

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

Alice Casassola<sup>1</sup>, Sandra Patussi Brammer<sup>2</sup>, Márcia Soares Chaves<sup>2</sup>, Antônio Nhani Junior<sup>2</sup>, Paula Kuser-Falcão<sup>3</sup>, Adhemar Zerlotini<sup>3</sup>, Francesca Stefenato<sup>4</sup> e  
Lesley Boyd<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudante, 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

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

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

<sup>4</sup>Pesquisadora 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.

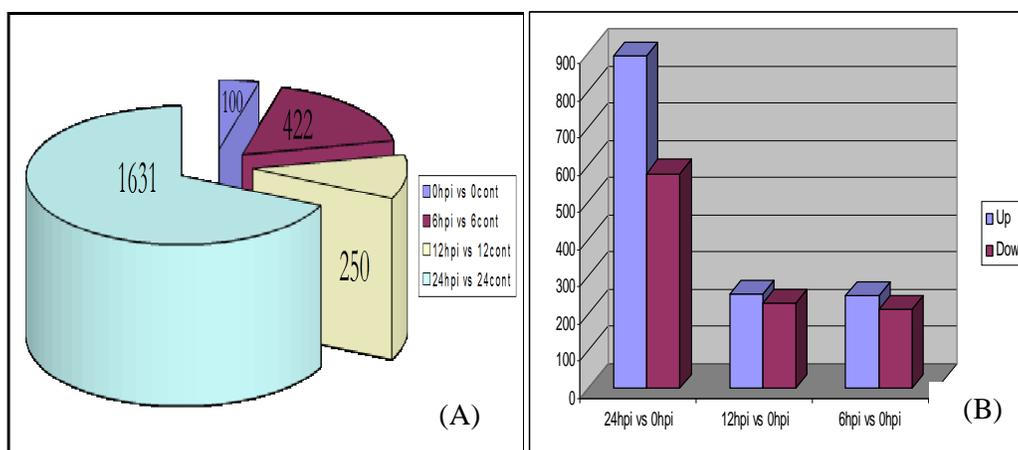


Figura 1 – Contagem de contigs diferencialmente expressos na cultivar Toropi ao longo do tempo de infecção por *Puccinia triticina* (0, 6, 12 e 24 horas após a inoculação - hpi) na comparação das bibliotecas inoculada (hpi) versus respectivo controle (cont), geradas via sequenciamento (A). Quantidade 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).