporos e uredíniosporos no hospedeiro e picniosporos e aeciosporos nos hospedeiros alternativos, sendo que uma nova geração de uredíniosporos se forma a cada 10-14 dias, disseminando a doença na lavoura (Kolmer, 2013). A resistência genética foi e

continua sendo uma das formas mais efetivas e eficientes de controle, além de ser uma alternativa “limpa”, diminuindo a necessidade de aplicação de produtos químicos para controle da doença.

Toropi é uma cultivar de trigo, lançada em 1965, que apresenta resistência de planta adulta durável à ferrugem da folha. Se sabe que nesta cultivar existem dois genes recessivos que explicam parcialmente essa resistência, temporariamente designados como *Trp-1* e *Trp-2* (Barcellos et al., 2000), localizados nos cromossomos 1A e 4D (Brammer, 2000; Da-Silva et al., 2012). Apesar disso, ainda não se tem muito bem elucidado quais e quantos outros genes, nem as rotas metabólicas que estão envolvidas na resposta de defesa desta cultivar.

Os objetivos deste trabalho foram identificar quais genes e principais rotas metabólicas estão envolvidas na resistência durável à ferrugem da folha na cv. Toropi, visando maior compreensão genética e potencial uso na piramidização de genes.

Plantas de Toropi foram cultivadas em câmaras de crescimento com ambiente controlado e as folhas bandeira no estágio de planta adulta foram inoculadas com uredíniosporos da raça MDT-MR (B55) de ferrugem da folha. Plantas controle foram inoculadas somente com óleo, a fim de subtrair o efeito deste nos resultados. As folhas bandeira foram coletadas em diferentes tempos pós-inoculação, 0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação (hpi). O sequenciamento de RNA (RNA-Seq) foi realizado em triplicatas biológicas para cada horário inoculado e controle, resultando em 24 bibliotecas. A montagem do transcriptoma de referência e a análise dos genes diferencialmente expressos foram realizadas via ferramentas de bioinformática: software Trinity (Grabherr et al., 2011), para montagem do transcriptoma e protocolo RSEM (Li & Dewey, 2011) e software EdgeR (Robinson et al., 2010) para cálculo dos genes diferencialmente expressos. A anotação funcional foi realizada pelo software BLAST (Altschul et al., 1997) e Blast2GO® (Conesa et al., 2005). As bibliotecas foram comparadas par-a-par.

Foram obtidos 2.798.981.764 reads nas 24 bibliotecas. Foram montados 463.371 contigs dos quais 19.633 foram diferencialmente expressos. O tempo

pós-inoculação onde mais genes foram diferencialmente expressos foi 24 hpi (Figura 1A). A formação da célula mãe-de-haustório ocorre aproximadamente 12 hpi e a formação do haustório 24 hpi (Hu & Rijkenberg, 1998; Zhang & Dickinson, 2001), sendo assim a formação dos haustórios pelo patógeno é a etapa que mais ativa genes em trigo cv. Toropi.

O sistema de defesa em plantas pode ser ativa ou passiva, sendo que nas ativas têm-se as rápidas e lentas (Guest & Brown, 1997). O reconhecimento do patógeno pela planta ocorre instante após o contato com o fungo. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que já nos momentos iniciais da infecção, 6 hpi, há uma alteração no perfil de expressão dos genes (Figura 1B), tanto induzidos como reprimidos ou silenciados.

As principais rotas metabólicas, alteradas durante o processo de infecção do patógeno causador da ferrugem da folha na cv. Toropi são geração de precursores metabólicos e energia; catabolismo; transporte; resposta a estímulos e estresses bióticos e abióticos.

Os genes e rotas metabólicas identificadas neste trabalho permitirão um melhor entendimento da resistência de planta adulta da cultivar, viabilizando, num futuro próximo, sua utilização no melhoramento genético da cultura.

Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER W.; LIPMAN, D.J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. Nucleic Acids Research, v.25. n.17, p. 3389-3402, 1997.

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, v. 84, p. 90-93, 2000.

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) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

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*, v. 4, p.520, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra de brasileira de grãos – safra 2014/2015 – maio/2015.** Website. Acessado em 22 mai. 2015. Online. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

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

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*, v. 11, n.3, p.2823-2834, 2012.

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

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.

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*, v.102, p.391-399, 1998.

KOLMER, J. **Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance.** *Forests*, Basel, v.4, p.70-84, 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**. 1ª ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. p. 283-324.

LI, B.; DEWEY, C.N. **RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome**. BMC Bioinformatics, v.12, p.323, 2011.

ROBINSON, M.D.; MCCARTHY, D.J.; SMYTH, G.K. **EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data**. Bioinformatics, v.26, n.1, p.139-140, 2010.

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, v.59, p.137-141, 2001.

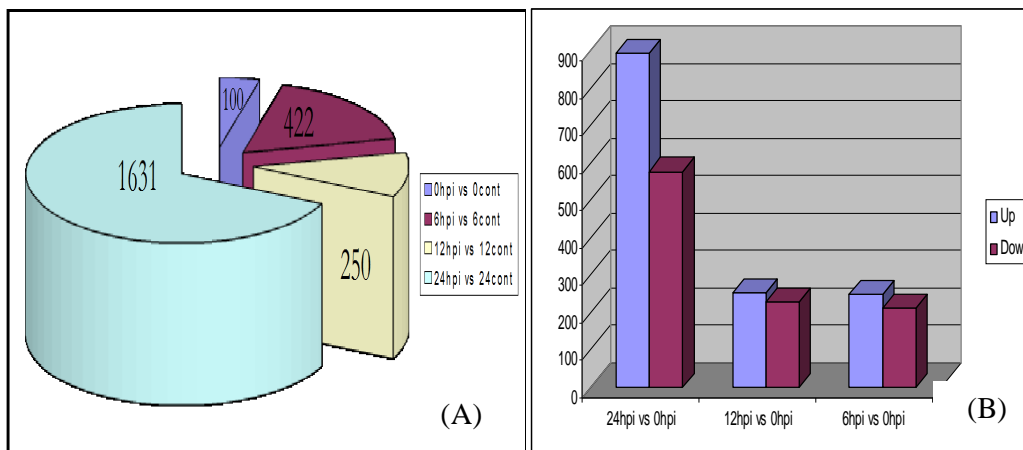


Figura 1 – Contagem de contigs diferencialmente expressos na cultivar Toropi ao longo do tempo de infecção por *Puccinia triticina* (0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação - hpi) na comparação das bibliotecas inoculada (hpi) versus respectivo controle (cont), geradas via sequenciamento (A). Quantidade de contigs que tiveram aumento (up-regulated) ou diminuição (down-regulated) de expressão 24 horas após a inoculação, quando em comparação com seu respectivo tempo zero (B).