

BLANCA MERCEDES LEGUÍZAMO BETANCOURTH

**HISTOPATOLOGIA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE  
EXPRESSOS DURANTE A INTERAÇÃO *Ceratocystis fimbriata* -  
*Eucalyptus* spp.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L521h  
2016

Leguízamo Betancourth, Blanca Mercedes, 1984-  
Histopatologia e identificação de genes diferencialmente  
expressos durante a interação *Ceratocystis fimbriata* -  
*Eucalyptus* spp. / Blanca Mercedes Leguízamo Betancourth. –  
Viçosa, MG, 2016.  
x, 151f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Ceratocystis fimbriata*. 2. *Murcha-de-ceratocystis*. 3.  
Eucalipto - Doenças e pragas - Brasil. 4. Eucalipto -  
Melhoramento genético. 5. Variabilidade (Genética).  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento. II. Título.

CDD 22 ed. 632.4

BLANCA MERCEDES LEGUÍZAMO BETANCOURTH

**HISTOPATOLOGIA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE  
EXPRESSOS DURANTE A INTERAÇÃO *Ceratocystis fimbriata* -  
*Eucalyptus* spp.**

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

APROVADA: 19 de julho de 2016

---

Rodrigo Neves Graça

---

Jorge Luis Badel Pacheco

---

Poliane Alfenas Zerbini  
(Coorientadora)

---

Lúcio Mauro da Silva Guimarães  
(Coorientador)

---

Acelino Couto Alfenas  
(Orientador)

*“Não lhe ordenei que seja corajoso e forte? Não fique apavorado nem tenha medo, pois Jeová, seu Deus, estará com você aonde quer que você for” (Josué 1:9). “Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça” (Isaías 41:10).*

*A Deus, que guarda em perfeita paz aquele cujo propósito está firme, porque nele confia (Isaías 26:3), e que sempre cumprirá seus propósitos para comigo, porque Ele não abandona a obra de suas mãos (Salmo 138:8). Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo imenso amor, que me tornou a pessoa que sou. Ao meu esposo, Felipe, e à minha filha, Susana, que chegaram quando menos os esperava, mas quando muito deles precisava, mudando minha vida e me enchendo de amor. Ao meu querido orientador, professor Acelino Couto Alfenas, pela oportunidade de trabalhar na sua equipe, pelo carinho e pelos ensinamentos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso, que antes de eu nascer planejou este momento na minha vida, porque me elegeu desde o princípio para que fosse Dele e recebesse tudo o que Ele tinha prometido. Assim tinha decidido Deus, quem faz todas as coisas seguindo o desígnio da sua vontade (*Efésios 1:11*).

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aos Programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e em Fitopatologia, pela excelente formação oferecida.

Ao Governo brasileiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pesquisa dentro do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG).

Ao meu orientador, professor Acelino Couto Alfenas, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de trabalho, pela orientação, pela dedicação, por todo ensinamento e pelo carinho.

Ao Dr. Lúcio Mauro da Silva Guimarães, pela paciência, pela orientação e pelos conselhos.

À professora Poliane Alfenas, pelos ensinamentos, pelas sugestões e pelo apoio; e aos demais professores dos Programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e de Fitopatologia, pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e à equipe de bioinformática do Laboratório de Genômica e Expressão (*LGE*) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (*Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil*).

A Luciana Souto, Juliana Jose e Marcelo Falsarella, obrigada pela amizade e colaboração nas análises de dados de RNASeq; vocês foram fundamentais para eu alcançar esta meta!

À Clonar Resistência a Doenças Florestais, por me abrir as portas para a realização dos experimentos e cultivar as plantas empregadas nas inoculações. Aos técnicos da Clonar, em especial ao Eduardo, pela colaboração.

Ao Laboratório de Celulose e Papel da UFV, coordenado pelo professor Jorge Colodette, pela avaliação do teor de lignina na primeira parte da pesquisa.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Patologia Florestal, que com conhecimento, amizade e companhia contribuíram para a realização desta meta: Angélica, Dani, Denisse, Natalia, Mara, Paulo, Regiane, Raquel e demais colegas do laboratório; muito obrigada pela sua amizade e pelo o apoio na pesquisa e nos momentos de luta.

Aos meus pais e aos meus irmãos, que com amor sempre me apoiaram e me incentivaram a alcançar esta meta, ainda suportando a distância.

À minha “avozinha” brasileira, Moema Souza, que me brindou com sua amizade, seu carinho, sua casa e seu amor de mãe; sempre vou te levar no coração.

À Adri, Juli, Ángela e Jenny, obrigada por me dar não só amizade, mas também uma família.

Ao Leonardo Corrêa da Silva, que desde minha chegada ao Brasil foi um excelente colega de estudos e amigo; obrigada pela amizade e ajuda.

Ao André Xavier e Marcos Basso, pela amizade e ajuda durante minha pesquisa de doutorado.

A todos vocês que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste sonho. Muito obrigada.

## BIOGRAFIA

**Blanca Mercedes Leguízamo Betancourth**, filha de Idulfo Leguízamo Pulido e de Libia María Betancourt Cano, nasceu no dia 6 de junho de 1984, em Planeta Rica, Córdoba, Colômbia.

Em agosto de 2002, ingressou na Universidade de Córdoba (Colômbia), graduando-se como bióloga em dezembro de 2008.

De maio a julho de 2009, trabalhou como pesquisadora de COLCIENCIAS, no grupo de Investigação Biomédica e Biologia Molecular da Universidad del Sinú-Elías Bechara Zainúm, US, Córdoba (Colômbia).

Em agosto de 2009, ingressou no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil, sob orientação da professora Elza Fernandez de Araújo, concluindo sua dissertação, intitulada “Morfologia da ectomicorriza *Scleroderma laeve* - *Eucalyptus grandis* e análise da expressão do gene que codifica a subunidade seis de atp sintase”, em julho de 2011.

Em julho de 2011, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Acelino Couto Alfenas, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2016.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
<b>CAPÍTULO 1 - Histopatologia da interação <i>Ceratocystis fimbriata-Eucalyptus</i>.....</b>	<b>8</b>
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	39
AGRADECIMENTOS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
<b>CAPÍTULO 2 - Genes diferencialmente expressos durante a interação <i>Ceratocystis fimbriata – Eucalyptus</i>.....</b>	<b>52</b>
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	58
RESULTADOS.....	67
DISCUSSÃO.....	100
AGRADECIMENTOS.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
CONCLUSÕES GERAIS.....	135
ANEXOS.....	137

## RESUMO

BETANCOURTH, Blanca Mercedes Leguízamo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Histopatologia e identificação de genes diferencialmente expressos durante a interação *Ceratocystis fimbriata* - *Eucalyptus* spp.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Coorientadores: Lúcio Mauro da Silva Guimarães e Poliane Alfenas Zerbini.

Com o aumento das áreas plantadas surgem as doenças que incidem na cultura do eucalipto. A murcha-de-*Ceratocystis*, causada por *Ceratocystis fimbriata*, é atualmente uma das doenças mais importantes no Brasil. Esse patógeno é um fungo do solo que pode infectar seus hospedeiros por meio de ferimentos no caule e nas raízes, onde coloniza principalmente os tecidos vasculares e causa escurecimento do lenho e morte das plantas. Uma alteração contínua na resistência de *Eucalyptus* à murcha-de-*Ceratocystis* tem sido observada, variando de altamente suscetível a altamente resistente, o que indica um padrão típico de resistência horizontal. Devido a isto, tem sido sugerido um alto grau de controle genético aditivo e uma baixa influência de dominância alélica. A alta variação genética entre e dentro das famílias parece estar associada com as contribuições para a alta herdabilidade e ganho genético para resistência à murcha-de-*Ceratocystis*. Em *Eucalyptus*, a existência dessa ampla variabilidade inter e intraespecífica para resistência a essa doença torna a seleção de genótipos resistentes a melhor estratégia de controle. No entanto não se conhece, em nível histopatológico, a colonização do patógeno nos tecidos de clones resistentes e suscetíveis e nem os genes que conferem resistência a esse patógeno, informação que é fundamental para obtenção de genótipos com resistência durável. Assim, no presente trabalho objetivou-se comparar, em nível histopatológico, e estudar o transcriptoma durante o processo infeccioso de *C. fimbriata*. Em geral, foram constatadas as mesmas reações em ambos os clones, mas houve variação na intensidade e velocidade da resposta, sendo maior em plantas do clone resistente, capaz de limitar a colonização do fungo nos seus tecidos. Entre essas respostas estiveram a formação de

tiloses, o acúmulo de compostos fenólicos e cristais de oxalato, o fechamento de pontuações nos vasos do xilema, entre outras. Além disso, foram identificados vários genes expressos diferencialmente entre os dois clones testados, tendo sido induzido um maior número desses genes no *pool* R às primeiras horas da interação. Entre eles foram constatados genes codificadores de receptores de membrana, genes relacionados com a sinalização dependente de cálcio e hormônios, fatores de transcrição, genes de proteínas de parede celular, genes envolvidos no sistema redox e na resposta sistêmica adquirida e outros genes de defesa. Desse modo, a resistência à murcha-de-*Ceratocystis* em *Eucalyptus* pode estar relacionada com a velocidade e a intensidade da resposta de defesa ao patógeno.

## ABSTRACT

BETANCOURTH, Blanca Mercedes Leguízamo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Histopathology and identification of genes differentially expressed during the *Ceratocystis fimbriata* - *Eucalyptus* spp. interaction.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Co-advisors: Lúcio Mauro da Silva Guimarães e Poliane Alfenas Zerbini.

With the increase in planted areas, arise diseases that affect the eucalyptus culture. Among these diseases, Ceratocystis wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* is currently one of the most important in Brazil. This pathogen is a soil fungus that can infect their hosts through wounds in the stem and roots, which mainly colonizes the vascular tissues and causes wood darkening and plant death. It has been observed a continuous variation in *Eucalyptus* resistance to the Ceratocystis wilt, ranging from highly susceptible to highly resistant, which indicates a typical pattern of horizontal resistance. Due to this, it has suggested a high degree of genetic control additive and a low allelic dominance influences. The high genetic variation between and within families appears to be associated with contributions to the high heritability and genetic gain for Ceratocystis wilt resistance. The existence in *Eucalyptus*, of that extensive inter and intraspecific variability for resistance to this disease makes the selection of resistant genotypes to better control strategy. However it is not known, in a histopathological level, the pathogen colonization in tissues of susceptible and resistant clones and even genes that confer resistance to this pathogen, key information for obtaining durable resistance genotypes. Thus, this study aimed to compare, in the histopathological level, and study the transcriptoma during the infection process of *C. fimbriata*. In general, the same reactions in both clones were observed, but there was variation in the intensity and velocity of response, being higher in the resistant clone plants, able to limit the colonization of the fungus in their tissues. Among these responses were the formation of tyloses, accumulation of phenolic compounds and oxalate crystals, xylem vessels pores closing, among others. Moreover, several defense genes differentially expressed between the two clones tested were identified, being

induced more of these genes in R *pool* at the early hours of interaction. Among these genes were genes coding for membrane receptors, genes related to calcium and hormones-dependent signaling, transcription factors, cell wall protein genes, genes involved in the Redox system and the systemic acquired response and other defensive genes. Thus, resistance to Ceratocystis wilt in *Eucalyptus* may be related to the speed and intensity of the pathogen defense response.

## INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é a essência florestal mais plantada no Brasil, em virtude de seu rápido crescimento, de sua adaptabilidade em várias condições edafoclimáticas, de sua capacidade de rebrota e do uso múltiplo de sua madeira, especialmente para produção de carvão vegetal, celulose e papel, serraria, mourões de cerca, postes de eletricidade e madeira para energia (ABRAF, 2012; Fernandes et al., 2014). Em 2014, a área de árvores plantada para fins industriais no Brasil totalizou 7,74 milhões de hectares, aumento de 1,8% em relação a 2013. Os plantios de eucalipto ocupam 5,56 milhões de hectares da área de árvores plantadas no País, o que representa 71,9% do total, e estão localizados principalmente nos Estados de Minas Gerais (25,2%), São Paulo (17,6%) e Mato Grosso do Sul (14,5%) (IBÁ, 2015).

Com a expansão da eucaliptocultura para diferentes biomas, a incidência de doenças tem aumentado significativamente no Brasil. Esse aumento ocorre principalmente pelas condições favoráveis à infecção, pelas mudanças nas práticas de manejo da cultura e pelo emprego de poucos clones em extensas áreas, normalmente híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, sem o conhecimento prévio de sua resistência a doenças (Alfenas et al., 2009; Fonseca et al., 2010).

A murcha-de-Ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, é uma das doenças de maior impacto econômico na cultura do eucalipto no Brasil (Alfenas et al., 2009; Ferreira et al., 2012). A doença ocasiona perdas em crescimento volumétrico e qualidade da madeira, levando a elevados prejuízos econômicos, uma vez que pode reduzir até 87% o crescimento volumétrico das árvores no campo e o rendimento de celulose em 13,7%, além de diminuir o valor da madeira para serraria e carvão vegetal (Mafia et al., 2013; Fernandes et al., 2014).

A resistência genética de plantas a fitopatógenos pode ser classificada com base no número de genes envolvidos. A resistência monogênica ou qualitativa é aquela conferida pelo produto da expressão de apenas um gene. Nessa resistência os fenótipos observados nas plantas

são resistentes e/ou suscetíveis, mas não são constatados fenótipos intermediários ou uma distribuição fenotípica descontínua. Pelo fato de essa resistência ser atribuída a um só gene, é mais facilmente superada pelo patógeno, uma vez que só é preciso mudanças genéticas em apenas um locus correspondente ao gene de virulência no patógeno. A resistência poligênica ou quantitativa é aquela atribuída à expressão de vários genes. Essa resistência pode ser chamada de poligênica quando é adjudicada por muitos genes e de oligênica quando é conferida por poucos genes. Neste caso contempla-se uma distribuição fenotípica descontínua, que vai desde a extrema suscetibilidade até a extrema resistência, sendo necessário quantificar a doença para diferenciar os materiais suscetíveis dos genes resistentes. Essa resistência é mais difícil de ser superada pelo patógeno, pois para que surjam variantes deste são requeridas mudanças genéticas em vários loci de patogenicidade (AGRIOS, 2005).

A resistência a uma doença também pode ser classificada como resistência vertical ou horizontal, considerando o espectro de resistência contra diferentes raças do patógeno. A resistência vertical (monogênica) confere imunidade ou hipersensibilidade contra determinadas raças do patógeno, por isso age na redução da quantidade efetiva do inóculo inicial, atrasando o início da epidemia. Já a resistência horizontal (poligênica) tem efeitos parciais e quantitativos, a eficiência de infecção é menor no material resistente, as lesões crescem mais lentamente e os esporos são produzidos mais tardiamente e em menor quantidade, afetando principalmente a taxa de desenvolvimento da doença (Van der Plank 1960, 1966; Robinson, 1976).

Tem-se observado variação contínua na resistência à murcha-de-Ceratocystis, variando de altamente suscetível a altamente resistente, o que indica um padrão típico de resistência horizontal (Zauza et al., 2004). Consequentemente, o alto grau de controle genético aditivo e a baixa influência de dominância alélica têm sido sugeridos. A alta variação genética entre e dentro das famílias parece estar associada às contribuições para a alta herdabilidade e ganho genético para resistência à murcha-de-Ceratocystis (Rosado et al., 2010).

A existência dessa ampla variabilidade inter e intraespecífica para resistência à murcha-de-Ceratocystis em *Eucalyptus* torna a seleção de genótipos resistentes a melhor estratégia de controle (Zauza et al., 2004). Assim, o controle dessa doença é feito por meio do plantio de clones resistentes, selecionados a partir de inoculações artificiais do patógeno em mudas de eucalipto, sob condições controladas (Fonseca et al., 2010). No entanto, não existem pesquisas relacionadas à elucidação dos mecanismos de defesa da planta à doença.

Um dos desafios da fitopatologia é entender em detalhe como os patógenos são reconhecidos pelos seus hospedeiros e como a resistência e a suscetibilidade são estabelecidas. Desse modo, a biologia molecular, a bioinformática e o estudo da expressão gênica nos eventos de patogenicidade têm contribuído significativamente (Verhage et al., 2010; Lodha & Basak, 2012; Schenk et al., 2012; Sedano & CarrascaL, 2012).

Com base nos estudos moleculares das interações planta-patógeno, tem sido possível desenvolver um modelo da função e evolução da imunidade das plantas (Jones & Dangl, 2006). De acordo com esse modelo, conhecido como zigzague, a primeira fase da resposta de defesa na resistência, conhecida como imunidade mediada por PAMP ou PTI (*PAMP triggered immunity*), consiste no reconhecimento de moléculas dos micro-organismos, conhecidas como PAMP (*pathogen associated molecular patterns*) ou MAMP (*microbe-associated molecular patterns*). O reconhecimento de PAMP depende de proteínas conhecidas como PRR (*pathogen recognition receptors*), que são geralmente proteínas de reconhecimento localizadas na membrana plasmática das células da planta (Gómez-Gómez & Boller, 2000; He et al., 2007; Boller & He, 2009; Zipfel, 2009; Thomma et al., 2011). Esse tipo de imunidade geralmente detém a infecção antes que os micro-organismos consigam se multiplicar e é suficientemente eficaz contra agentes patogênicos potenciais não adaptados (Chisholm et al., 2006). Uma vez que a percepção pela PRR acontece, é desencadeada uma cascata de sinalização mediada principalmente por MAP quinases (Göhre & Robatzek, 2008; Colcombet & Hirt, 2008; Beckers et al.,

2009), que leva à ativação de fatores de transcrição e à reprogramação da expressão gênica.

As plantas desenvolvem um segundo ramo da imunidade com base no reconhecimento de proteínas efetoras do patógeno (terceira fase do modelo zigzague), a ETI (*effector triggered immunity*). A ETI depende da presença de proteínas que podem reconhecer os efetores, levando à reprogramação da expressão gênica e à reação de incompatibilidade ou de resistência (Chisholm et al., 2006; Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen; 2010).

O estudo dessa reprogramação da expressão de genes durante a defesa permite conhecer os mecanismos moleculares da resposta, e é possível ser conduzido pela técnica de RNASeq (Sedano & Carrascal, 2012). Desta forma, a indução de vários genes importantes para a defesa das plantas tem sido identificada durante as respostas ETI, por meio da técnica RNA-seq. Como produto da expressão desses genes encontram-se as proteínas PR (*pathogenesis-related proteins*), como quitinasas e glucanasas (Loon & Strien, 1999). O ácido salicílico SA (*salicylic acid*) e o etileno desempenham função reguladora e sinérgica na cascata de sinalização que leva à transcrição desses genes. Também tem sido constatado que a ativação de grupos de genes PR pode ser mediada por patógenos, por meio de um mecanismo chamado resistência sistêmica adquirida ou SAR (*systemic acquired resistance*). Esses genes PR têm se convertido em genes marcadores de defesa, e a medição dos seus níveis de expressão é muito utilizada em estudos de interações planta-patógeno (Slaughter et al., 2012; Zhang et al., 2012; Sedano & Carrascal, 2012).

Por ser o RNAseq uma técnica nova, são poucas as pesquisas relacionadas com interações planta-patógeno em que ela foi utilizada, e até hoje não existia nenhuma relacionada com a interação *Ceratocystis-Eucalyptus*. Portanto, este estudo não só irá contribuir para o melhor entendimento da interação molecular do patossistema, mas também ajudará na identificação de marcadores moleculares no genoma de *Eucalyptus*, o que poderá facilitar a clonagem de genes R. Com a informação gerada, será possível a identificação de novos genes-alvo para uso em transformação

genética, com a finalidade de atingir a expressão de genes, resultando no desenvolvimento de plantas resistentes à murcha-de-*Ceratocystis*. Esta tese consiste de dois capítulos. No primeiro objetivou-se avaliar, por meio de microscopia de luz e de varredura, a colonização de *Ceratocystis fimbriata* nos tecidos de *Eucalyptus* spp. em dois clones com diferentes níveis de resistência e no segundo objetivou-se identificar genes diferencialmente expressos em um *pool* de plantas de *Eucalyptus* spp. resistentes em relação a um *pool* de plantas suscetíveis à murcha-de-*Ceratocystis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF- Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário estatístico da ABRAF**. 2012. Ano Base 2011. Brasília: 2012.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. St. Louis, MO: **Academic Press**. Pg 135. 2005.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**, 2nd ed. Viçosa, Minas Gerais, Brazil: Editora UFV, 500p, 2009.
- BECKERS, G. J. et al. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 21, p. 944-953, Alemanha, 2009.
- BOLLER, T.; HE, S.Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, v.324, p. 742-744, Suíça, 2009.
- CHISHOLM, S. et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, p. 803-814, EE.UU, 2006.
- COLCOMBET, J.; HIRT, H. Arabidopsis MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. **Biochemical Journal**, v. 413, p. 217-226, França, 2008.
- DODDS, P.; RATHJEN, J. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews, Genetics**, v. 11, p. 539-548, EE.UU, 2010.
- FERNANDES, B. V. et al. Damage and loss due to *Ceratocystis fimbriata* in *Eucalyptus* wood for charcoal production. **BioResources**, p. 5473-5479, 2014.
- FERREIRA, M. A. et al. Spatial-temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Forest Pathology**, 2012.
- FONSECA, S.M. et al. **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto**. Editora UFV, Viçosa, p. 200, 2010.
- GOHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 189-215, Alemanha, 2008.
- GÓMEZ-GÓMEZ L.; BOOLLER, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. **Molecular Cell**, v. 5 (6), p. 1003-1011, Suíça, 2000.
- HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions, **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 1385-1396, EE.UU, 2007.
- IBÁ- Indústria brasileira de árvores. **Relatório IBÁ**. 2015. Ano Base 2014. Brasília: 2015.
- JONES, J.; DANGL, J. The Plant Immune System. **Nature** v. 444, p: 323-329, EE.UU, 2006.
- LODHA, T.; BASAK, J. Plant-pathogen interactions: what microarray tells about it?. **Molecular Biotechnology**, v. 50 (1), p: 87-97, Índia, 2012.
- LOON, V.; STRIEN, V. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of pr-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, Holanda, 1999.

- MAFIA, R. G. et al. Impact of *Ceratocystis* wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. **Forest Pathology**, v. 43, n. 5, p. 379-385, 2013.
- ROBINSON, R.A. Plant Pathosystems. **Springer Verlag**, Berlin. 1976.
- ROSADO, C. C. G. et al. Resistance to ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in parents and progênies of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Silvae Genetica**, v. 59, p. 99-106, 2010.
- SCHENK, P.; CARVALHAIS, L.; KAZAN, K. Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help?. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 177-84, Australia, 2012.
- SEDANO, J.C.S.; CARRASCAL, C.E.L. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. **Fitosanidad**, v. 16(2), p. 101-113. 2012.
- SLAUGHTER, A. et al. Descendants of primed arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. **Plant Physiology**, v.158 (2), p. 835-843, Suiza, 2012.
- THOMMA, B.; NURNBERGER, T.; JOOSTEN, M. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. **The Plant Cell**, v. 23, p. 4-15, Holanda, 2011.
- VERHAGE, A.; VAN WEES, S.C.M.; PIETERSE, C.M.J. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?. **Plant Physiology**, v. 154, p. 536-540, 2010.
- VAN DER PLANK JE. Analysis of epidemics. In: Horsfall JG and Cowling EB (eds) *Plant Pathology: An Advance Treatise*, v. (pp 229-289) **Academic Press**. New York, USA. 1960.
- VAN DER PLANK JE. Horizontal (polygenic) and vertical (oligogenic) resistance against blight. **American Potato Journal**, v. 43, Issue 2, p. 43-52. 1966.
- ZAUZA, E. A. V. et al. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v. 88, p. 758-760, 2004.
- ZHANG, Z. et al. Disruption of PAMP-induced map kinase cascade by a pseudomonas syringae effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. **Cell Host & Microbe**, v.1, p. 253-263, China, 2012.
- ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 414-420, Inglaterra, 2009.

# **CAPÍTULO 1**

**Histopatologia da interação *Ceratocystis fimbriata-Eucalyptus***

## Histopatologia da interação *Ceratocystis fimbriata*-*Eucalyptus*

### RESUMO

O controle da murcha-de-Ceratocystis em eucalipto, causada por *Ceratocystis fimbriata*, é realizado por meio de plantio de genótipos resistentes. No entanto, não se conhecem os processos de colonização do fungo e nem os mecanismos que tornam essas plantas resistentes. Os objetivos deste estudo foram comparar o processo de infecção e colonização do patógeno em clones que diferem na resistência, um clone resistente em relação a um suscetível de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, e identificar possíveis mecanismos de resistência à doença. A colonização do fungo em ambos os clones foi analisada por meio de microscopia óptica e eletrônica de varredura. A análise histoquímica, a concentração de lignina e a viabilidade do patógenos nos tecidos também foram avaliadas. Os dois clones testados apresentaram reações similares em relação à infecção, mas diferiram na velocidade e intensidade de resposta. Diferentemente do clone suscetível, que não foi capaz de conter a colonização do fungo em seus tecidos, o clone resistente limitou a colonização do fungo aos vasos do xilema e aos tecidos ao redor dos vasos, por meio do fechamento das pontuações dos vasos, da intensa formação de tiloses e géis, do acúmulo de material amorfo não identificado, dos compostos fenólicos e da lignificação dos tecidos. Foi possível isolar o patógeno nos tecidos de ambos os clones.

**Palavras-chave:** Resposta de defesa do hospedeiro, microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, murcha-de-Ceratocystis, compostos fenólicos, patógeno vascular.

### ABSTRACT

The control of eucalyptus wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* is accomplished by planting resistant genotypes. However, there are not known the fungal colonization processes in eucalyptus plants stem and what are the

mechanisms of resistance to infection. Thus, the aim of this study was to compare the process of infection and colonization of the pathogen in *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* clones that differ in resistance, a resistant clone in relation to a susceptible and to identify possible resistance mechanisms. Fungal colonization in both clones was analyzed using optical and scanning electron microscopy. Histochemical analysis, lignin concentration and the pathogens viability in tissue were also evaluated. Both clones showed similar reactions to infection, but differed in speed and response intensity. Unlike the susceptible clone that was unable to contain the colonization of the fungus in their tissues, the resistant clone limited the fungus colonization to the xylem vessels and tissues surrounding the vessel, by closing the xylem pits (pores), the intensive formation of tyloses and gels, unidentified amorphous material accumulation, phenolic compounds and lignification of tissues. It was possible reisolar the pathogen tissue in both clones.

## **INTRODUÇÃO**

Com a expansão da cultura do eucalipto para as novas fronteiras florestais no Sul, Norte e Nordeste do Brasil e para diversas partes do mundo, têm surgido várias doenças abióticas e bióticas que limitam o plantio de determinados materiais genéticos (Alfenas et al., 2009; Fernandes et al., 2014). Dentre essas, a murcha-de-Ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, é atualmente uma das mais importantes, por causar a morte das plantas, por possuir ampla distribuição geográfica e pelo fato de o patógeno apresentar variada gama de hospedeiros e induzir perdas significativas no crescimento volumétrico e rendimento de celulose e carvão (Alfenas et al., 2009). O patógeno induz o escurecimento longitudinal e radial do lenho e é capaz de infectar os vasos do xilema, o floema e a feloderme e causar murcha, levando a planta à morte (Ferreira et al., 2006). Essa doença pode reduzir em até 87% o crescimento volumétrico das árvores no campo e

o rendimento de celulose em 13,7%, além de diminuir o valor da madeira para serraria (Mafia et al., 2013).

Apesar do impacto econômico dessa doença, pouco se sabe sobre o processo infeccioso de *C. fimbriata* em eucalipto e os mecanismos de resistência da planta. Em geral, a resistência das árvores a patógenos é baseada na sua capacidade de limitá-los a umas poucas células (Duchesne et al., 1992). Os mecanismos de defesa pré-formados, como casca suberizada contendo compostos fenólicos, composição e diâmetro dos vasos do xilema, e os mecanismos induzidos de defesa do hospedeiro, como a deposição de géis e/ou tiloses no sistema vascular, lignificação e suberização da parede celular, assim como a síntese de compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese, são os exemplos mais comuns de mecanismos de resistência do hospedeiro em resposta a patógenos que induzem murcha (Biggs, 1992; Duchesne et al., 1992; Merrill, 1992; Duchesne et al., 1992).

Vários clones de eucalipto resistentes à murcha-de-Ceratocystis já foram identificados, mas os mecanismos de defesa que conferem resistência à infecção pelo fungo ainda não foram elucidados. Análises histológicas da interação *C. fimbriata*-eucalipto devem permitir a descrição da sequência de eventos da interação do fungo em clones de eucalipto que diferem em resistência. Assim, a identificação dos possíveis mecanismos de resistência à infecção pelo fungo pode embasar a obtenção de clones com resistência durável.

Postula-se que a resposta de plantas de eucalipto resistentes à murcha-de-Ceratocystis consiste de um conjunto de mecanismos de defesa estruturais e/ou bioquímicos que ocorrem local e/ou sistemicamente. Neste trabalho objetivou-se avaliar histopatologicamente o processo infeccioso de *C. fimbriata* em clones de eucalipto resistente e suscetível e identificar possíveis mecanismos de defesa das plantas para conter a infecção.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e crescimento das plantas**

Foram utilizados dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, que diferem quanto à resistência à murcha-de-Ceratocystis. O clone CLR212, considerado como resistente, e o clone CLR240, como suscetível, foram previamente avaliados por inoculação artificial na Clonar Resistência a Doenças Florestais<sup>®</sup>. As mudas dos dois clones foram transplantadas para vasos de 2 L de capacidade, contendo substrato Carolina Soil<sup>®</sup> enriquecido com superfosfato simples (6 kg/m<sup>3</sup>) e Osmocote<sup>®</sup> (NPK 19:06:10), e mantidas em casa de vegetação (20-30°C) até atingir diâmetro do caule de aproximadamente 8 mm antes de serem inoculadas.

### **Obtenção e produção do inóculo de *C. fimbriata***

O isolado de *C. fimbriata* (SBS-1) utilizado neste estudo foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal/Bioagro da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e foi identificado pelas características morfológicas e moleculares (Guimarães *et al.*, 2010; Rosado *et al.*, 2010). O fungo foi cultivado em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura MEYA (2% de extrato de malte, 0,2% de extrato de levedura e 2% de ágar) por 15 dias, a  $28 \pm 1$  °C, sob fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . Para a coleta de esporos, água estéril contendo 1% de Tween 20 foi adicionada às placas e, em seguida, a superfície da colônia foi raspada com ajuda de uma alça de Drigalski estéril. A suspensão foi filtrada em uma camada dupla de gaze e ajustada para a concentração de  $2,5 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>.

## **Determinação da resistência dos clones de eucaliptos e a viabilidade de *C. fimbriata***

As plantas de ambos os clones foram inoculadas aos 60 dias após o transplântio. A deposição de 200 µL da suspensão de inóculo em um orifício de 4 mm de profundidade, a 5 cm acima do coleto, foi realizada nas plantas, por meio de agulha hipodérmica esterilizada (2 mm de diâmetro). Em seguida, o ponto de inoculação foi coberto com filme de PVC e as plantas foram incubadas em casa de vegetação com temperatura e umidade relativa média de 25,2°C e 78,9%, respectivamente. Após 60 dias de incubação, a severidade da doença foi avaliada, conforme previamente descrito (Oliveira et al., 2015). Durante a avaliação da doença, foram retirados fragmentos dos tecidos do caule no ponto de inoculação e o fungo foi isolado pelo método de isca biológica de cenoura (Alfenas et al., 2009), com o objetivo de verificar a viabilidade do fungo nos tecidos dos clones inoculados. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições, sendo cada planta considerada uma repetição. O experimento foi repetido uma vez.

## **Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos estádios iniciais do processo infeccioso de *C. fimbriata***

Plantas de ambos os clones foram inoculadas aos 45 dias após o transplântio. Para isso, fez-se um ferimento (cerca de 2 cm de comprimento x 2 mm de profundidade) no caule das mudas e aplicou-se 0,5 mL da suspensão de inóculo a  $1,5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ , contendo Tween 20 a 1%. A concentração de inóculo empregada foi mais baixa do que a utilizada nos outros experimentos, para facilitar a visualização da colonização inicial do fungo no caule. Plantas que receberam apenas solução aquosa de Tween 20 a 1% serviram como testemunha. Em seguida, o ferimento foi coberto com filme de PVC e as mudas permaneceram em posição horizontal por 12 horas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento (temperatura de  $28 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Amostras de caule de 0,5 x 0,5 cm

foram coletadas às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após a inoculação (hai). O preparo e as análises das amostras no MEV foram realizados como previamente descrito (Araújo et al., 2014a). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada planta uma repetição. O experimento foi repetido uma vez.

### **Microscopia de luz dos estádios avançados do processo infeccioso de *C. fimbriata***

As plantas de ambos os clones, com 45 dias de transplântio, foram inoculadas por meio de uma agulha hipodérmica, conforme previamente descrito. Plantas sem ferimento e as plantas feridas e injetadas somente com solução aquosa de Tween 20 a 1% serviram como testemunha. Após a inoculação, as plantas foram incubadas em casa de vegetação, com temperatura e umidade relativa média durante a condução do experimento de 24,5°C e 83,7%, respectivamente. Amostras de tecido do caule foram coletadas a 1, 2, 4, 6, 8, 16 e 32 dai e fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e álcool 70%, na proporção de 5: 5: 90 v/v (Johansen, 1940). Em seguida, as amostras foram armazenadas em solução de álcool etílico 70%. As amostras foram desidratadas em série alcóolica etílica (80, 90 e 95%) e incluídas em hidroxietil metacrilato (Historesin<sup>®</sup> Leica) e, então, foram preparadas conforme instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas por meio de cortes transversais e longitudinais de aproximadamente 5 µm de espessura, com o auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica). Os cortes foram corados com azul de toluidina (pH 4,0) por 10 utos (O'Brien et al., 1964; O'Brien & Mccully, 1981) e montados com resina sintética (Permount-Fisher), para investigar a colonização de *C. fimbriata* nos tecidos do caule. Os cortes também foram submetidos a testes histoquímicos, para identificação de compostos fenólicos (cloreto férrico) e amido (lugol; 1% iodo + 2% iodeto de potássio) (Johansen, 1940). As amostras sem a adição de qualquer reagente ou corante foram montadas em água e utilizadas como testemunha, para comparar os padrões das reações. A captura e a análise das imagens foram

realizadas em microscópio de luz Olympus BX53, equipado com câmera Olympus Q-Color 5<sup>TM</sup> America INC e sistema de análise de imagens (programa Image Pro Plus Version 7.0). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada planta considerada uma repetição. O experimento foi repetido uma vez.

### **Determinação da concentração de lignina**

Plantas dos dois clones, aos 45 dias do transplântio, foram inoculadas por meio de uma agulha hipodérmica, conforme previamente descrito. Plantas feridas com agulha hipodérmica que receberam apenas solução de água e tween serviram como testemunha. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade relativa média de 23,9°C e 81,4%, respectivamente, durante a condução do experimento. Seis dias após a inoculação, foram coletadas amostras do caule (2 cm abaixo e 5 cm acima do ponto de inoculação). As amostras coletadas foram colocadas em saco de papel e secas em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir peso constante. Determinou-se a concentração de lignina solúvel em ácido de acordo com o procedimento padrão da *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* (Tappi), *Useful method* UM 250, e a concentração de lignina insolúvel em ácido (lignina Klason), com uma adaptação do procedimento padrão da *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* (Tappi), T222 om-98. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada planta uma repetição.

### **Análises estatísticas**

Os dados de severidade da doença e das concentrações de lignina solúvel e insolúvel foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan (5%). A avaliação da normalidade e homogeneidade foi realizada com os resíduos, não tendo sido constatados

desvios das pressuposições envolvidas na análise. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* R (R Development Core Team).

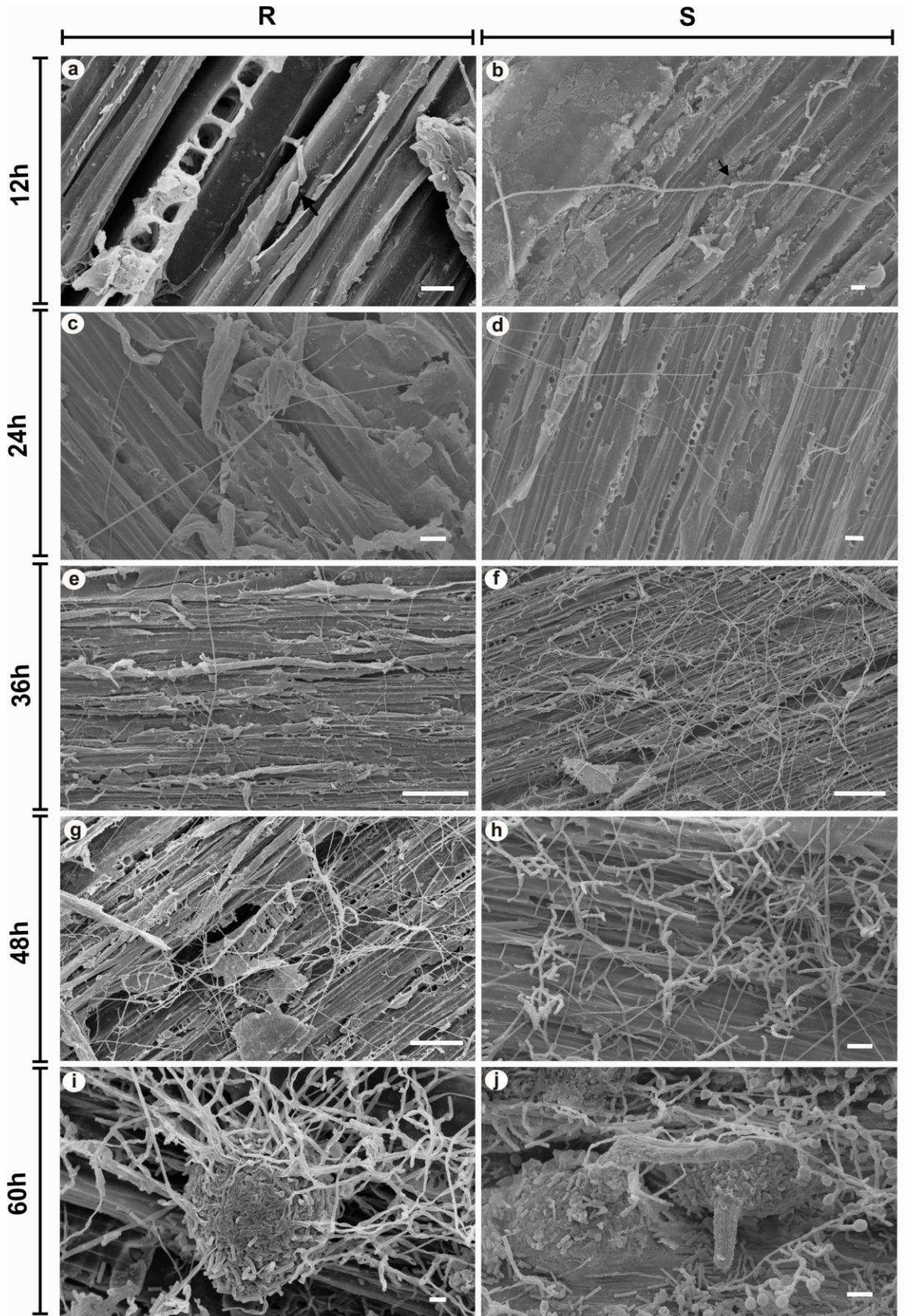
## **RESULTADOS**

### **Determinação do nível de resistência dos clones de eucaliptos e a viabilidade de *C. fimbriata***

Os resultados dos dois experimentos não diferiram estatisticamente, portanto os dados foram apresentados como a média dos dois experimentos. Os clones diferiram significativamente quanto ao nível de resistência e apresentaram, respectivamente, 67 e 6% do comprimento do caule colonizado pelo fungo aos 60 dai. Além disso, diferentemente do clone resistente, todas as plantas do clone suscetível murcharam. O fungo foi reisolado a partir de tecidos lesionados de ambos os clones avaliados, devendo ser ressaltado que no clone resistente o fungo manteve-se restrito ao ponto de inoculação.

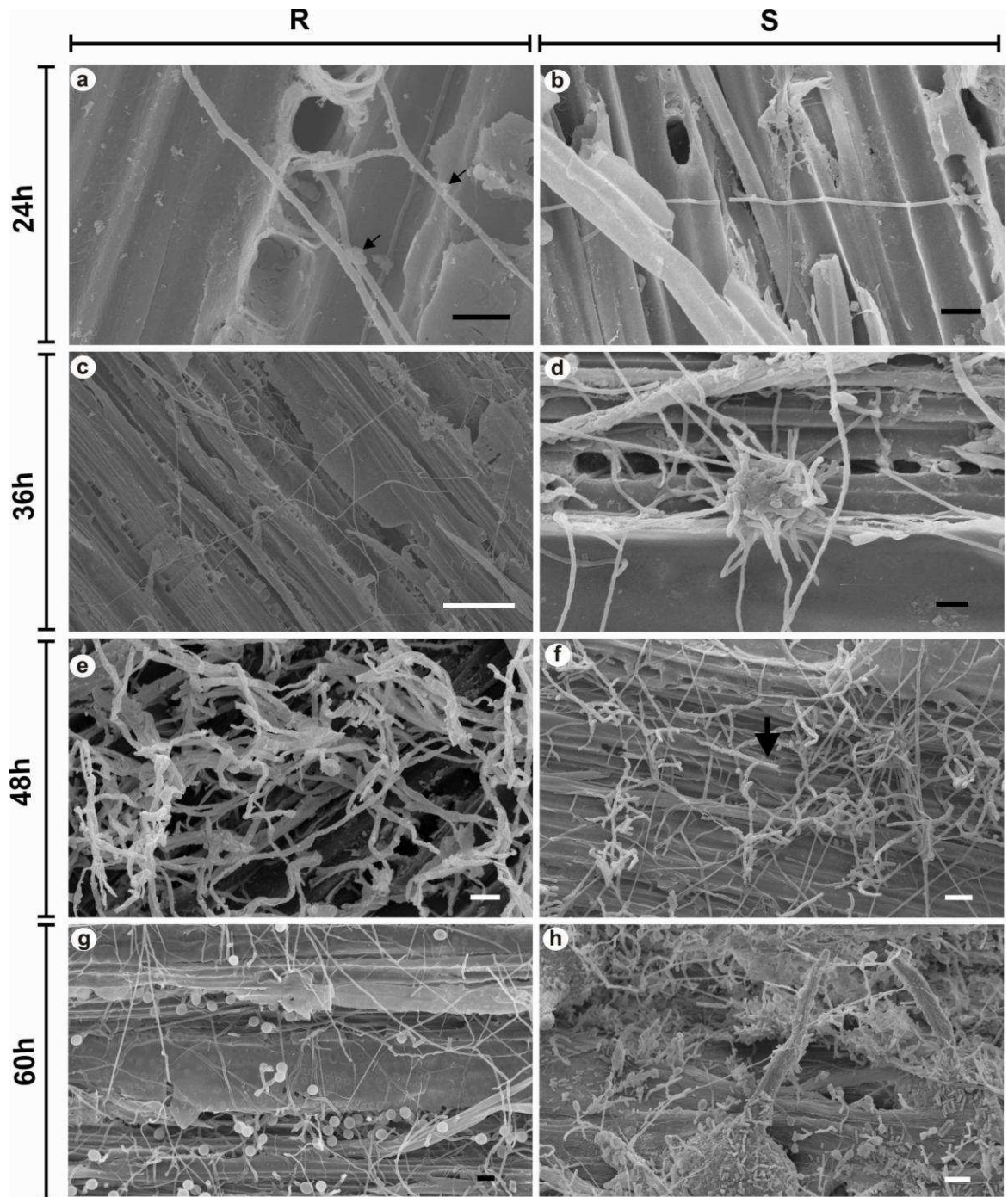
### **MEV dos estádios iniciais do processo infeccioso de *C. fimbriata***

O maior desenvolvimento das hifas e a rapidez na diferenciação das estruturas reprodutivas do fungo, como conidióforos, conídios, aleuroconídios e peritécios, foram observados nos tecidos do clone suscetível (Figuras 1 e 2). Às 12 hai, ocorreu a germinação dos conídios no caule das plantas dos dois clones (Figuras 1a e 1b). Às 24 hai, houve o aumento no crescimento das hifas do fungo, sendo mais intenso no clone suscetível (Figuras 1a-1j).



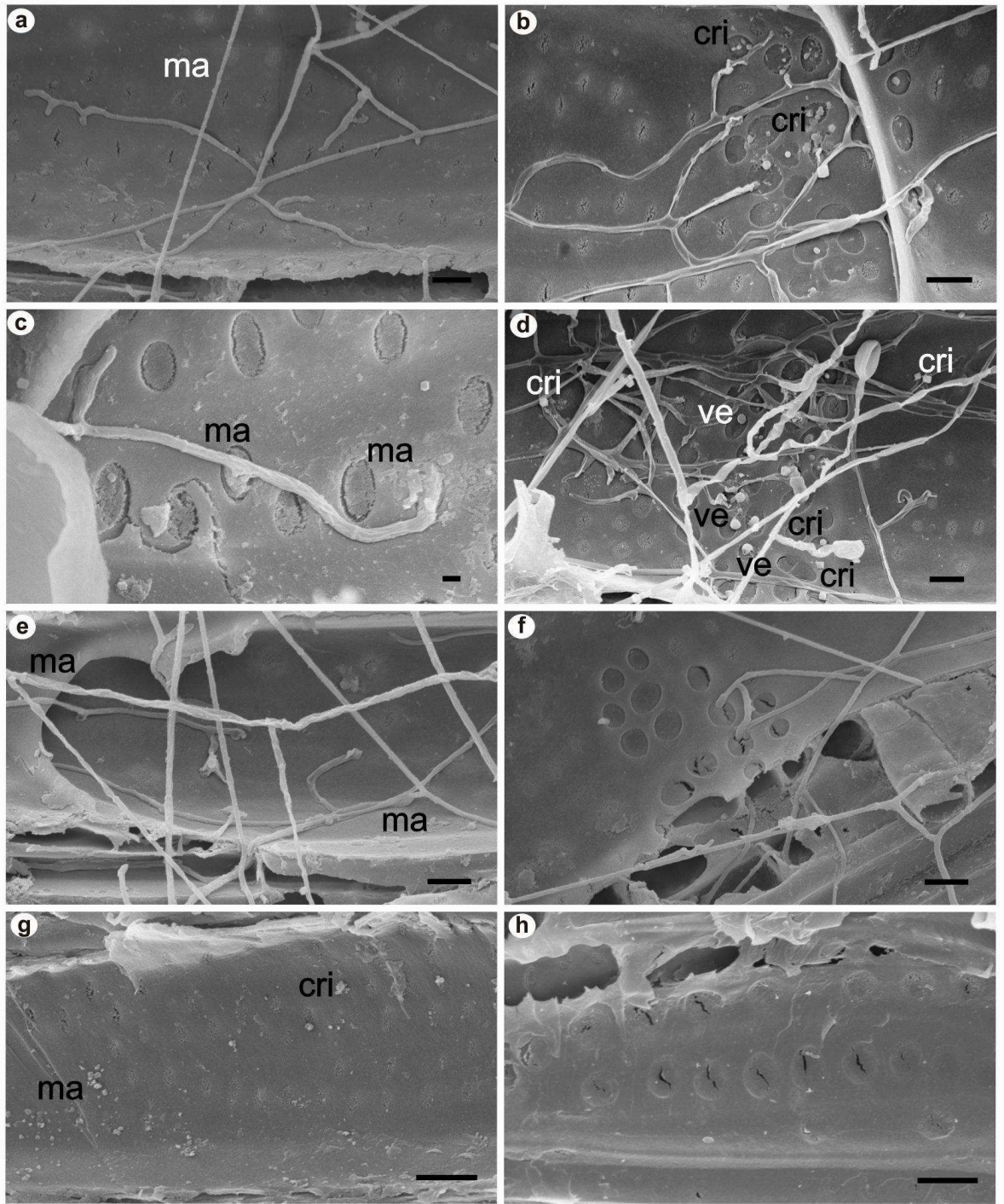
**Figura 1** - Colonização dos tecidos do caule do clone resistente (R) CLR212 e suscetível (S) CLR240 de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* por *Ceratocystis fimbriata*, nos tempos de 12 (**a, b**), 24 (**c, d**), 36 (**e, f**), 48 (**g, h**) e 60 horas (**i, j**) após a inoculação (hai), observada sob microscopia eletrônica de varredura. Barras de escalas 10  $\mu\text{m}$  (a, b, i), 20  $\mu\text{m}$  (c, h, j), 30  $\mu\text{m}$  (d) e 100  $\mu\text{m}$  (e, f, g).

Às 24 hai, constatou-se o acúmulo de material amorfo envolvendo as hifas do fungo nas amostras do clone resistente (Figura 2a), o que não foi observado no clone suscetível (Figura 2b). Às 36 hai, foram observados apenas crescimento micelial sobre o clone resistente (Figura 2c) e formação de peritécios nos tecidos do clone suscetível (Figura 2d). Às 48 hai, observou-se a desidratação de hifas do fungo nos tecidos do clone resistente (Figura 2e) e grande quantidade de conidióforos formados sobre os tecidos do clone suscetível (Figura 2f). Às 60 hai, em contraste com o clone suscetível, foram observados muitos aleuroconídios e poucos conidióforos, conídios e peritécios no clone resistente (Figura 2g). Já no clone suscetível foram verificados vários peritécios, conidióforos, conídios, além de aleuroconídios (Figura 2h).



**Figura 2** - Análise por microscopia eletrônica de varredura da colonização de *Ceratocystis fimbriata* sobre os clones resistente (R) CLR212 (a, c, e, g) e suscetível (S) CLR240 (b, d, f, h) de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, nos tempos 24 (a, b), 36 (c, d), 48 (e, f) e 60 horas (g, h) após a inoculação (hai). Barras de escalas 10  $\mu$ m (a-c) e 20  $\mu$ m (d-f).

Ao analisar a colonização do fungo especificamente nos vasos do xilema, constatou-se que às 24 hai houve também acúmulo de material amorfo envolvendo as hifas fúngicas no clone resistente (Figura 3a). Neste mesmo clone, notou-se a desidratação progressiva de hifas (Figura 3b). Nesse período, as hifas do fungo não ultrapassaram as pontuações do vaso do xilema e não atingiram o tecido parenquimático, provavelmente em virtude do fechamento e do acúmulo de material amorfo nessas pontuações (Figura 3c). A desidratação dos aleuroconídios, o acúmulo de oxalato de cálcio e a formação de vesículas nas pontuações, provavelmente contendo compostos fenólicos, foram também observados (Figura 3d). No clone suscetível constatou-se o acúmulo de material amorfo e desidratação de hifas, a partir de 36 hai (Figura 3e), mas em menor intensidade, quando comparado com plantas do clone resistente (Figuras 3b e 3d). Notou-se também a penetração do fungo através das pontuações do xilema, permitindo a colonização do tecido parenquimático (Figura 3f). Nas amostras das plantas do tratamento-testemunha, as pontuações do xilema das plantas resistentes estavam aparentemente fechadas, em todos os tempos de incubação, houve acúmulo de material amorfo e presença de oxalato de cálcio sobre as pontuações e nos demais tecidos do xilema (Figura 3g). No clone suscetível constatou-se que as pontuações do xilema estavam parcialmente fechadas, com menor acúmulo de material amorfo e de oxalato de cálcio (Figura 3h).

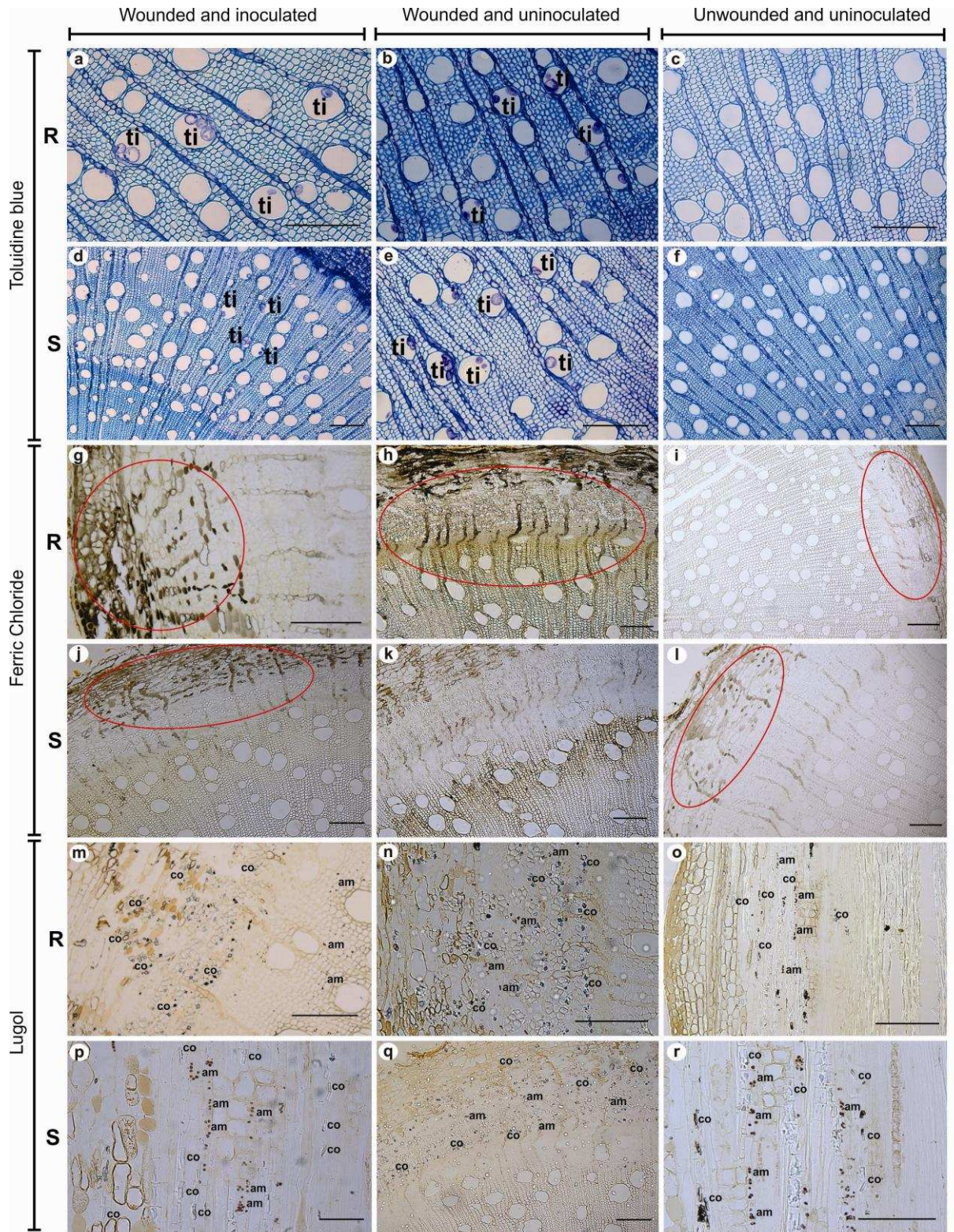


**Figura 3** - Colonização de *Ceratocystis fimbriata* em vasos do xilema do clone resistente (a, b, c, d, g) e suscetível (e, f, h) de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* observada sob microscopia eletrônica de varredura. Acúmulo de material amorfo (ma) sobre estrutura vegetativa do fungo 24 horas após inoculação (hai) (a), murchamento de hifas (b), pontuações do xilema fechadas com acúmulo de material amorfo (ma) (c); acúmulo de cristais (cri) e

formação de vesículas (ve) sobre pontuações do xilema (d) no clone resistente às 36 hai. Acúmulo de material amorfo (ma), desidratação (e) e penetração de hifas através das pontuações do xilema (f) no clone suscetível às 36 hai. Nesse mesmo tempo, pontuações do xilema fechadas e maior acúmulo de cristais (cri) e material amorfo (ma) em plantas resistentes não inoculadas (g) e presença de cristais (cri) e pontuações do xilema parcialmente fechadas em plantas suscetíveis não inoculadas (h). Barras de escalas 10 µm (a, b, d, e, f, g, h) e 2 µm (c).

### **Microscopia de luz dos estádios avançados do processo infeccioso de *C. fimbriata***

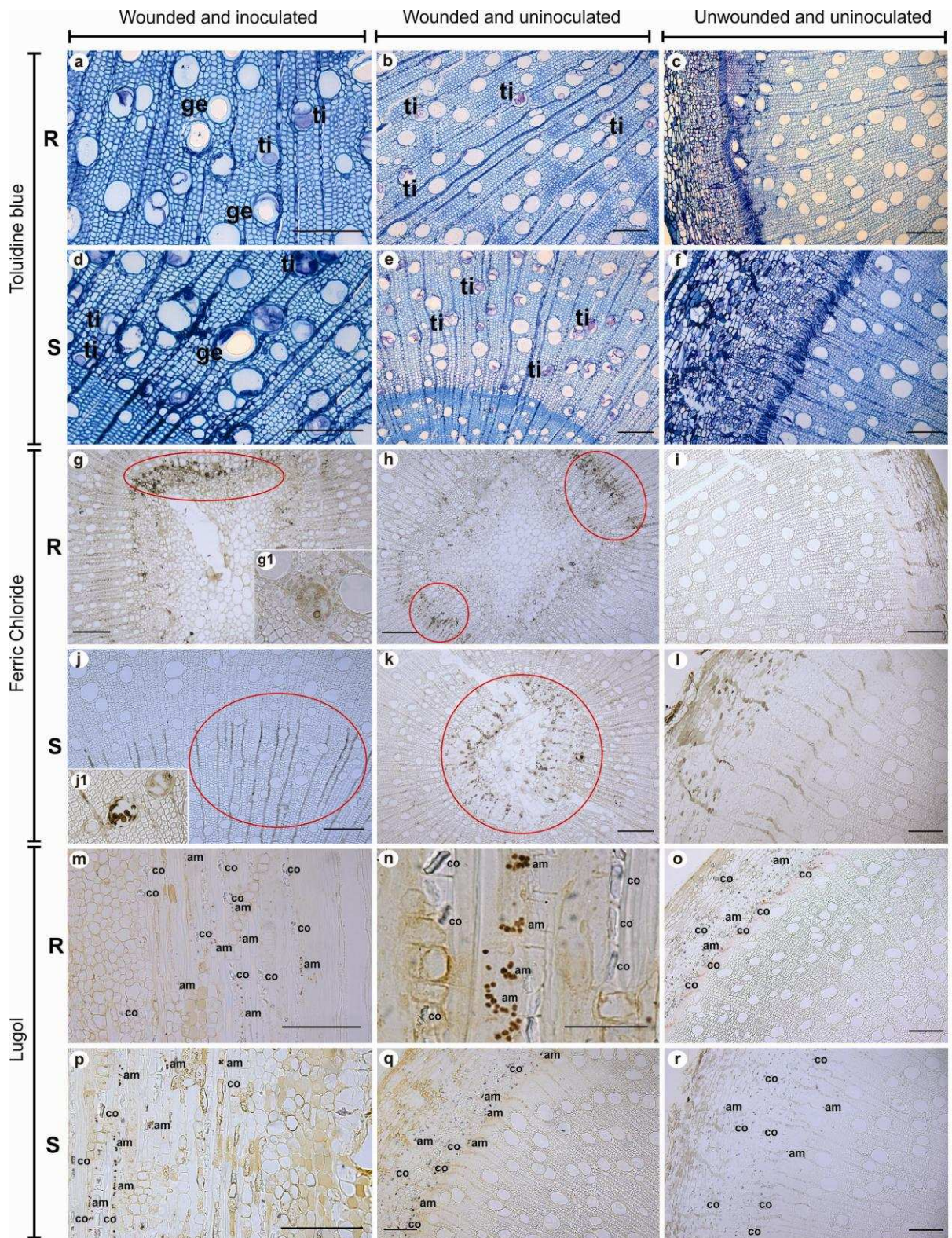
Por meio da análise histoquímica dos tecidos, constatou-se diferença na intensidade de colonização do fungo nos tecidos dos dois clones, assim como resposta das plantas à infecção. Às 24 hai (1 dia), observou-se o início da formação de tiloses nos vasos do xilema em ambos os clones inoculados (Figuras 4a e 4b). A presença de oxalato de cálcio e o acúmulo de amido na periderme e no floema (Figuras 4c e 4d) e de compostos fenólicos nos raios, na medula e principalmente na periderme (Figuras 4e e 4f) também foram observados em maior intensidade nos tecidos do clone resistente. Em caule de plantas feridas e não inoculadas com o fungo de ambos os clones, essas características também foram observadas (Figuras 4g-4l), tendo o acúmulo de compostos fenólicos ocorrido em maior intensidade no clone resistente que no suscetível. Nos tecidos das plantas intactas (sem ferimento) não foram observadas tiloses (Figuras 4m e 4n) e houve menos oxalato de cálcio e maior quantidade de amido na periderme e no floema (Figuras 4o e 4p), em comparação com as plantas inoculadas e feridas e não inoculadas. Notou-se também presença de compostos fenólicos nos tecidos de ambos os clones, concentrando-se principalmente na periderme (Figuras 4q e 4r), sendo menos expressiva em plantas feridas e inoculadas.



**Figura 4** - Análises histoquímicas de seções do caule dos clones resistente (**R**) e suscetível (**S**) de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, 24 horas após inoculação com *Ceratocystis fimbriata*, corados com azul de toluidina (**a - f**), cloreto férrico (**g - l**) e Lugol (**m - r**). Início da formação de tiloses nos vasos do xilema (ti) em plantas inoculadas (**a, d**) e não inoculadas (**b, e**); plantas sem ferimento não apresentando tilose nos vasos (**c, f**). Acúmulo de compostos fenólicos, principalmente na periderme e nos raios em plantas do clone resistente e suscetível inoculadas (**g, j**), não inoculadas (**h, k,**) e não feridas (**i, l**), sendo em maior intensidade em plantas do clone resistente e menor em plantas não feridas. Presença de cristais de oxalato (co) e acúmulo de amido na periderme e floema (am) em plantas do clone resistente e suscetível inoculadas (**m, p**), não inoculadas (**n, q**) e não feridas (**o, r**). Barras de escalas = 100 µm.

Às 48 hai, notou-se uma reação mais intensa das plantas à infecção e ao ferimento no clone resistente do que no suscetível. No clone resistente inoculado, notou-se o aumento na quantidade e no tamanho das tiloses e a presença de géis nos vasos do xilema (Figura 5a). Foram constatados também acúmulo de compostos fenólicos na medula, nos raios (Figuras 5g e j) e em torno de estruturas do fungo nos vasos do xilema (Figuras 5g<sub>1</sub> e j<sub>1</sub>). Verificou-se ainda o acúmulo de amido na periderme e no floema e de oxalato de cálcio (Figura 5m). No clone suscetível inoculado houve também aumento na quantidade e no tamanho das tiloses nos vasos do xilema (Figura 5d). Houve acúmulo de compostos fenólicos principalmente nos raios, sendo esse menor no clone suscetível (Figura 5j). O acúmulo de amido na periderme e no floema e de oxalato de cálcio também foi observado (Figura 5p). Nas plantas de ambos os clones que foram feridos e não inoculados notou-se presença de tilose nos vasos do xilema, mas sem presença de géis (Figuras 5b e 5e). A maior deposição de compostos fenólicos também foi observada nos tecidos do clone resistente, em relação ao suscetível (Figuras 5h e k). Constatou-se o acúmulo de amido na

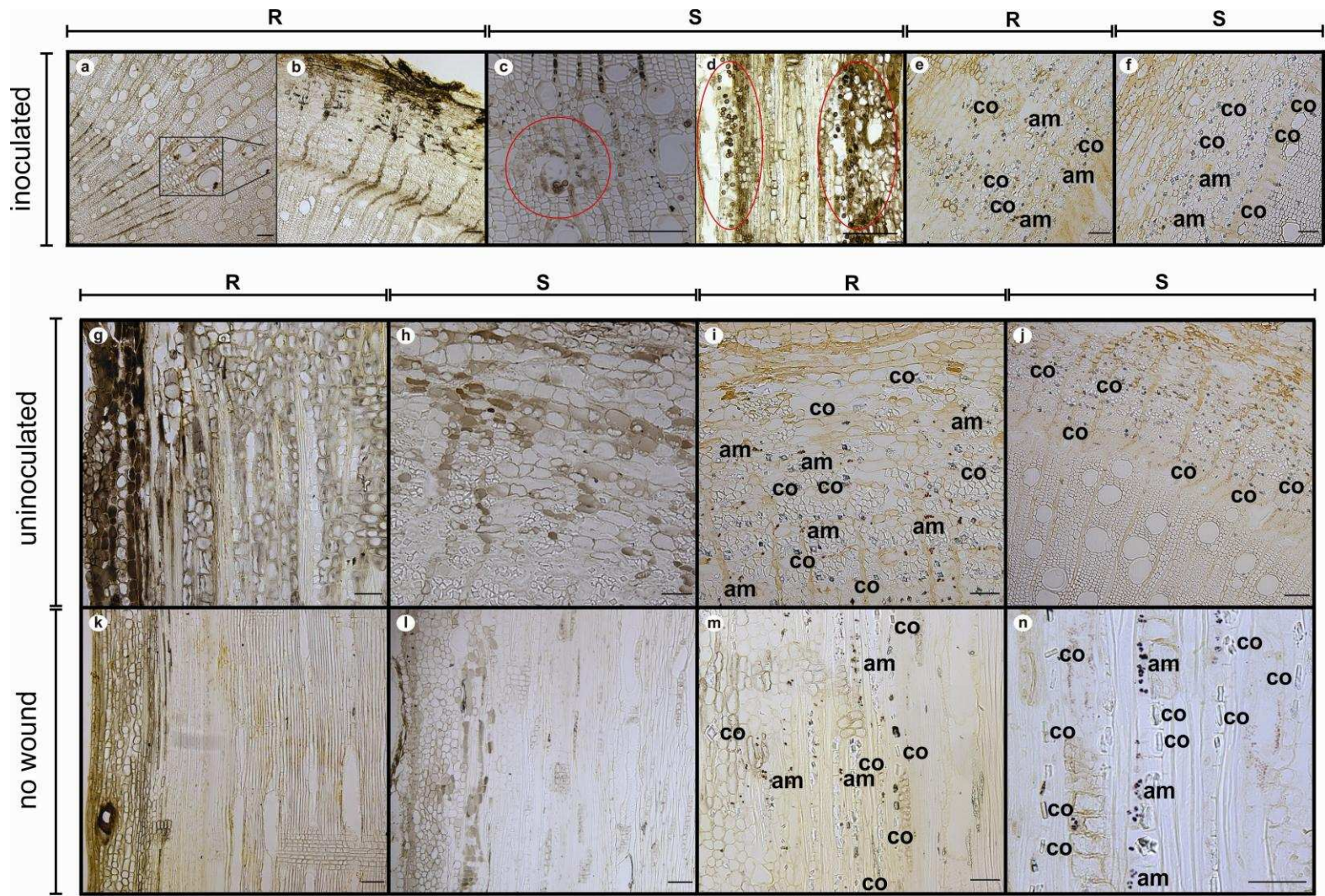
periderme e no floema e de oxalato de cálcio em ambos os clones (Figuras 5n e q). Nos vasos do xilema das plantas sem ferimento do clone resistente e suscetível, não foram observadas tiloses (Figuras 5c e f). O acúmulo de fenóis foi observado principalmente na periderme (Figuras 5i e l), mas em menor intensidade que nas plantas feridas e as inoculadas. A presença de oxalato de cálcio e a baixa quantidade de amido também foram verificadas nessas plantas (Figuras 5o e r). No 4º dia, foram observadas as mesmas reações citadas, aumentando apenas a intensidade das reações (dados não apresentados).



**Figura 5** - Seções do caule de plantas resistente (**a, b, c, g, h, i, m, n, o**) e suscetível (**d, e, f, j, k, l, p, q, r**) de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* 2 dai, coradas com azul de toluidina (**a-f**), cloreto férrico para compostos fenólicos (**g-l**) e Lugol para amido (**m-r**). Houve

tiloses (ti) em plantas feridas inoculadas e não inoculadas de ambos clones (**a, b, d, e**). Géis em vasos do xilema de plantas inoculadas de ambos os clones (ge) (**a, d**). Compostos fenólicos na medula, nos raios e nos vasos do xilema em ambos os clones e ao redor das estruturas fúngicas (elipse) (**g, h, j, k**). Acúmulo de amido em periderme e floema (am) e cristais de oxalato (co) na periderme (**m, n, p, q**) em ambos os clones. As plantas sem ferimento não apresentaram essas características (**c, f, i, l, o, r**). Barras de escalas = 100  $\mu\text{m}$  (a-m, o-r) e =50  $\mu\text{m}$  (n).

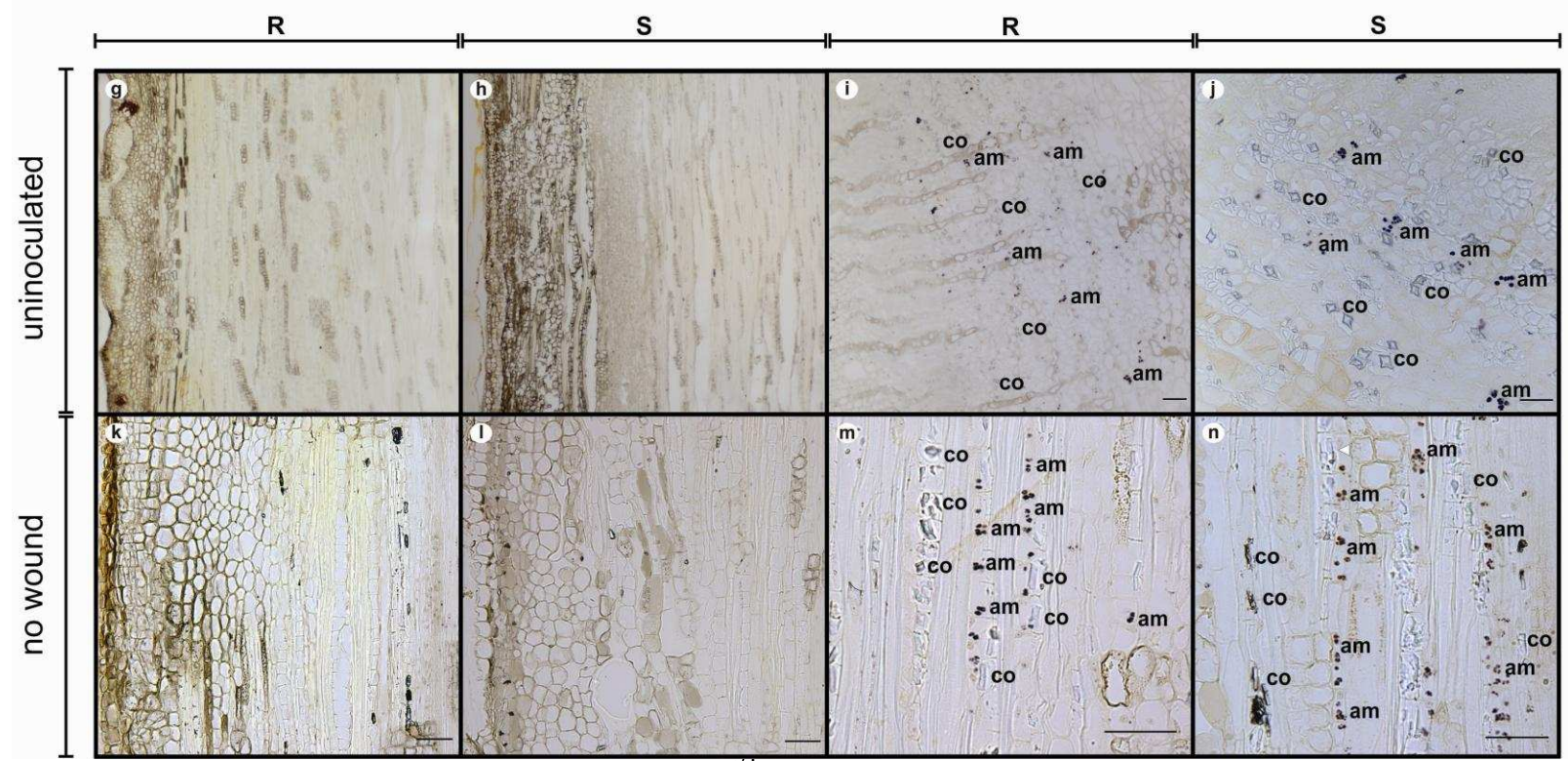
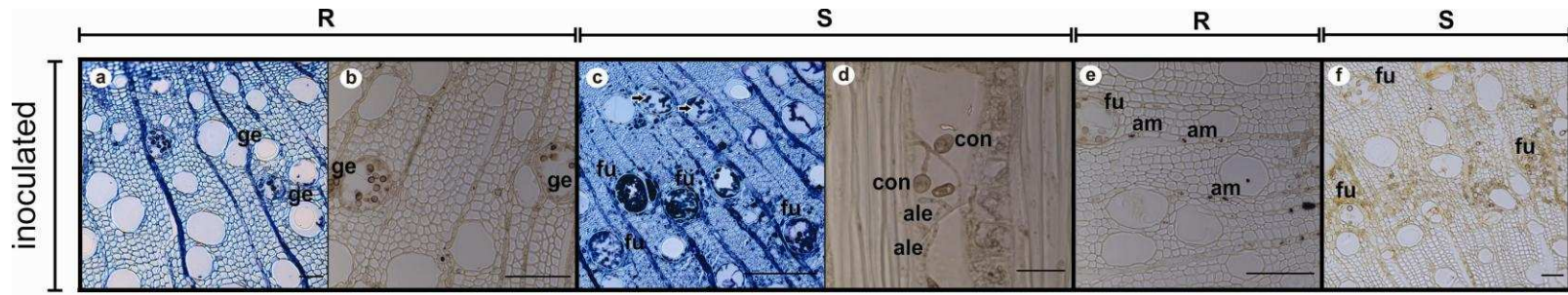
No 6º dia, verificou-se baixa colonização do fungo nos tecidos do clone resistente, ficando limitado aos vasos do xilema e rodeado por compostos fenólicos (Figura 6a). Notou-se também uma grande quantidade de compostos fenólicos depositados nos raios e na periderme (Figuras 6a e b). No clone suscetível, ocorreu degradação dos tecidos do caule, devido à colonização do patógeno (Figura 6c), incluindo a colonização do fungo na região da periderme (Figura 6d), que até aquele momento não tinha sido observada. Notou-se pouco amido nos tecidos dos dois clones inoculados e uma quantidade significativa de oxalato de cálcio (Figuras 6e e f). Nas plantas com ferimento e não inoculadas de ambos os clones, foi observado acúmulo de compostos fenólicos, principalmente na periderme (Figuras 6g e h), sendo em maior intensidade no clone resistente. Verificou-se também acúmulo de amido no floema e na periderme, principalmente do clone resistente e de oxalato de cálcio (Figuras 6i e j). Nos tecidos do caule de ambos os clones sem ferimento houve baixo acúmulo de fenóis (Figuras 6k e l), mesmo assim em maior concentração no clone resistente. O acúmulo de oxalato de cálcio e de amido foi pouco observado (Figuras 6m e n).



**Figura 6** - Seções do caule de plantas resistente e suscetível de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* aos 6 dai, coradas com cloreto férrico para compostos fenólicos (**a-d, g, h, k, l**) e Lugol para amido (**e-f, i, j, m, n**). Compostos fenólicos depositados em raios e periderme em plantas inoculadas do clone resistente (**a e b**). Degradação dos tecidos do caule (elipse) (**c**) e colonização do fungo na região da periderme (elipse) (**d**) em plantas inoculadas do clone suscetível. Pouco amido (am) e quantidade significativa de cristais oxalato de cálcio (co) em plantas inoculadas de ambos clones (**e e f**). Acúmulo de compostos fenólicos em plantas com ferimento de ambos os clones (**g e h**). Acúmulo de amido (am) e oxalato de cálcio (co) no floema e na periderme em ambos os clones (**i e j**). Baixo acúmulo de fenóis em plantas sem ferimento de ambos clones (**k e l**). Acúmulo de cristais (co) e pouco amido (am) (**m e n**). Barras de escalas = 50  $\mu\text{m}$  (a, b, e, f, g-n) e = 100  $\mu\text{m}$  (c, d).

No 8º dai, verificou-se que a colonização do fungo nos tecidos do caule das plantas resistentes permaneceu praticamente restrita aos vasos do xilema (Figuras 7a e b). Constatou-se também intenso acúmulo de material amorfo e géis em torno das estruturas do fungo nos vasos. Detectou-se acúmulo de compostos fenólicos nos vasos e nos raios e acúmulo de amido nos raios próximo às estruturas do patógeno (Figura 7e). No clone suscetível, houve aumento na colonização do fungo em todos os tecidos do caule e obstrução vascular do xilema pelas estruturas do patógeno (Figuras 7c e d). Notou-se, também, acúmulo de material amorfo e géis ao redor do fungo, nos vasos. Não foi observada presença de amido nos raios e próximo ao fungo (Figura 7f). Nos vasos do clone resistente houve somente aleuroconídios e nos vasos do clone suscetível foram encontrados aleuroconídios e conídios (Figura 7d). Nas plantas feridas e não inoculadas notou-se acúmulo de compostos fenólicos, principalmente na periderme de ambos os clones (Figuras 7g e h). A presença de cristais de oxalato de cálcio e amido também foi verificada na periderme dos clones

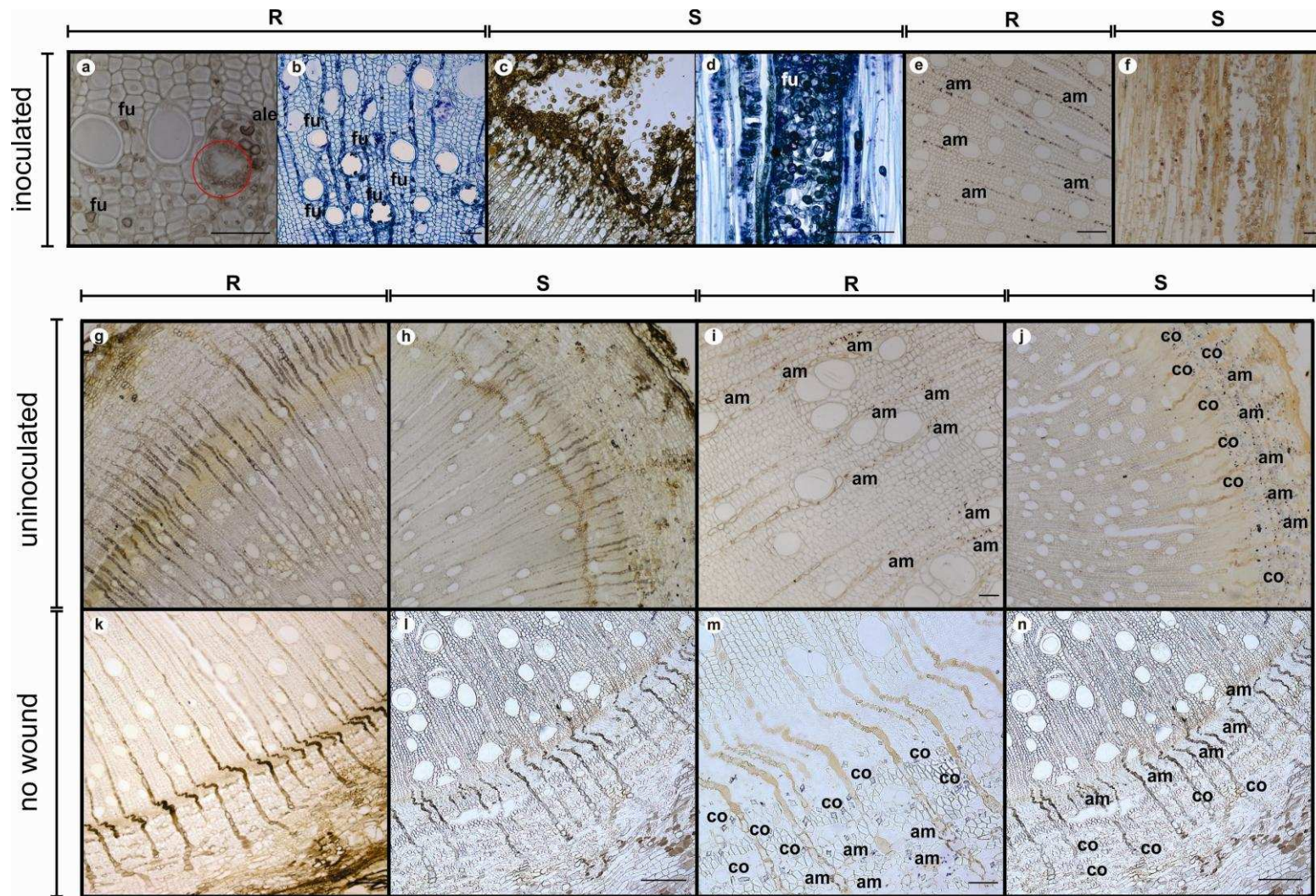
(Figuras 7i e j). Nas plantas não feridas houve também acúmulo de compostos fenólicos (Figuras 7k e l), principalmente na periderme do clone resistente, mas em menor intensidade que as plantas que sofrem injúria mecânica e pelo patógeno. Notou-se a presença de oxalato de cálcio e também maior quantidade de amido na periderme de ambos os clones (Figuras 7m e n), em relação às plantas inoculadas e feridas.



**Figura 7** - Análises histoquímicas de seções do caule do clone resistente (R) e suscetível (S) de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, 8 dias após a inoculação, coradas com azul de toluidina (**a, c**), cloreto férrico (**b, d, g, h, k, l**) e Lugol (**e, f, i, j, m, n**). Colonização do fungo limitada ao vaso do xilema do clone resistente (**a, b**), com presença de géis no xilema (ge). Colonização do fungo em todos os tecidos do caule e entupimento dos vasos do xilema pelas estruturas do fungo no clone suscetível (fu) (**c**). Presença de aleuroconídios (ale) e conídios (con) no vaso do clone suscetível (**d**). Acúmulo de amido nos raios próximo ao patógeno (fu) no clone resistente (am) (**e**). Ausência de amido próximo à colonização do fungo (fu) nos tecidos do clone suscetível (**f**). Nos clones feridos e não inoculados, houve acúmulo de compostos fenólicos, principalmente na periderme (**g, h**), acúmulo de amido no floema e periderme (am) e de cristais de oxalato de cálcio (co) (**i, j**). No tratamento sem ferimento houve pouco acúmulo de fenóis nos tecidos do caule dos clones (**k, l**). Presença de amido (am) e cristais (co) na periderme de ambos os clones (**m, n**). Barras de escalas = 50 µm (**a, d, f, i, j, k, l, m, n**) e = 100 µm (**b, c, e**).

Ao 16º dia, o fungo colonizou os tecidos adjacentes aos vasos do xilema no clone resistente, com acúmulo de compostos fenólicos (Figuras 8a e b). Material amorfo ao redor do patógeno nos vasos, murchamento das estruturas do fungo (Figura 8a) e aumento na quantidade de amido, principalmente no raio, próximo ao local de desenvolvimento do fungo (Figura 8e) também foram observados. No clone suscetível houve degradação intensa dos tecidos da planta devido à colonização do fungo (Figura 8c). Os vasos do xilema foram totalmente colonizados pelo fungo, causando seu entupimento (Figura 8d). Não foi constatado amido próximo ao fungo, pois os tecidos estavam degradados (Figura 8f). Nas plantas do clone resistente que foram feridas e não inoculadas, houve maior acúmulo

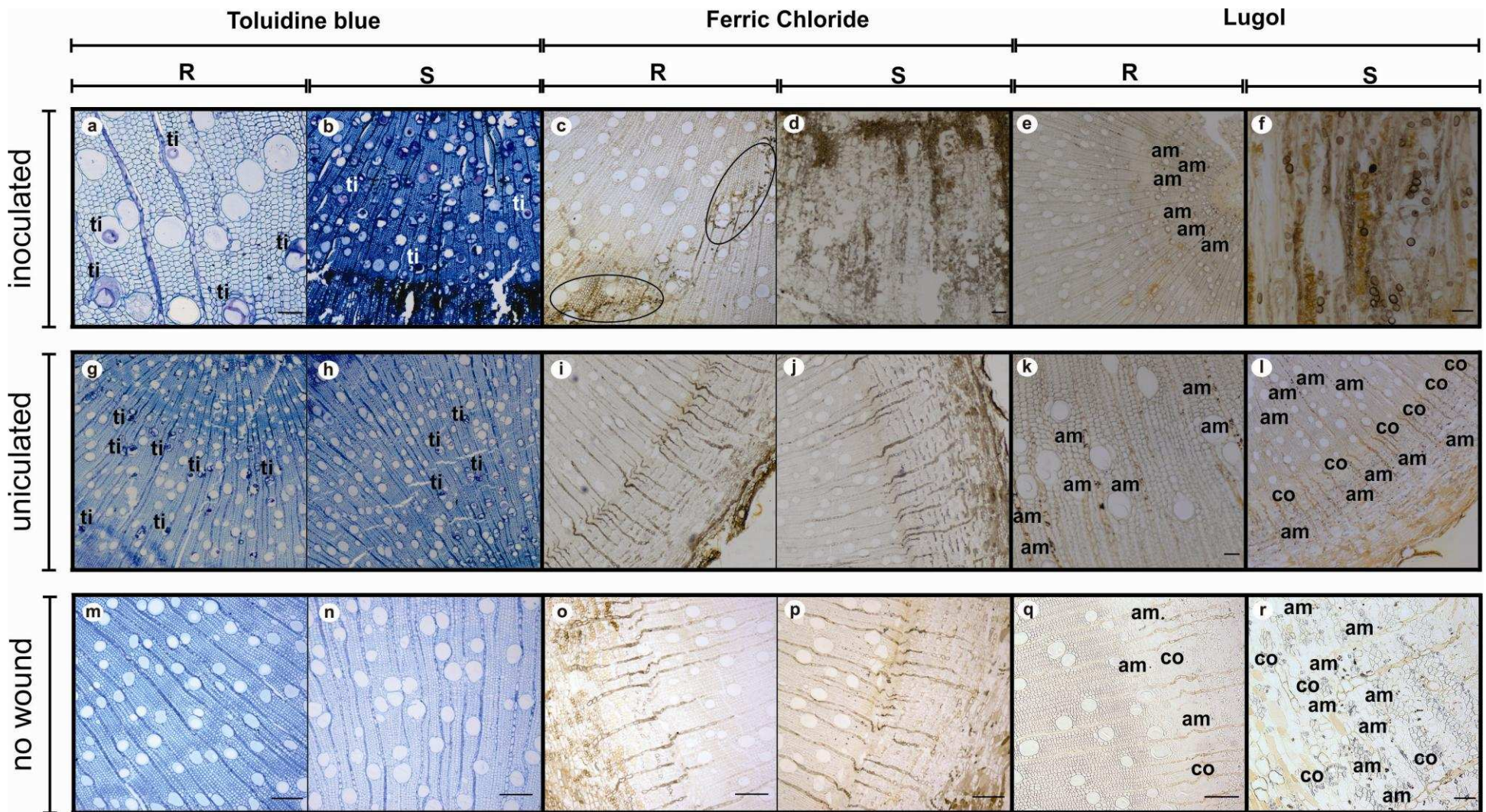
de fenóis na periderme e nos raios, em relação ao clone suscetível (Figuras 8g e h). O acúmulo de amido nos raios também foi verificado nas plantas do clone resistente (Figura 8i), e no suscetível o acúmulo foi verificado na periderme (Figura 8j). Nas plantas não feridas, não houve amido nos raios dos dois clones, apenas na periderme (Figuras 8m e n), e baixa quantidade de fenóis, sendo maior na periderme, principalmente do clone resistente (Figuras 8k e l).



**Figura 8** - Análises histoquímicas de seções do caule do clone resistente (R) e suscetível (S) de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, 16 dias após a inoculação, coradas com azul de toluidina (**b, d**), cloreto férrico (**a, c, g, h, k, l**) e Lugol (**e, f, i, j, m, n**). Fungo (fu) em vaso do xilema e tecidos adjacentes do clone resistente (**a, b**), com acúmulo de compostos fenólicos (elipse) no local colonizado e murchamento de aleuroconídio (ale). Colonização do fungo com degradação dos tecidos do caule e entupimento dos vasos do xilema pelas estruturas do fungo no clone suscetível (**c, d**). Amido (am) em raios do clone resistente (**e**). Ausência de amido nos tecidos do clone suscetível (**f**). Acúmulo de compostos fenólicos na periderme e raios em clones feridos e não inoculados, (**g, h**). Acúmulo de amido (am) nos raios do clone resistente (**i**). Cristais de oxalato de cálcio (co) e amido (am) na periderme do clone suscetível (**j**). Acúmulo de fenóis nos tecidos do caule dos clones sem ferimento (**k, l**). Presença de amido (am) e cristais (co) na periderme de ambos clones (**m, n**). Barras de escalas = 50 µm (a-d, f-k, n) e =100 µm (e, l, m).

No 32º dia após a inoculação, no clone resistente, notou-se a presença das tiloses nos vasos com reduzida degradação e colonização dos tecidos da planta pelo fungo (Figura 9a). Uma alta concentração de compostos fenólicos nos tecidos colonizados pelo patógeno também foi constatada (Figura 9c), assim como o acúmulo de amido nos raios e na medula (Figura 9e). Por outro lado, em plantas do clone suscetível, houve o aumento da colonização e a degradação dos tecidos do caule (Figuras 9b e d), e não foi possível visualizar o acúmulo de amido nos tecidos devido à sua degradação (Figura 9f). A presença de tiloses nos vasos também foi observada (Figura 9b). Nas plantas feridas e não inoculadas de ambos os clones, também foram observadas tiloses nos vasos (Figuras 9g e h). Houve o acúmulo de compostos fenólicos na periderme e nos raios em ambos os clones, com maior intensidade no clone resistente (Figuras 9i e j). Observou-

se maior acúmulo de amido nos raios do clone resistente e na periderme do clone suscetível (Figuras 9k e l). Nos tratamentos sem ferimentos, não foram observadas tiloses em ambos os clones (Figuras 9m e n), mas notou-se a presença de compostos fenólicos, principalmente na periderme e nos raios (Figuras 9o e p). Constatou-se o acúmulo de amido e oxalato de cálcio somente na periderme, ainda que em baixa quantidade, em ambos os clones (Figuras 9q e r).



**Figura 9** - Análises histoquímicas de seções do caule do clone resistente (R) e suscetível (S) de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, 32 dias após a inoculação, coradas com azul de toluidina (**a, b, g, h, m, n**), cloreto férrico (**c, d, i, j, o, p**) e Lugol (**e, f, k, l, q, r**). Tiloses em clones resistente (ti) (**a**) e suscetível (**b**). Baixa colonização do fungo no clone resistente, com pouca degradação dos tecidos da planta e alta concentração de compostos fenólicos nos tecidos colonizados pelo patógeno (elipse) (**c**). Colonização e degradação de tecidos do caule do clone suscetível (**d**). Acúmulo de amido (am) nos raios e na medula no clone resistente (**e**). Degradação de tecidos do caule do clone suscetível (**f**). Poucas tiloses e de menores tamanhos em ambos os clones feridos e não inoculados (ti) (**g, h**). Acúmulo de fenóis na periderme e nos raios em ambos os clones feridos (**i, j**). Acúmulo de amido (am) e cristais (co) nos raios no clone resistente e na periderme no clone suscetível (**k, l**). Ausência de tiloses em vasos de ambos os clones sem ferimentos (**m, n**). Concentração de fenóis em periderme e raios de ambos os clones (**o, p**). Pouco acúmulo de amido (am) em periderme em ambos os clones e de cristais (co) (**q, r**). Barras de escalas = 50  $\mu\text{m}$  (**d, s, k**) e = 100  $\mu\text{m}$  (**m, o, p, q, r**).

### **Determinação da concentração de lignina**

Houve aumentos significativos na concentração de lignina insolúvel, solúvel e total de 20,1; 29,2; e 21,6%, respectivamente, para as plantas do clone resistente inoculado com *C. fimbriata*, em relação ao clone resistente não inoculado (Tabela 1). Para o clone suscetível inoculado, houve aumento significativo apenas para a concentração de lignina solúvel de 27,6 %, em relação às plantas não inoculadas do mesmo clone. O clone resistente inoculado apresentou os maiores teores de lignina, em relação aos outros tratamentos.

**Tabela 1** - Análise dos teores de lignina insolúvel, solúvel e totais dos clones CLR212 (resistente) e CLR240 (suscetível) inoculados ou não, seis dias após inoculação do fungo *Ceratocystis fimbriata*

Materiais Genéticos	Teores de Lignina (%)		
	Insolúvel	Solúvel	Total
CLR212 inoculado	25.73 a	5.66 a	31.39 a
CLR212 não inoculado	21.43 c	4.38 b	25.81 c
CLR240 inoculado	24.47 ab	4.85 b	29.32 b
CLR240 não inoculado	24.33 b	3.80 c	28.13 b

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5%.

## DISCUSSÃO

Este trabalho fornece evidências de que plantas de eucalipto respondem diferencialmente à infecção de *C. fimbriata*, de acordo com o seu nível basal de resistência. No clone resistente, foi possível identificar mecanismos de defesa capazes de conter a colonização de *C. fimbriata* em seus tecidos. Esse clone limitou o desenvolvimento do fungo nos seus tecidos, enquanto o suscetível não foi capaz de evitar que o fungo colonizasse todos os tecidos do caule, resultando na murcha de plantas. Ambos os clones apresentaram praticamente as mesmas reações à infecção e ao ferimento, devendo ser ressaltado que no clone resistente a resposta foi mais rápida e em maior intensidade que no clone suscetível, como também observado no patossistema *Verticillium longisporum*-oilseed rape (Eynck et al., 2009). Em eucalipto, isso pode ser explicado pelo fato de os clones serem derivados das mesmas espécies (*E. urophylla* x *E. grandis*). Além disto, parece não haver um mecanismo específico que confira resistência ou suscetibilidade aos clones ao fungo *C. fimbriata*. No entanto, essa observação merece uma investigação mais aprofundada. A resistência do clone CLR212 pode estar relacionada à velocidade de resposta da planta ao patógeno, que ocorreu logo no contato do fungo com a planta, e à

intensidade das reações da planta à infecção. A defesa bem-sucedida a doenças vasculares depende da capacidade da planta em reagir por meio de uma cascata temporal e espacial de respostas de defesa durante a invasão vascular e colonização pelo patógeno (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Essas reações também foram verificadas em outros trabalhos com *Ceratocystis* spp., em outras espécies de plantas (Clérivet et al., 2000; Santos et al., 2013).

O clone resistente apresentou mecanismos de defesa pré e pós-formados. Nas plantas sem ferimento, houve pouco acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos, principalmente na periderme. Nas plantas feridas e não inoculadas e nas que foram inoculadas, houve uma intensa reação no local da inoculação e do ferimento, com produção de barreiras físicas e bioquímicas para conter o fungo, e no caso das plantas somente feridas, para evitar a entrada de microrganismo e compartimentação da lesão. No local da infecção, inicialmente notou-se uma grande produção de tilose e mais tarde de géis nos vasos do xilema. Especialmente no clone resistente, houve o aumento na lignificação das paredes das células e um rápido aumento na produção de compostos fenólicos, que constituem barreiras à colonização do patógeno. De acordo Sinha e Wood (1968), a resistência a doenças vasculares é baseada na formação rápida de barreiras físicas, géis ou tiloses que retardam ou mesmo impedem a propagação do patógeno nos vasos.

A colonização do fungo no clone resistente ficou praticamente restrita aos vasos do xilema. Somente nos períodos mais longos de incubação foi possível verificar uma pequena colonização do fungo no tecido parenquimático. A completa resistência à infecção vascular tem sido considerada improvável (Beckman, 1987). Neste estudo, constatou-se que houve fechamento das pontuações dos vasos e acúmulo de compostos fenólicos e de substâncias amorfas como barreira física e bioquímicas, impedindo que o fungo atingisse o tecido parenquimático. Outros trabalhos também demonstraram que as plantas limitaram a colonização de fungos em local específico nos vasos do xilema e, conseqüentemente, liberam moléculas antimicrobianas com o intuito de eliminar o patógeno de seus

tecidos (Sinha & Wood, 1968; Dixon & Pegg 1969; Baayen & Elgersma, 1985; Benhamou, 1995; Clériveret et al., 2000; Chen et al., 2004; Santos et al., 2013).

Uma intensa formação de tilose nos elementos de vasos também foi observada nas plantas inoculadas ou somente feridas de ambos os clones. As tiloses ocorrem como resultado de ferimento ou infecção por fungos ou bactérias (Kuroda, 1991; Sun et al., 2007). A formação de tiloses é uma reação inespecífica das plantas e constitui uma barreira física para evitar o avanço do patógeno. Em doenças vasculares, a diferenciação de tilose é considerada um mecanismo de defesa primária, que envolve a oclusão parcial ou total de vasos do xilema por meio da deposição de géis e goma, para limitar o crescimento microbiano (Rioux et al., 1998; Clériveret et al., 2000). Nesta pesquisa notou-se intensa coloração das tiloses que poderiam conter compostos fenólicos e material amorfo. Em plátano, foi observado denso citoplasma nas tiloses, devendo ser ressaltado que essas tiloses eram originárias de células associadas aos vasos e estavam ativamente envolvidas na resposta de defesa da planta (Clériveret et al., 2000).

Além da produção de tiloses nos vasos das plantas resistentes, verificou-se intensa deposição de material amorfo no xilema e em células do parênquima adjacente, densamente corado com azul de toluidina. O acúmulo desses materiais amorfos, possíveis fitoalexinas e terpenoides, também foi observado nos vasos do xilema e nas células do parênquima adjacente de uma cultivar resistente de algodão, restringindo a colonização por *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* (Hall et al., 2011) e em mangueira colonizadas por *C. fimbriata* (Araújo et al., 2014b). A acumulação desses materiais amorfos é uma característica típica de defesa celular em muitas espécies de plantas contra fungos patogênicos (Benhamou; Bélanger, 1998; Bélanger et al., 2003; Rodrigues et al., 2003; Kim et al., 2004; Eynck et al., 2009; Ajila et al., 2010; Hall et al., 2011).

A contribuição das tiloses para a estratégia de defesa contra patógenos vasculares tem sido associada com a produção de materiais de oclusão, como os géis (Beckman, 1987; Kpémoua et al., 1996). Géis e tiloses são bons exemplos de estruturas de oclusão produzidas por plantas

para impedir a colonização por patógenos causadores de murcha (Rioux *et al.*, 1998). O acúmulo de géis nos vasos do xilema é parte do mecanismo de resistência e limita a colonização do fungo, devido à oclusão dos vasos (Baayen & Elgersma, 1985). A formação de gel nos vasos do xilema de plantas infectadas por patógenos vasculares pode surgir a partir do inchaço das membranas de pontuação ou por material segregado a partir das células do parênquima adjacente aos vasos e, também, pela ação de enzimas pectolíticas produzidas por patógenos (Ouellette & Rioux, 1992; Rioux *et al.*, 1998). Neste trabalho, notou-se a presença de géis nos vasos do xilema somente em plantas que foram inoculadas com o patógeno. Em plantas feridas e injetadas com água e tween, não foi verificada acumulação de gel, assim como em plantas de *Carya cordiformis* injetadas somente com água (Park & Juzwik, 2014). Um dos problemas na ocupação de vasos por estruturas fúngicas, bem como pela formação de tiloses e deposição de géis, é a limitação da penetração do líquido de cozimento, apresentando, conseqüentemente, menor rendimento de polpa de celulose e maior consumo de madeira (Mafia *et al.*, 2013).

No clone resistente, aos 32 dias após a inoculação, houve poucos vasos colonizados pelo fungo e as plantas não murcharam ou morreram, ao contrário do clone suscetível. Geralmente uma perturbação localizada do sistema vascular é considerada insignificante na saúde geral da planta (Beckman & Halmos, 1962). Na maioria dos casos, os vasos do xilema perdem sua funcionalidade quando colonizados com propágulos de um patógeno (Park & Juzwik, 2014). Essa disfunção de condução de água foi observada em *bitternut hickory* infectados com *C. smalleyi*, onde a redução do fluxo de seiva foi estreitamente associada à gravidade da doença (Park *et al.*, 2013).

Neste estudo, notou-se a deposição de compostos fenólicos nas células do parênquima adjacente ao xilema, na periderme, nos raios, na medula e ao redor do fungo no caule do clone resistente e suscetível. A deposição de compostos fenólicos em células do parênquima, como barreira contra a colonização de patógenos, já tinha sido descrita em outros patossistemas (Shi *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2014b).

Compostos fenólicos têm sido atribuídos a várias funções biológicas importantes na defesa, como reforço da parede celular, atividade antimicrobiana (Tuncel; Nergiz, 1993), moduladores de hormônios vegetais na sinalização de defesa ou como catalizadores de espécies reativas de oxigênio (Dixon; Paiva, 1995). Os compostos fenólicos criam um ambiente inibitório ou inibem diretamente o crescimento microbiano (Eynck et al., 2009; Park & Juzwik, 2014) e desempenham um papel importante na defesa da planta contra a patógenos ou como fatores de defesa pré-formados ou pós-infecção (Eynck et al., 2009). Os fenóis oxidados podem formar lignina e lacrar infecções no local da penetração (Eynck et al., 2009), como observado no clone resistente. Houve acúmulo de compostos fenólicos tanto em plantas suscetíveis, quanto em resistentes de *oilseed rape* infectadas por *Verticillium longisporum* (Eynck et al., 2009). Quanto mais cedo ocorrer a formação de compostos fenólicos, mais eficaz será a limitação da colonização do patógeno e mais rapidamente haverá a formação de novos polímeros de lignina (Eynck et al., 2009), assim como foi verificado no clone resistente em relação ao clone suscetível empregado neste estudo.

As plantas do clone CLR212 (resistente) inoculadas com *C. fimbriata* apresentaram aumento significativo nos teores de lignina aos 6 dai, quando comparadas com aquelas não inoculadas. Por outro lado, as plantas do clone CLR240 (susceptível) inoculadas não tiveram aumento significativo no teor de lignina total em seus tecidos. A lignina é um importante componente estrutural de tecido vascular e fibras em plantas, desempenhando um papel fundamental no suporte mecânico, na condutância de soluto e na resistência a doenças (Whetten & Sederoff, 1995; Humphreys & Chapple, 2002; Harakava, 2005). A deposição de lignina e de materiais fenólicos ligados à parede constitui uma resposta a danos mecânicos, a ferimentos ou à infecção microbiana (Boudet et al., 1995). Além disso, acredita-se que a deposição de lignina diminui a difusão de enzimas e toxinas liberadas a partir de hifas fúngicas (Vance et al., 1980). A intensa deposição de lignina em plantas resistentes colonizadas, em relação a suscetíveis, também foi relatada em outros estudos (Niemann et al., 1990; Eynck et al., 2009).

As pontuações do xilema permaneceram fechadas no clone resistente e abertas no clone suscetível, o que provavelmente contribuiu para que as hifas do fungo atingissem os tecidos parenquimáticos e outros tecidos subsequentes. Esse fato também foi constatado em outros estudos, em que o fungo ultrapassa as pontuações do xilema e atingem outros tecidos, como células do parênquima axial e radial (Clérivet & El Modafar, 1994; Pérez-Vera et al., 2011; Park & Juzwik, 2014), que são tecidos ricos em nutrientes para o fungo.

Nas secções do caule de plantas suscetíveis, feitas para observar os estádios iniciais da colonização, foi constatada grande produção de conídios de *C. fimbriata*, o que evidencia que esses esporos têm a função de propagação em massa nessas plantas (Duncan & Himelick, 1988). Em plantas resistentes foram observados mais aleuroconídios, possivelmente atuando como estruturas de resistência para o fungo sobreviver nas condições adversas encontradas nesses tecidos. Os aleuroconídios são considerados estruturas de resistência que permitem ao patógeno sobreviver na ausência de um hospedeiro suscetível (Paulin-Mahady et al., 2002). Já internamente aos tecidos, foram constatados poucos conídios nos vasos do clone suscetível e muitos aleuroconídios no xilema em ambos os clones. A maior produção de aleuroconídios nos vasos do xilema provavelmente se deve ao ambiente químico e físico peculiar dos vasos (Ioannou et al., 1977). Ao contrário do encontrado neste trabalho, foram observadas muitas hifas e nenhuma esporulação de *Ceratocystis smalleyi* em *Carya cordiformis* (Park; Juzwik, 2014).

Os resultados do presente estudo mostram que *C. fimbriata* coloniza todos os tecidos do caule de plantas suscetíveis de eucalipto, portanto não pode ser considerado patógeno exclusivamente vascular, assim como observado em mangueira colonizada por *C. fimbriata* (Araújo et al., 2014b).

O escurecimento do lenho é comum em doenças induzidas por *Ceratocystis* spp. (Uzunovic et al., 1999). O escurecimento dos tecidos pode ser atribuído às alterações físicas e químicas formadas pelas células infectadas, pela colonização do patógeno e pela degradação dos tecidos causada pelo fungo. O escurecimento acastanhado dos tecidos do caule,

principalmente na forma de cunha, é considerado um traço forte da presença de *C. fimbriata* nos tecidos do caule de eucalipto, sendo um sintoma importante para diagnose. As lesões em forma de estria podem ser devido à presença do fungo nos raios e ao acúmulo de compostos fenólicos oxidados nessa área, como também verificado na interação *C. smalleyi* em *C. cordiformis* (Park & Juzwik, 2014).

Constatou-se que no clone suscetível o escurecimento do caule é intercalar, ou seja, não é contínuo verticalmente, o que provavelmente se deve ao fato de o material reprodutivo do fungo ter sido translocado dentro do vaso junto com o fluxo de água e parado em um local específico, dando início à nova colonização. É possível que as barreiras nos vasos do xilema não tenham sido suficientemente capazes de evitar que o fungo avançasse além do ponto de inoculação. Alguns autores não verificaram diferenças na extensão da lesão vertical do caule acima e abaixo do ponto de inoculação (Al-Sadi et al., 2010, Park & Juzwik, 2014), provavelmente pelo fato de o escurecimento do lenho não ser contínuo e de os autores terem analisado somente a taxa de escurecimento no ponto de inoculação. Já no clone resistente, a lesão limitou-se ao ponto de inoculação e o patógeno não foi capaz de colonizar os tecidos distantes do local de inoculação, o que também foi observado no clone resistente de cacau inoculado com *C. cacaofunesta* (Santos et al., 2013).

Às 36 hai, foi constatada a formação de oxalato de cálcio nos tecidos dos vasos do xilema do clone resistente inoculado com o fungo. Segundo Datnoff et al. (2007), maiores níveis de Ca no tecido vegetal podem aumentar a resistência a agentes patogênicos vasculares, como verificado no patossistema manga-*C. fimbriata* (Araujo et al., 2014a). Segundo os autores, os tecidos das cultivares resistentes de mangueira continham altos níveis de Ca, que favoreceram a resistência ao sintoma de murcha. A presença de oxalato de cálcio foi observada em todos os tratamentos, na região da periderme, mas em se tratando especificamente dos vasos do xilema a presença desse composto foi encontrada em maior quantidade e nos estádios iniciais de infecção nos tecidos do clone resistente.

A quantidade de amido em plantas suscetíveis e resistentes foi baixa nas primeiras fases da interação com *C. fimbriata*, mas houve aumento ao longo dos 32 dias após a inoculação, sendo maior em regiões colonizadas pelo patógeno no clone resistente. A baixa quantidade de amido no início da interação pode ter sido devido à sua quebra para produção de energia, que foi posteriormente utilizada na formação de mecanismos de defesa, com a tentativa de bloquear o progresso da doença. A capacidade das plantas de resistir a ataques de fungos está associada à quantidade de carboidratos que pode ser utilizada para reações de defesa (Viiri et al., 2001). Os compostos fenólicos são derivados de carboidratos pela via do chiquimato (Matsuki, 1996). Em resposta ao ataque, as células do parênquima do floema produzem grandes quantidades de compostos à base de carboidratos (Gershenzon, 1994), que são consumidos devido à reação da planta (Cook & Hain, 1987). Como a inoculação na haste foi interna, a resistência observada no clone resistente de eucalipto deve ser com base em mecanismos de defesa dentro do sistema vascular e em células adjacentes, como constatado por Baayen e Elgersma (1985). Por se tratar de um patógeno que penetra por ferimentos em plantas de eucalipto (Ferreira et al., 2006), notou-se que em plantas não feridas e não inoculadas houve grande concentração de compostos fenólicos na casca, o que pode ser um dos mecanismos de defesa pré-formada que ajuda a evitar que *C. fimbriata* penetre diretamente na planta.

Não existem trabalhos publicados com informações sobre o processo de infecção de *C. fimbriata* em plantas de eucalipto e como a planta responde à infecção. As observações histológicas permitem concluir que a resistência está ligada à restrição da colonização do fungo, por meio da capacidade genética do clone resistente em limitar a colonização de *C. fimbriata* em seus tecidos, resultado de uma resposta de defesa rápida e intensa. O genótipo suscetível apresentou praticamente as mesmas respostas à infecção que o clone resistente, mas a reação de defesa foi lenta e de menor intensidade, não sendo suficiente para conter o patógeno. Esses resultados fornecem evidências para o envolvimento de uma série de fatores responsáveis pela murcha progressiva, as causas do escurecimento dos

tecidos, do crescimento descontínuo da lesão e da morte de plantas de eucalipto suscetíveis após a infecção. Este estudo foi importante também para conhecer o padrão temporal e espacial da interação entre *C. fimbriata* em plantas de eucalipto, permitindo futuros estudos, como de expressão gênica.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pesquisa de Betancourth, BML; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); à Clonar Resistência a Doenças Florestais, pelo cultivo das plantas e pelas facilidades de inoculação; e à Suzano Papel e Celulose S.A., pelo suporte financeiro. Os autores também são gratos pela assistência prestada pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Viçosa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJILA, C. M., RAO, L. J., & RAO, U. P. Characterization of bioactive compounds from raw and ripe *Mangifera indica* L. peel extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3406-3411, 2010.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**, 2nd ed. Viçosa, Minas Gerais, Brazil: Editora UFV, 500p, 2009.
- AL-SADI, A. M. et al. Histological changes in mango seedlings following infection with *Ceratocystis manginecans*, the cause of mango decline. **Journal of Phytopathology**, v. 158, n. 11-12, p. 738-743, 2010.
- ARAUJO, L. et al. Resistance in mango against infection by *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, v. 104, n. 8, p. 820-833, 2014a.
- ARAUJO, L. et al. Histopathological aspects of mango resistance to the infection process of *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1282-1295, 2014b.
- BAAYEN, R.P.; ELGERSMA, D.M. Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnation cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 3, p. 119-135, 1985.
- BECKMAN, C.H. **The nature of wilt diseases of plants**. APS press, 1987.
- BECKMAN, C.H.; HALMOS, S. Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root-invading fungi. **Phytopathology**, v. 52, n. 9, p. 893-&, 1962.
- BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; MENZIES, J. G. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). **Phytopathology**, v. 93, n. 4, p. 402-412, 2003.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Tomato. **Plant Physiology**, v. 118, n. 4, p. 1203-1212, 1998.
- BENHAMOU, N. Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with *Verticillium*-infected xylem vessels. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 46, n. 4, p. 321-338, 1995.
- BIGGS, A. R. Anatomical and physiological responses of bark tissues to mechanical injury. In: **Defense mechanisms of woody plants against fungi**. Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 13-40.
- BOUDET, A. M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI, J. Biochemistry and molecular biology of lignification. **New Phytologist**, v. 129, n. 2, p. 203-236, 1995.
- CHEN, P.; LEE, B.; ROBB, J. Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 64, n. 6, p. 283-291, 2004.
- CLÉRIVET, A. et al. Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus× acerifolia*) to

- the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **Trees**, v. 15, n. 1, p. 25-31, 2000.
- CLÉRIVET, A.; MODAFAR, C. Vascular modifications in *Platanus acerifolia* seedlings inoculated with *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **European journal of forest pathology**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 1994.
- COOK, S. P.; HAIN, F. P. Four parameters of the wound response of loblolly and shortleaf pines to inoculation with the blue-staining fungus associated with the southern pine beetle. **Canadian journal of botany**, v. 65, n. 11, p. 2403-2409, 1987.
- DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. **Mineral nutrition and plant disease**. APS Press, St. Paul, 278p. 2007.
- DIXON G. R.; PEGG G. F. Hyphal lysis and tylose formation in tomato cultivars infected by *V. albo-atrum*. **Transactions of the British Mycological Society**. V. 53, p: 109-118, 1969.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1085, 1995.
- DUCHESNE, L. C.; HUBBES, M.; JENG, R. S. Biochemistry and molecular biology of defense reactions in the xylem of angiosperm trees. In: **Defense mechanisms of woody plants against fungi**. Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 133-146.
- DUNCAN, D. R.; HIMELICK, E. B. Conidial production of *Verticillium dahliae* as influenced by a negative pressure potential. **Canadian journal of botany**, v. 66, n. 1, p. 67-71, 1988.
- EYNCK, C. et al. Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. **Phytopathology**, v. 99, n. 7, p. 802-811, 2009.
- FERREIRA, F. A. et al. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista árvore**, v. 30, n. 2, p. 155-162, 2006.
- FERNANDES, B. V. et al. Damage and loss due to *Ceratocystis fimbriata* in *Eucalyptus* wood for charcoal production. **BioResources**, p. 5473-5479, 2014.
- GERSHENZON, J. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1281-1328, 1994.
- GUIMARÃES, L. M. S. et al. *Eucalyptus pellita* as a source of resistance to rust, *ceratocystis wilt* and leaf blight. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 124-131, 2010.
- HALL, C.; HEATH, R.; GUEST, D. I. Rapid and intense accumulation of terpenoid phytoalexins in infected xylem tissues of cotton (*Gossypium hirsutum*) resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 76, n. 3, p. 182-188, 2011.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1773, 1996.
- HARAKAVA, R. Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 601-607, 2005.
- HUMPHREYS, J. M., & CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 224-229, 2002.

- IOANNOU, N.; SCHENEIDER, R.W.; GROGAN, R.G. Effect of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth, sporulation and production of microsclerotia by *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, v. 67, p: 645-65, 1977.
- JOHANSEN, D. A. et al. Plant microtechnique. **Plant microtechnique**, 1940.
- KIM, K. H. et al. Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. **Phytopathology**, v. 94, n. 12, p. 1295-1304, 2004.
- KPÉMOUA, K. et al. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 1131-1143, 1996.
- KURODA, K. Mechanism of cavitation development in the pine wilt disease. **European Journal of Forest Pathology**, v. 21, n. 2, p. 82-89, 1991.
- MAFIA, R. G. et al. Impact of Ceratocystis wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. **Forest Pathology**, v. 43, n. 5, p. 379-385, 2013.
- MATSUKI, M. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. **Australian Journal of Botany**, v. 44, n. 6, p. 613-634, 1996.
- MERRILL, W. Mechanisms of resistance to fungi in woody plants: a historical perspective. In: **Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi**. Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 1-12.
- NIEMANN, G. J.; BAAYEN, R. P.; BOON, J. J. Localization of phytoalexin accumulation and determination of changes in lignin and carbohydrate composition in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) xylem as a consequence of infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, by pyrolysis-mass spectrometry. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 3, p. 133-153, 1990.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. The study of plant structure: principles and selected methods. **Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltd**, 1981.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, L. S. S. et al. Aggressiveness, cultural characteristics and genetic variation of *Ceratocystis fimbriata* on *Eucalyptus* spp. **Forest Pathology**, v. 45, n. 6, p. 505-514, 2015.
- OUELLETTE, G. B.; RIOUX, D. Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch elm disease. In: **Defense mechanisms of woody plants against fungi**. Springer Berlin Heidelberg, p. 257-307, 1992.
- PARK, J. H.; JUZWIK, J.; CAVENDER-BARES, J. Multiple *Ceratocystis smalleyi* infections associated with reduced stem water transport in bitternut hickory. **Phytopathology**, v. 103, n. 6, p. 565-574, 2013.
- PARK, J.H.; JUZWIK, J. *Ceratocystis smalleyi* colonization of bitternut hickory and host responses in the xylem. **Forest Pathology**, v. 44, n. 4, p. 282-292, 2014.
- PAULIN-MAHADY, A. E.; HARRINGTON, T. C.; MCNEW, D. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 62-72, 2002.

- PÉREZ-VERA, O. A. et al. Histopatología del pino de las alturas (*Pinus hartwegii* Lindl.) inoculado con tres hongos ophiostomatoides. **Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente**, v. 17, n. 1, p. 91-102, 2011.
- RIOUX, D. et al. Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees. **Phytopathology**, v. 88, n. 6, p. 494-505, 1998.
- RODRIGUES, F. Á. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, v. 93, n. 5, p. 535-546, 2003.
- ROSADO, C. C. G. et al. Resistance to ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in parents and progênies of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Silvae Genetica**, v. 59, p. 99-106, 2010.
- SANTOS, R. M. F. et al. Kinetics and histopathology of the Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* interaction. **Tropical plant biology**, v. 6, n. 1, p. 37-45, 2013.
- SHI, J., MUELLER, W. C.; BECKMAN, C. H. Vessel occlusion and secretory activities of vessel contact cells in resistant or susceptible cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 40, n. 2, p. 133-147, 1992.
- SINHA, A. K.; WOOD, R. K. S. Studies on the nature of resistance in tomato plants to *Verticillium albo-atrum*. **Annals of Applied Biology**, v. 62, n. 2, p. 319-327, 1968.
- SUN, Q. et al. Ethylene and not embolism is required for wound-induced tylose development in stems of grapevines. **Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 1629-1636, 2007.
- TUNCEL, G.; NERGIZ, C. Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. **Letters in applied microbiology**, v. 17, n. 6, p. 300-302, 1993.
- UZUNOVIC, A. et al. Fungi that cause sapstain in Canadian softwoods. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 914-922, 1999.
- VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 18, n. 1, p. 259-288, 1980.
- VIIRI, H. et al. Soluble carbohydrates, radial growth and vigour of fertilized Norway spruce after inoculation with blue-stain fungus, *Ceratocystis polonica*. **Trees**, v. 15, n. 6, p. 327-334, 2001.
- WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1001, 1995.

## **CAPÍTULO 2**

**Genes diferencialmente expressos durante a interação *Ceratocystis fimbriata* – *Eucalyptus***

**Genes diferencialmente expressos durante a interação  
*Ceratocystis fimbriata* - *Eucalyptus***

**Blanca Mercedes Leguizamo Betancourth<sup>1</sup>, Luciane Souto Mofato<sup>2</sup>,  
Marcelo Falsarella Carazzolle<sup>2</sup>, Lúcio Mauro da Silva Guimarães<sup>3</sup>, Edival  
Ângelo Valverde Zauza<sup>4</sup>, Shinitiro Oda<sup>4</sup>, Poliane Alfenas Zerbini<sup>5</sup>,  
Gonçalo Amarante Guimarães Pereira & Acelino Couto Alfenas<sup>3\*</sup>.**

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Genômica, Expressão e Bioagentes (LGE). Instituto de Biologia, Departamento de Genética e Evolução. Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Patologia Florestal/Marcadores moleculares (BIOAGRO). Departamento de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-900, Viçosa, MG, Brasil

<sup>4</sup>Suzano Papel e Celulose S.A., Teixeira de Freitas, BA, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Microbiologia Industrial (BIOAGRO). Departamento de Microbiologia. Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

\*Correspondência: e-mail: aalfenas@ufv.br

## **RESUMO**

A murcha-de-Ceratocystis, causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata*, é uma das doenças mais importantes na cultura do eucalipto. O uso da resistência genética é a única forma de controle dessa doença, no entanto pouco se conhece acerca das bases moleculares dos mecanismos de defesa das plantas resistentes a esse patógeno. Neste trabalho foi quantificado e indentificado o transcriptoma de plantas resistentes e suscetíveis de

*Eucalyptus* spp. infectadas com *C. fimbriata*. Para obter o máximo de variabilidade de transcritos foram utilizados *pools* de oito plantas resistentes *versus* oito suscetíveis ao fungo, derivadas de duas progênies de *Eucalyptus* spp. Foram realizadas pequenas incisões no coleto das plantas que compõem os *pools* e depositada uma suspensão de inóculo ou água como controle. Realizaram-se coletas do tecido vegetal no ponto de inoculação às 12, 18 e 24 horas após inoculação (hai). O RNA de cada um dos *pools* foi extraído e sequenciado por meio de RNASeq. Foram mapeados 39.427 transcritos contra as sequências codificantes de *E. grandis* ("Egrandis\_201\_v1.1.cds.fa" com 46.315 sequências). A análise do transcriptoma da interação identificou genes relacionados com a defesa a estresse biótico e abiótico nas plantas de *Eucalyptus* spp. em resposta à infecção de *C. fimbriata*. Foram identificados genes codificadores de receptores de membrana, genes relacionados com a sinalização dependente de cálcio e hormônios, fatores de transcrição, genes de proteínas de parede celular, genes envolvidos no sistema redox e na resposta sistêmica adquirida e outros genes de defesa importantes como PRs e WRKY. Esta pesquisa permitiu a identificação de genes relacionados com a defesa nessas plantas e forneceu uma ampla visão sobre a resposta de defesa à murcha-de-Ceratocystis.

**Palavras-chaves:** *Eucalyptus grandis*, *Ceratocystis fimbriata*, murcha-de-Ceratocystis, Transcriptoma, RNASeq, expressão gênica diferencial, genes de defesa.

## **ABSTRACT**

Ceratocystis wilt caused by *Ceratocystis fimbriata*, is one of the most important diseases in the *Eucalyptus* culture. This disease causes great losses in the forestry sector and little is known about the molecular basis of *Eucalyptus* defense mechanism against this pathogen. In this study, the transcriptome of resistant and susceptible plants of *Eucalyptus* spp. infected or not with *C. fimbriata* at 12, 18 and 24 hours after inoculation (hai) were

quantified using RNA-Seq. 39427 transcripts were mapped against the coding sequences of *E. grandis* ("Egrandis\_201\_v1.1.cds.fa" with 46,315 sequences). The transcriptome analysis of the interaction revealed that genes related to defense against to biotic and abiotic stress were differentially expressed in *Eucalyptus* spp plants in response to the *C. fimbriata* infection. The transcriptome analysis identified genes coding for membrane receptors genes, genes related to signal-dependent calcium and hormones, transcription factors (TFs), cell wall protein genes, genes involved in the Redox system and the systemic acquired response (SAR) and other important defense genes as PRs and WRKY which have been reported to be induced in plant defense response against pathogens. This research allowed the identification of genes related to the defense in *Eucalyptus* and give notions of the defense response to Ceratocystis wilt. This is the first report of a transcriptomic analysis of *Eucalyptus* in response to *C. fimbriata*.

## INTRODUÇÃO

Por seu rápido crescimento, suas propriedades superiores de madeira e sua notável adaptabilidade, o uso de espécies de *Eucalyptus* em plantações florestais tem aumentado rapidamente em mais de 100 países, nos seis continentes, tornando-as as mais amplamente plantadas no mundo (Myburg et al., 2014). Por outro lado, dentre os desafios para a manutenção e expansão da cultura destacam-se o aumento da produtividade, a adaptação da planta a novas áreas sob condições de estresse e o controle de doenças e pragas (Abad et al., 2013). Dentre as doenças que ocorrem na eucaliptocultura, merece destaque a murcha-de-Ceratocystis, causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, considerada uma das principais enfermidades da cultura (Rodas et al., 2008; Alfenas et al., 2009; Ferreira et al., 1999, 2010, 2013; Harrington et al., 2011, 2013; ABRAF, 2012). A doença foi relatada pela primeira vez na década de 1990, na República do Congo (Roux et al., 2000) e no Brasil (Ferreira et al., 1999). Posteriormente

foi relatada em Uganda (Roux et al., 2001), no Uruguai (Barnes et al., 2003a) e na África do Sul (Roux et al., 2004).

A murcha-de-Ceratocystis ocasiona grandes perdas em crescimento volumétrico e qualidade da madeira, resultando em elevados prejuízos econômicos, que podem ser tanto quantitativos, ou seja, devido à morte de plantas no campo, quanto qualitativos, devido à diminuição da qualidade da madeira para indústria (Zauza et al., 2004; Rosado et al., 2010; Mafia et al., 2013; Fernandes et al., 2014). As infecções causadas por esse patógeno normalmente começam nas raízes ou na base da árvore e move-se para a haste, causando uma coloração escura do tecido lenhoso do xilema, principalmente num padrão radial em corte transversal, seguindo o parênquima do raio e matando uma porção de câmbio vascular, floema e feloderme (Ferreira et al., 2006). A penetração de *C. fimbriata* também ocorre a partir de ferimentos frescos no sistema radicular ou no tronco (Ferreira et al., 2006). A colonização dos tecidos do caule de plantas de *Eucalyptus* por parte do patógeno é muito rápida, sendo constatada pela presença de hifas fúngicas e pela germinação de conídios 12 horas após a inoculação do fungo (Capítulo 1). Nas plantas afetadas, o patógeno pode causar murchamento e secamento de ramos laterais ou no topo das árvores, escurecimento da madeira e morte das plantas (Ferreira et al., 2006; Alfenas & Ferreira, 2008; Roux & Wingfield, 2009; Alfenas et al., 2009; Ferreira et al., 2013; Harrington, 2013).

A existência em *Eucalyptus* spp. de ampla variabilidade inter e intraespecífica para a resistência à murcha-de-Ceratocystis tornou a seleção de genótipos (clones) resistentes a estratégia de controle da doença mais utilizada (Zauza et al., 2004; Rosado et al., 2010; Fonseca et al., 2010). Entretanto, devido à alta variabilidade genética existente na população do fungo, essa resistência tem sido, em diversos casos, considerada isolado-específica (Ferreira et al., 2010; Oliveira et al., 2015). Além disso, não existem pesquisas relacionadas à elucidação dos mecanismos moleculares que levam à resistência nessas plantas. A incorporação de ferramentas para a análise do transcriptoma como tecnologias de sequenciamento como o RNASeq (sequenciamento de RNA) nos programas de melhoramento

florestal pode abrir novas perspectivas para a compreensão das relações patógeno-hospedeiro e dos mecanismos de resistência à murcha-de-*Ceratocystis*, encontradas em clones de *Eucalyptus* (Grattapaglia & Kirst, 2008; Chen et al., 2015; Meyer et al., 2016).

Em geral, as plantas utilizam uma série de mecanismos de defesa para se protegerem contra o ataque de patógenos por meio de uma percepção complexa, transdução e troca de sinais (Verhage et al., 2010; Xu et al., 2011). Como passo inicial na resposta ao estímulo produzido pelos patógenos, as plantas detectam os sinais de forma oportuna e, em seguida, a transdução do sinal é conduzida por uma via de sinalização de fitohormônio e outros sistemas de sinalização. Após a percepção e a transdução do sinal, a ativação ou repressão da transcrição subsequente de fatores de transcrição eventualmente levam à indução da transdução de sinal a jusante e à consequente expressão de genes relacionados com a defesa das plantas (Yang et al., 1997; Xu et al., 2011). Para melhor compreender a comunicação célula a célula nas associações patógeno-hospedeiro, é requerida a identificação dos componentes genéticos envolvidos nesse processo. O inventário de genes com expressão diferencial, de mRNA (transcriptoma), de polipeptídeos (proteoma) ou de metabólitos (metaboloma) nos tecidos pode representar pontos de partida para análises mais aprofundadas das funções dessas possíveis moléculas de sinalização, genes ou proteínas reguladas durante os mecanismos de resposta desencadeados nos hospedeiros (Lévesque et al., 2010; Xu et al., 2011).

O conhecimento gerado pelo RNA-seq tem contribuído de forma significativa nos programas de melhoramento, não só por permitir o melhor entendimento da interação molecular dos patossistemas, mas também por ajudar na identificação de marcadores moleculares nos genomas das plantas, facilitando a clonagem de genes R (Sedano & Carrascal, 2012; Xu et al., 2011, 2012; Downen et al., 2012; Martinelli et al., 2012; Savory et al., 2012; Tremblay et al., 2012). Associado ao sequenciamento genômico completo de espécies de eucalipto, o RNA-seq é um recurso valioso para estudos do transcriptoma com o intuito de entender as respostas de defesa

em espécies de *Eucalyptus* (Myburg et al., 2014). Transcriptomas por RNASeq da interação de espécies de *Eucalyptus* spp. com patógenos como *Phytophthora cinnamomi* e *Calonectria pseudoreteauidii* têm sido recentemente estudados (Chen et al., 2015; Meyer et al., 2016). Entretanto, até o momento não foi publicada nenhuma pesquisa sobre o transcriptoma da interação entre *C. fimbriata*-*Eucalyptus* spp.

Nesta pesquisa visou-se ao estudo do transcriptoma da interação *C. fimbriata*- *Eucalyptus* spp. por meio da técnica RNASeq, levando à identificação de genes diferencialmente expressos relacionados com a defesa de plantas de eucalipto à murcha-de-Ceratocystis. O sequenciamento do transcriptoma dessa interação não só revelou um conjunto de genes importantes para a defesa contra o patógeno, mas levou ao entendimento da resposta de defesa em nível molecular, o que possivelmente ajudará atingir uma resistência de amplo espectro no futuro. Esses genes auxiliarão na melhor compreensão dos mecanismos de defesa e serão potenciais candidatos para o melhoramento genético, visando à resistência à murcha-de-Ceratocystis por meio de engenharia genética.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e isolado fúngico – Seleção das plantas R e S à murcha-de-Ceratocystis**

Para compreender o processo da resistência de forma mais global, foram utilizadas plantas resistentes e suscetíveis à murcha-de-Ceratocystis selecionadas a partir de duas progênies distintas. Uma das progênies foi oriunda do cruzamento entre dois clones de *E. grandis* (G26xG27), originários de Coff's Harbour, Australia (Shinitiro Oda, comunicação pessoal), e a outra proveniente da autofecundação de um híbrido interespecífico (HGU1172 - *E. grandis* x *E. urophylla*), procedente de Teixeira de Freitas, BA-Brasil (Ferreira & Souza, 1997). A progênie "G26xG27" foi formada por 43 plantas, enquanto a progênie "HGU1172xHGU1172" foi formada por 45 plantas. Antes da inoculação, cada

planta de ambas as progênies foi multiplicada vegetativamente, de modo a obter réplicas clonais de cada indivíduo. Os clones CLR153 (*E. grandis* x *E. urophylla*) e CLR240 (*E. grandis* x *E. urophylla*) foram incluídos nas avaliações de cada uma das progênies, caracterizados anteriormente como resistente e suscetível à murcha-de-Ceratocystis, respectivamente (Acelino C. Alfenas, informação pessoal). As réplicas clonais foram transplantadas para sacolas de 2L, contendo substrato Caroline suplementado com 6 kg m<sup>-3</sup> de superfosfato e 3 kg m<sup>-3</sup> de Osmocote® (19-6-12). As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação e inoculadas 30 dias após o transplante.

Nas inoculações empregou-se a cultura SBS1 de *C. fimbriata* da Micoteca do Laboratório de Patologia Florestal (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. O isolado foi previamente identificado pelas suas características morfológicas e moleculares e pela sua variabilidade genética, além de ter sido utilizado previamente em trabalhos de seleção de clones de eucalipto resistentes à doença (Rosado et al., 2010; Guimarães et al., 2010; Oliveira et al., 2015). Para produção do inóculo, o fungo foi cultivado em placas de Petri (9 cm) contendo ágar extrato de malte e levedura (MYEA; 2% extrato de malte, 0,2% extrato de levedura e 2% ágar), em câmara de crescimento a 28°C, durante dez dias. Após esse período, adicionou-se às placas água destilada esteril contendo Tween 20 a 1%, e em seguida a superfície da colônia foi raspada com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. A suspensão obtida foi filtrada em uma gaze, e com o auxílio de uma câmara de Neubauer foi realizada a contagem, sendo a concentração de esporos ajustada para 2,5 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>.

Para a inoculação, foi feito um corte no caule das plantas com um estilete estéril, 5 cm acima do coleto (Figura 1a), onde foram depositados 500 µL da suspensão de esporos (Figura 1b). Posteriormente, o ferimento foi coberto com filme de PVC (Figura 1c). O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com cinco réplicas clonais por indivíduo, totalizando 135 plantas avaliadas da progênie “G26xG27” e 145 plantas da progênie “HGU1172xHGU1172”. Aos 60 dias após as inoculações, foi medido o comprimento da descoloração do lenho, cortando

as hastes longitudinalmente. As plantas que se agruparam, pelo teste Scott e Knott ( $p \leq 0,5$ ), com o comparador resistente CLR153, ou que apresentaram comprimento médio da lesão menor que esse comparador, foram classificadas como resistentes, enquanto aquelas que se agruparam com o comparador suscetível CLR240, ou que apresentaram comprimento médio da lesão maior que esse comparador, foram classificadas como suscetíveis. A partir dos resultados obtidos da inoculação das progênies, foram selecionados quatro indivíduos resistentes e quatro indivíduos suscetíveis à murcha-de-*Ceratocystis* de cada uma das progênies, para os ensaios do transcriptoma.



**Figura 1** - Estabelecimento da associação patogênica entre *Ceratocystis fimbriata* e *Eucalyptus* spp. Corte no caule das plantas com o auxílio de um estilete (a); deposição da suspensão de esporos (b); e fermento coberto com filme de PVC (c).

### **Material vegetal e isolado fúngico para análises do transcriptoma por RNASeq**

Para identificar o maior número de genes diferencialmente expressos em *Eucalyptus* e não somente identificar transcritos correspondentes a um único indivíduo ou clone em particular, após a seleção das quatro plantas resistentes e suscetíveis à doença de cada uma das duas progênies foram formados dois *pools*, com oito plantas/*pool*. Estabelecidos os *pools*, foram

delineados os quatro tratamentos: T1: *pool* formado pelas plantas resistentes e inoculadas com o fungo *C. fimbriata*; T2: *pool* formado pelas plantas resistentes e não inoculadas com o fungo; T3: *pool* formado pelas plantas suscetíveis e inoculadas; e T4: *pool* formado pelas plantas suscetíveis e não inoculadas. O delineamento foi inteiramente casualizado, e cada tratamento foi formado por seis réplicas clonais das plantas selecionadas na primeira etapa, totalizando 48 plantas por tratamento.

O isolado, a preparação do inóculo e a inoculação foram realizados como descrito no item anterior, à exceção dos tratamentos T2 e T4, que não receberam inóculo, e sim água destilada. Após a inoculação, coletou-se o tecido do caule das plantas no ponto de inoculação com a ajuda de um bisturi estéril, em três tempos diferentes: 12, 18 e 24 horas após as inoculações (hai), predefinidos de acordo com os resultados descritos no Capítulo 1. Após as coletas, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C, para posteriores extrações de RNA total. O experimento foi realizado duas vezes nas mesmas condições, para obtenção de uma réplica biológica, de modo a efetuar as análises estatísticas requeridas da expressão gênica no RNA-Seq e obter um número significativo de genes diferencialmente expressos.

## **Expressão diferencial de genes**

### **Extração de RNA total e sequenciamento do transcriptoma (RNASeq)**

As amostras de tecido de caule foram maceradas em nitrogênio líquido, e 0,1 a 5 g do macerado foram transferidos para microtubos (2 mL), que foram armazenados em ultrafreezer a -80°C. Para obtenção de RNA total foi utilizado o reagente *Concert™ Plant RNA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo a metodologia sugerida pelo fabricante, com modificações. Ao microtubo contendo o macerado foram adicionados 500 µL do reagente *Concert™ Plant RNA* frio por 1 g do tecido. Após homogeneizar em vórtex, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, por 5 minutos (dispostos horizontalmente). O lisado foi transferido para um tubo QIAshredder (QIAGEN, Texas, USA) e centrifugado a 12.000 xg a 4°C, por

2 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos (2 mL), onde foram adicionados 100  $\mu$ L de NaCl 5M, misturando por pipetagem e inversão, por 2 minutos. Em seguida, adicionaram-se 300  $\mu$ L de clorofórmio frio, misturando novamente por pipetagem e inversão. As amostras foram centrifugadas a 12.000 xg a 4°C, por 10 minutos, e a fase aquosa foi transferida para novo microtubo (2 mL), ao qual foi adicionado um volume igual de álcool isopropílico frio, misturando por pipetagem e inversão. As amostras foram mantidas em geladeira por 30 minutos e, então, centrifugadas a 12.000 xg a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 1.000  $\mu$ L de etanol 75% frio. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg à temperatura ambiente, por 1 minuto. O líquido foi descartado e os tubos deixados abertos em estufa a 37°C, por 10 minutos, para secagem. Após a secagem, o *pellet* foi ressuscitado em 30  $\mu$ L de água livre de RNases.

Após a extração do RNA, foi realizada a purificação das amostras de RNA total com o *Rneasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Texas, USA), seguindo a metodologia sugerida pelo fabricante, com adaptações. Ao RNA extraído e ressuscitado adicionaram-se 350  $\mu$ L de tampão RLC, misturando por pipetagem e inversão. Posteriormente, acrescentaram-se 250  $\mu$ L de etanol absoluto (100%), misturando por pipetagem e inversão. A amostra foi então transferida para uma coluna *spin Mini Rneasy*, colocada em um tubo de coleta de 2 mL e centrifugada por 30 segundos, a 8.000 xg. O filtrado foi descartado, e em seguida foram adicionados 500  $\mu$ L do *buffer* RPE à coluna de *spin RNeasy*. O tubo foi novamente centrifugado por 30 segundos, a 8.000 xg, e o filtrado foi descartado. Então, 500  $\mu$ L do *buffer* RPE foram adicionados na coluna de *spin RNeasy* e os tubos foram centrifugados durante 2 minutos, a 8.000 xg. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 2 mL e novamente centrifugada a 12.000 xg, por 1 minuto. A coluna *spin Rneasy* foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 50  $\mu$ L de água livre de RNases diretamente à membrana na coluna e centrifugou-se durante 1 minuto, a 8.000 xg. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase (*RQ1 RNase-Free DNase* Promega®) e posteriormente foram enviadas ao Laboratório Central de Tecnologias de

Alto Desempenho em Ciências da Vida-*LaCTAD* da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, onde foram quantificadas em fluorômetro Qubit 2.0 (*Life*, Carlsbad, CA, USA) e a integridade do RNA verificada por meio do Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA).

A construção das bibliotecas de cDNA e a quantificação do transcriptoma foram realizadas empregando-se o sequenciamento de próxima geração NGS (*next-generation sequencing*), por meio da plataforma Illumina. Para construção das bibliotecas de cDNA foi utilizado o *TruSeq RNA Sample prep kit V2* (RS-122-2001, Illumina Inc., San Diego, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram geradas 24 bibliotecas, correspondentes aos quatro tratamentos (T1, T2, T3 e T4), por três tempos (12, 18 e 24 hai), e duas réplicas biológicas. A qualidade e a concentração de cada biblioteca de cDNA foram verificadas no *Bioanalyzer Chip DNA 1000 series II* (Agilent), amplificadas com o sistema *cBot Automated Cluster Generation* (Illumina, San Diego, CA, USA), multiplexadas e sequenciadas numa corrida *paired-end 2 x 100 pb* em uma única *lane (flowcell)*, com o sistema de sequenciamento HiSeq™2500 (Illumina, San Diego, CA, USA), no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida-*LaCTAD* da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

### **Mapeamento, montagem do transcriptoma e análises da expressão gênica diferencial**

A avaliação da qualidade das sequências (*reads*) geradas no sequenciamento foi feita com o uso da ferramenta *FastQC*, versão 0.10.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Em seguida, foram eliminadas as sequências de baixa qualidade, contendo bases não nomeadas (Ns), por meio do *script clean\_solexa.pl*. A ferramenta *TopHat* (Trapnell et al., 2012; [<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>]) foi utilizada para o alinhamento dos transcritos, usando como referência as sequências codificantes do *E. grandis* (arquivo "Egrandis\_201\_v1.1.cds.fa" com 46.315 sequências), disponíveis na base de dados do Phytozome (versão 10.3, [[http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org\\_Egrandis\\_er](http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Egrandis_er)];

Myburg et al., 2014; Bartholomé et al., 2015). Como referência para o mapeamento e a filtragem dos *reads* do fungo foi utilizada uma versão prévia do genoma de *C. cacaofunesta*, espécie muito próxima de *C. fimbriata* e com genoma disponível (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/cerato/>); em processo de publicação).

A montagem das leituras mapeadas e o cálculo da expressão dos genes de *E. grandis* preditos por quilobase de exons por milhões de fragmentos mapeados (*fragments per kilobase of transcript per million fragments-FPKM*) foi feita utilizando-se o pacote *Cufflinks* e seus programas complementares *Cuffcompare* e *Cuffmerge* (Trapnell et al., 2012; [<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>]; [<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffmerge/>]). Para realizar a quantificação e as análises dos níveis de expressão, foi utilizado o pacote *RSEM* (Li & Dewey, 2011; [<http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem/>]). Para normalização dos dados e identificação dos genes diferencialmente expressos, os dados *read\_counts* gerados pelo *RSEM* foram rodados com os pacotes *DESeq* e *EdGER*, implementados no *Bioconductor* (Gentleman et al., 2004; Robinson et al., 2010), utilizando o programa computacional R (*R Development Core Team*, 2012). No RNA-Seq, os dados são normalizados ao levar em consideração o número de *reads* gerados por biblioteca e o tamanho da referência (Robinson & Oshlack, 2010). A fonte mais óbvia de variação entre as amostras é o tamanho da biblioteca (cobertura do sequenciamento) (Dillies et al., 2013). Portanto, a forma mais simples de normalização entre amostras é dada pelo dimensionamento do número de *reads* por um fator específico que representa o tamanho da biblioteca. Um dos métodos para calcular esses fatores de escala é realizado com o pacote *DeSeq*. Nesse método o fator de escala para uma determinada amostra é dado pela mediana dos valores de contagem de cada transcrito, dividida pela média geométrica das contagens de todas as amostras. Essa metodologia é baseada na suposição de que a maioria dos transcritos não são diferencialmente expressos.

Após a normalização dos dados e as análises da expressão diferencial, foram identificados os genes em comum dos resultados gerados por ambos os pacotes e feita uma lista final de genes diferencialmente

expressos. Com esses pacotes foi possível avaliar a expressão diferencial de genes com base na distribuição binomial negativa e fazer comparações entre *pools*, tratamentos e tempos (Robinson et al., 2010; Love et al., 2014; [<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>]).

Os valores de expressão entre *pools* (*pool* inoculado x *pool* não inoculado) foram comparados, tendo sido considerados genes diferencialmente expressos aqueles com variação de expressão superior a 2 (*fold-change*) entre amostras, com significância estatística (*p-value*) menor que 0,05%. Foram feitas análises de componentes principais (*Principal Components Analysis*, PCA), utilizando-se o pacote DESeq (Anders & Huber, 2010), no *software* R, para conhecer a variabilidade entre amostras.

Análises de *clustering* (*heatmap*) em cima dos  $\log_2(\text{fold change})$  dos genes diferencialmente expressos foram realizadas para conhecer a variabilidade entre amostras, utilizando-se o programa EXPANDER 7 – *Gene Expression Analysis & Visualization* (Ulitsky et al., 2010). Para cada um dos quatro tratamentos foi gerada uma lista de transcritos diferencialmente expressos entre amostras do *pool* de plantas inoculadas, em relação ao seu respectivo *pool* não inoculado, e em cada um dos três tempos coletados (12, 18 e 24 hai). Os grupos de transcritos foram então comparados e ilustrados em diagramas de Venn, com o uso de uma ferramenta web (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) que permite visualizar a quantidade de transcritos exclusivos por *pool* e/ou tempos, transcritos comuns entre *pools* e/ou tempos, ou transcritos compartilhados entre todos.

### **Anotação funcional de genes**

Os genes diferencialmente expressos foram classificados em induzidos (*up-regulated*) ou reprimidos (*down-regulated*) e agrupados por ontologia gênica, para fornecer um panorama geral da reprogramação do transcrito em resposta à infecção por *C. fimbriata*. Assim, a anotação e a categorização dos transcritos foram feitas com a ferramenta *Gene Ontology* (*The Gene Ontology Consortium* 2000, 2001, 2004, 2006, 2007,

[<http://www.geneontology.org/>] e o *software* Blast2Go (Conesa et al., 2005, 2008).

O sistema de ontologias utilizado pelo BLAST2GO é o *Gene Ontology*, uma tentativa de padronizar a representação dos genes e seus produtos para todos os sistemas biológicos, subdividindo-os em três categorias: *i*) processo biológico: refere-se à atividade biológica com o qual o gene ou seu produto contribui; *ii*) função molecular: atividade bioquímica do gene ou produto; e *iii*) componente celular: local na célula onde o gene ou seu produto é ativo (Noda et al., 2010).

## RESULTADOS

### **Seleção das plantas resistentes e suscetíveis à murcha-de-Ceratocystis para formação dos *pools***

Após 60 dias após a inoculação de *C. fimbriata*, as plantas do clone CLR153, utilizadas como comparador resistente à murcha-de-Ceratocystis, estavam saudáveis, sem apresentar algum dos sintomas típicos da doença. As plantas do clone CLR240, utilizadas como comparador suscetível à murcha-de-Ceratocystis, apresentaram sintomas típicos da doença, como murcha, escurecimento do caule, coloração escura do tecido lenhoso do xilema e morte de algumas plantas (Figura 2). Com esses resultados foi confirmado o êxito das inoculações feitas nos experimentos.

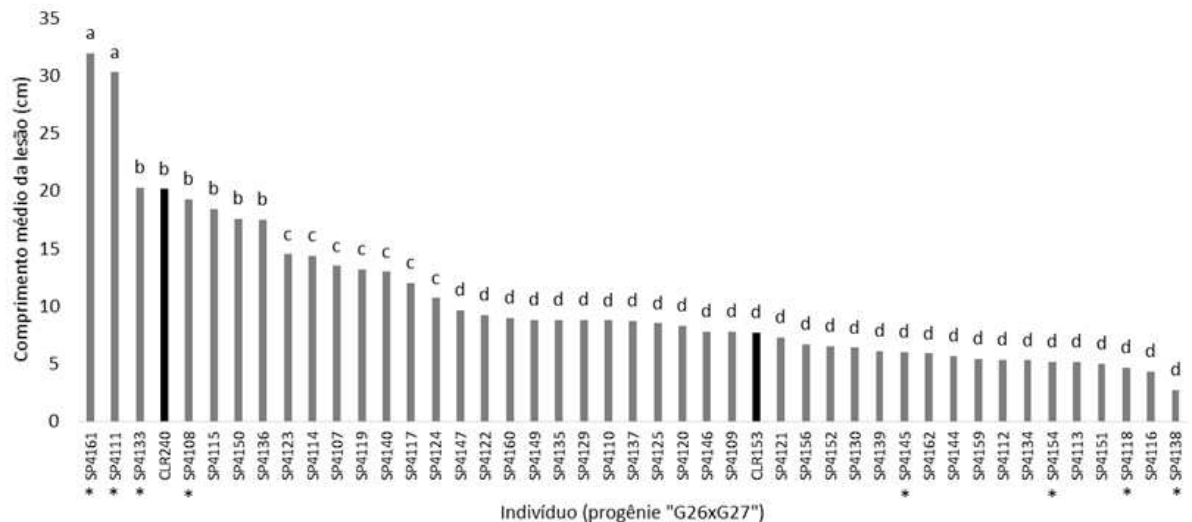
As progênies segregaram para a resistência à murcha-de-Ceratocystis, apresentando indivíduos resistentes (R) e suscetíveis (S) à doença, conseqüentemente possibilitando a seleção de plantas contrastantes quanto ao fenótipo da resistência para o ensaio do transcriptoma. Na progênie "G26xG27", cinco clones com comprimento médio da lesão entre 17,5 e 20,3 cm agruparam-se junto ao comparador suscetível CLR240, portanto foram classificados como suscetíveis à murcha-de-Ceratocystis (Figura 3a). Além desses, outros dois clones com comprimento da lesão maior do que o do comparador suscetível (lesão acima de 30 cm) foram também suscetíveis. Sete clones formaram um grupo à parte e foram classificados como medianamente suscetíveis, com comprimento médio da lesão variando de 10,7 a 14,5 cm. Vinte e nove clones com comprimento médio da lesão variando de 2,7 a 9,68 cm agruparam-se com o comparador resistente e foram, então, classificados como resistentes (Figura 3a). Além do critério do fenótipo da resistência, os indivíduos foram selecionados com base na disponibilidade de mudas clonais para realização do experimento de transcriptoma. Nessa progênie, para formação dos *pools* R e S, foram selecionados os clones SP4138, SP4145, SP4118 e SP4154 e os clones SP4133, SP4108, SP4111 e SP4161, respectivamente (Figura 3a).



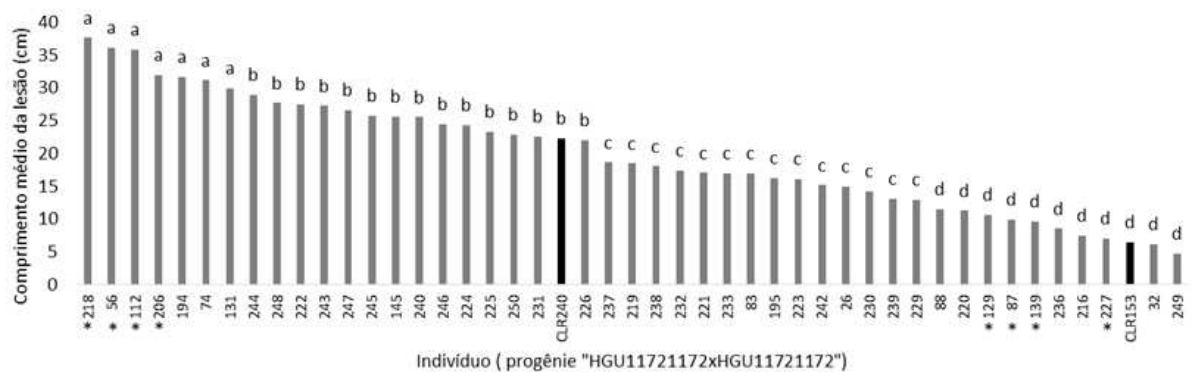
**Figura 2** - Comparadores resistente CLR153 e suscetível CLR240 à murcha-de-Ceratocystis, 60 dias após inoculações com *Ceratocystis fimbriata*. Planta do clone CLR153 sem murcha (a); plantas do clone CLR240 murcha e morta (b); caule de plantas do clone CLR153 sem escurecimento do lenho (c); caule de plantas do clone CLR240 com escurecimento (d); corte longitudinal de caule de planta CLR153 mostrando ausência da coloração escura no tecido lenhoso do xilema (e); e corte longitudinal de caule de planta CLR240 mostrando coloração escura no tecido lenhoso do xilema (f).

Na progênie “HGU1172xHGU1172”, 14 clones com comprimento médio da lesão variando de 22 a 28,9 cm agruparam-se junto ao comparador suscetível, portanto foram classificados como suscetíveis à murcha-de-Ceratocystis. Outros sete clones com comprimento médio da lesão acima de 29,9 cm foram agrupados separadamente e também foram classificados como suscetíveis. Quatorze clones com comprimento médio da lesão variando de 12,98 a 18,6 cm foram agrupados separadamente e classificados como medianamente suscetíveis. Os demais dez clones, com média entre 4,8 e 11,48 cm, agruparam-se com o comparador resistente, portanto foram classificados como resistentes. Nessa progênie, para formação dos *pools* R e S, foram selecionados os clones 227, 87, 139 e 129 e os clones 112, 56, 218 e 206, respectivamente (Figura 3b).

a.



b.



**Figura 3** - Comprimento médio da lesão (cm) no lenho das plantas inoculadas com o fungo *Ceratocystis fimbriata* e classificação quanto à resistência à murcha-de-Ceratocystis dos indivíduos das progênies “G26xG27” (a) e “HGU1172xHGU1172” (b). Indivíduos que se agruparam com o comparador suscetível (CLR240) ou que apresentaram comprimento da lesão maior que o dele foram classificados como suscetíveis (classes a e b). Indivíduos que diferiram estatisticamente dos comparadores suscetível e resistente foram considerados como moderadamente suscetíveis (classe c). Indivíduos que agruparam-se com o comparador resistente (CLR153) foram classificadas como resistentes (classe d). \*Indivíduos selecionados para formação de *pools* de plantas resistentes e suscetíveis para análises do transcriptoma da interação.

## **Extração de RNA total e sequenciamento do transcriptoma da interação**

Foram obtidas amostras de RNA total do caule de plantas de *Eucalyptus* puro, íntegro e nas concentrações necessárias para o sequenciamento por RNASeq, confirmado pela análise com o Bioanalyzer 2100. Também foi observado o padrão típico para RNA total nos electroferogramas com os picos correspondentes aos RNAs das subunidades ribossomais. A maioria das amostras de RNA total obtidas apresentou RINs >8 e no mínimo 0,1-1ug de massa no Qubit 2.0, valores considerados mínimos necessários para o preparo das bibliotecas de cDNA, objetivando o sequenciamento com equipamentos Illumina. O sequenciamento gerou 269 milhões de leituras (*reads*) *paired end*, sendo 141 milhões correspondentes aos *pools* R e S de plantas inoculadas com o fungo (bibliotecas T1 e T3) e 127 milhões aos *pools* R e S de plantas não inoculadas (T2 e T4).

## **Análises de bioinformática**

### **Mapeamento de leituras (*reads*)**

As leituras (*reads*) foram mapeadas contra as sequências codificantes do *E. grandis* (arquivo "Egrandis\_201\_v1.1.cds.fa" com 46.315 sequências) do Phytozome. Para cada biblioteca sequenciada, aproximadamente 80% dos *reads* foram alinhados com *E. grandis*. Além disso, as leituras foram mapeadas no genoma de *C. cacoufunesta*, como tentativa de identificar os transcritos pertencentes ao fungo. Como esperado, a menor fração dos *reads* obtidos a partir dos *pools* R e S de plantas não inoculadas foi alinhada com o genoma de *C. cacaofunesta* (Tabela 1).

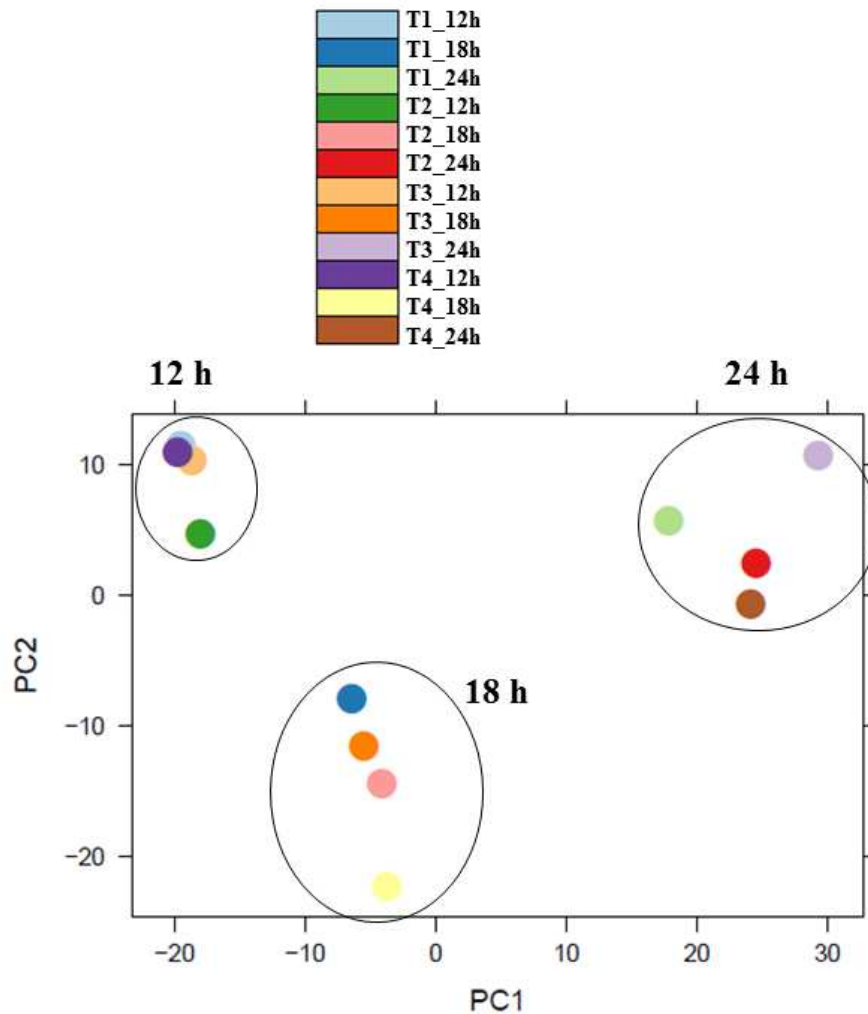
**Tabela 1** - Número de leituras (*reads*) total e alinhadas com os genomas de referência de *Eucalyptus grandis* e *Ceratocystis cacaofunesta* por tratamento

Biblioteca*	Total de Leituras ( <i>Paired Reads</i> )	Alinhadas com <i>E. grandis</i>	Alinhadas com <i>C. cacaofunesta</i>	
T1_12h	23.017.290	9.585.814 (81,56%)	61.298 (0,27%)	Inoculadas
T1_18h	27.545.430	11536813 (81,45%)	146241 (0,53%)	
T1_24h	15.469.018	6308382 (79,89%)	162878 (1%)	
T3_12h	19.606.082	7945718 (79,71%)	54511 (0,28%)	
T3_18h	24732690	9988841 (79,18%)	137240 (0,55%)	
T3_24h	31575802	12675750 (78,78%)	593791 (1,88%)	
T2_12h	14847494	6083212 (80%)	4183 (0,03%)	Não inoculadas
T2_18h	31415744	13085510 (81,13%)	6207 (0,02%)	
T2_24h	18703508	7610637 (79,74%)	2297 (0,01%)	
T4_12h	17929814	7338050 (80,18%)	6007 (0,03%)	
T4_18h	30677344	10337148 (66,22%)	4213 (0,01%)	
T4_24h	14386062	5907131 (80,53%)	2636 (0,02%)	

\* Tratamento = Tempo de coleta.

As bibliotecas correspondentes ao *pool* S inoculado (T3) apresentaram a maior porcentagem de alinhamento com o genoma do fungo, seguido do *pool* R inoculado (T1). Congruentemente, *pools* R e S de plantas não inoculadas (T2 e T4) apresentaram as menores porcentagens.

Para conhecer a variabilidade entre amostras após o alinhamento foram realizadas análises de componentes principais (PCA), utilizando-se como base a tabela de *read\_counts* lançada pelo RSEM. O agrupamento das amostras com base no alinhamento com *E. grandis*, indicou que a maioria da variação na expressão gênica é, principalmente, devido aos diferentes tempos analisados. Assim, três grupos foram formados, cada um constituído pelas amostras correspondentes às 12, 18 e 24 h, devendo ser ressaltado que as amostras correspondentes a *pools* R e S de plantas inoculadas (T1 e T3) estiveram próximas às amostras dos *pools* R e S de plantas não inoculadas (T2 e T4) (Figura 4).

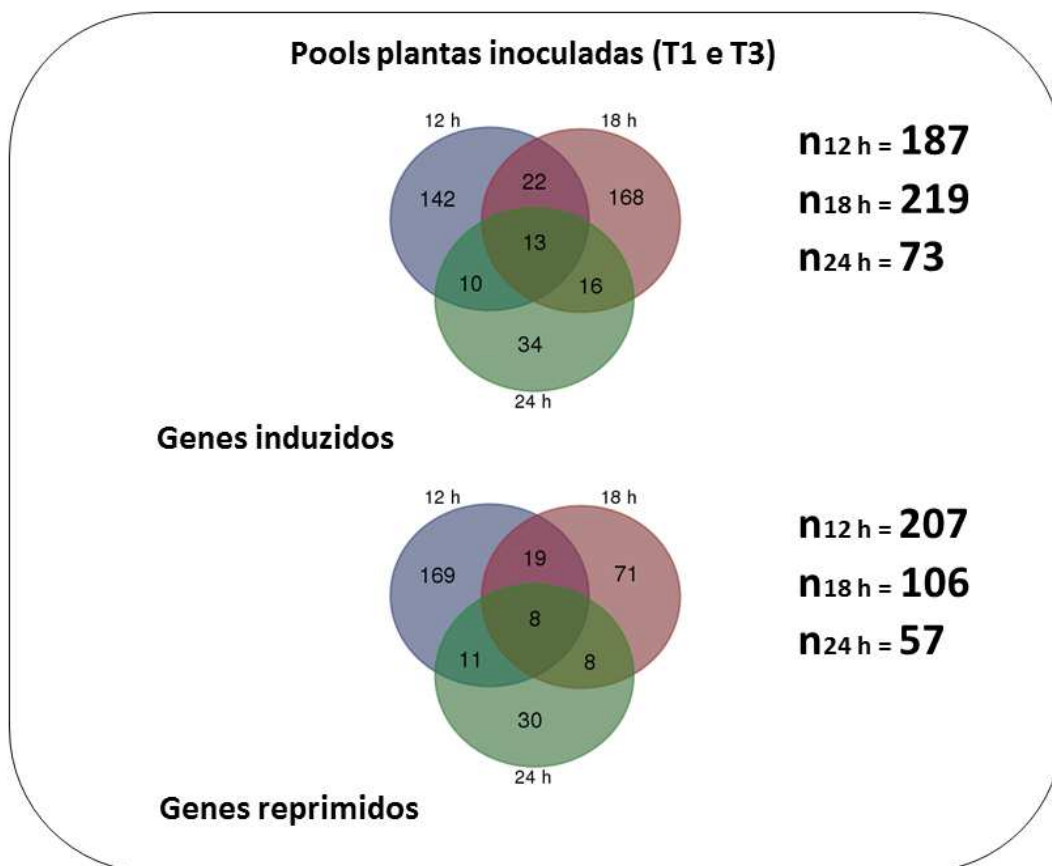


**Figura 4 -** Análises de componentes principais (*Principal Components Analysis*, PCA) apresentando a variação biológica intrínseca entre as amostras com base no alinhamento com *Eucalyptus grandis*. \* T = Tratamentos.

### **Análises da expressão gênica diferencial em *Eucalyptus grandis***

As análises de expressão gênica diferencial nos diferentes tratamentos permitiram detectar 39.427 transcritos mapeados contra as sequências codificantes de *E. grandis* ("Egrandis\_201\_v1.1.cds.fa" com 46.315 sequências), dos quais 3.170 corresponderam a "TCONS", que são consideradas novos transcritos ou erros durante o alinhamento. Alguns desses transcritos foram comuns nos diferentes tratamentos (inoculado e

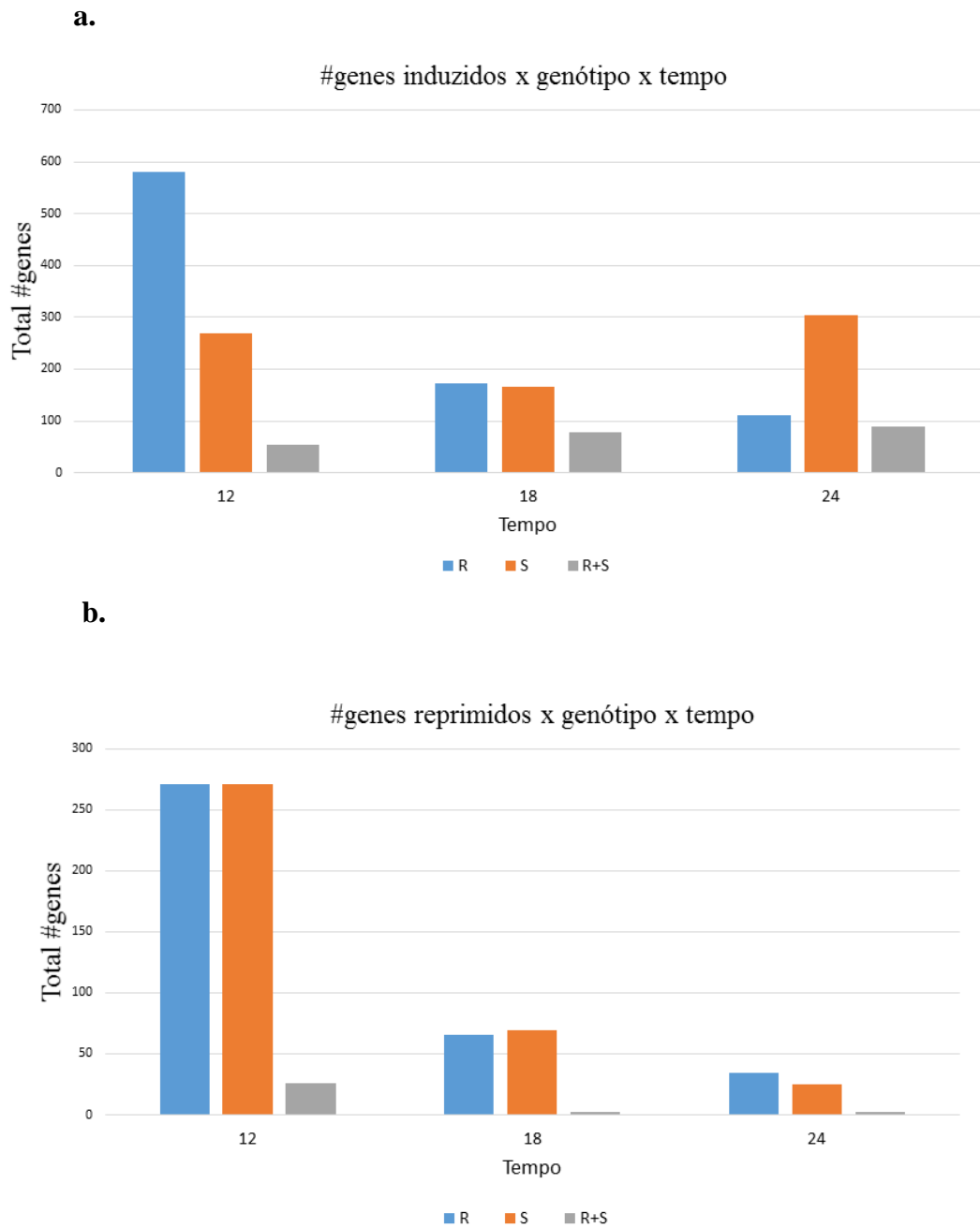
não inoculado) e agrupados, neste trabalho, de acordo com a característica de induzidos (*up-regulated*) ou reprimidos (*down-regulated*) (Figura 5). Nos três tempos analisados, 721 genes foram diferencialmente expressos nos *pools* R e S de plantas inoculadas (T1 e T3), dos quais 405 foram induzidos e 316 reprimidos. Dos genes induzidos, 13 foram comuns nos três tempos, 22 foram comuns entre 12 e 18 hai, 10 entre 12 e 24 hai e 16 entre 18 e 24 hai. Por outro lado, 142 genes induzidos foram exclusivos de amostras coletadas às 12 hai, 168 às 18 hai e 34 às 24 hai. Dos genes reprimidos, oito foram comuns nos três tempos, 19 foram comuns às 12 e 18 hai, 11 às 12 e 24 hai e 8 às 18 hai e 24 hai. Dos genes reprimidos, 169 foram exclusivos às 12 hai, 71 às 18 hai e 30 às 24 hai (Figura 5). Nos *pools* R e S de plantas não inoculadas (T2 e T4), 1.329 genes foram diferencialmente expressos nos três tempos analisados, sendo o número de transcritos em comuns nos diferentes tempos próximo ao do tratamento inoculado.



**Figura 5 -** Genes diferencialmente expressos e em comuns nos *pools* de *Eucalyptus* spp. nos tratamentos de plantas inoculadas (T1 e T3) com *Ceratocystis fimbriata*, separados de acordo com a característica de genes induzidos (*up-regulated*) e reprimidos (*down-regulated*).

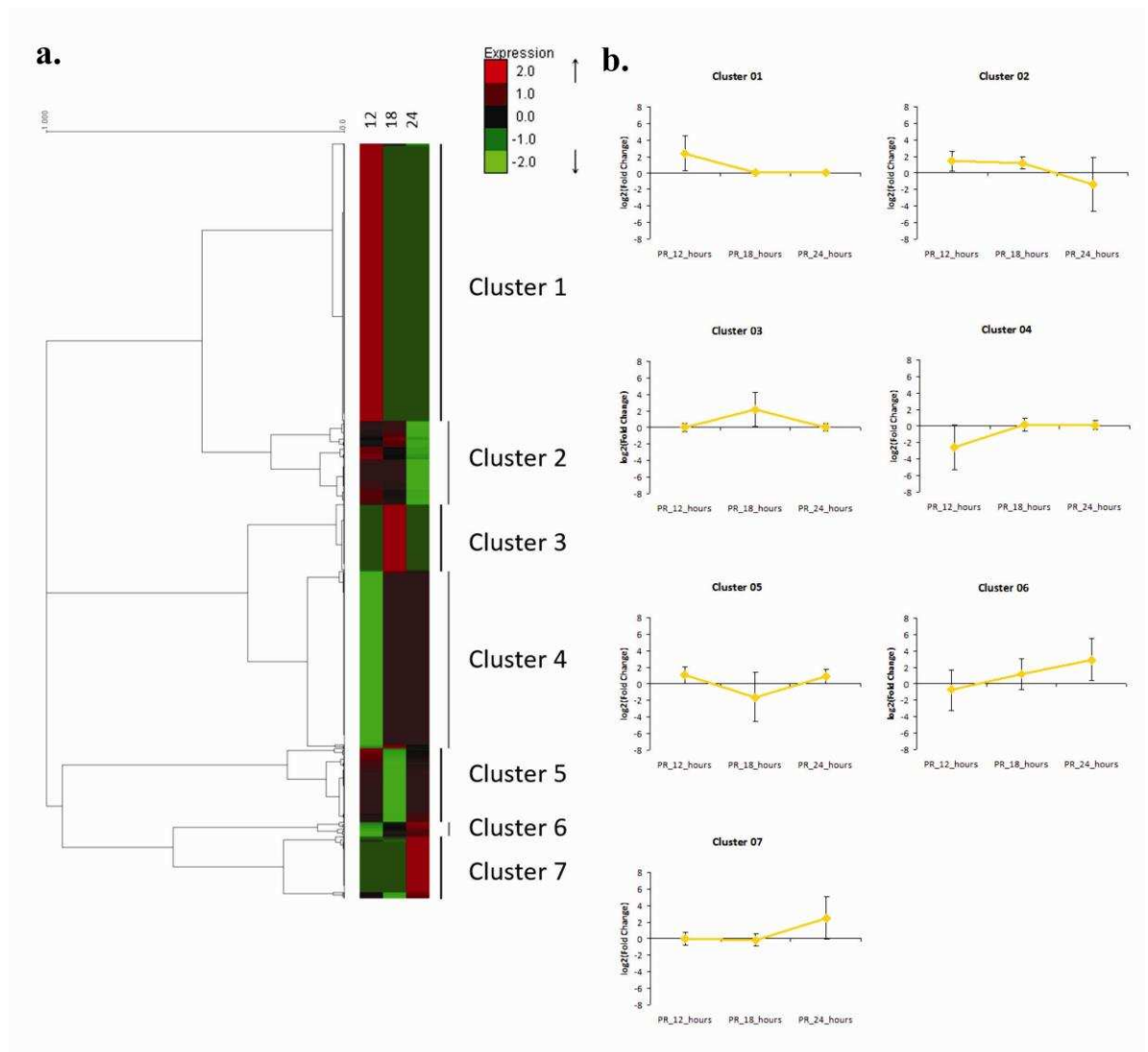
Os resultados do transcriptoma revelaram uma nítida diferença no padrão de expressão dos genes entre o *pool* S e *pool* R inoculados com *C. fimbriata*. O *pool* R apresentou número maior de genes induzidos relacionados com a defesa nas primeiras horas (12 hai), quando comparados com o *pool* S, que responderam mais tardiamente, o que foi corroborado pelo número maior desses genes induzidos às 24 hai. Já a quantidade de genes reprimidos foi similar em ambos *pools*.

No geral, foi constatado número maior de genes induzidos que reprimidos, independentemente do tempo (Figura 6). Um total de 1.470 genes foi diferencialmente expresso nos *pools* R e S às 12 hai (902 genes induzidos e 568 genes reprimidos, Figura 6a), sendo observada diminuição nos níveis transcricionais nos tempos posteriores (553 genes às 18 hai e 565 às 24 hai, Figuras 6b, c). Às 12 hai, as plantas do *pool* R apresentaram maior número de genes induzidos (634 transcritos), quando comparadas com as plantas do *pool* S (321 transcritos). Nesse tempo, o número de genes reprimidos foi igual em ambos os *pools* (297 transcritos), sendo constatados 271 transcritos diferentes em cada *pool* (Figura 6a). O mesmo padrão foi observado às 18 e 24 hai, com a diferença de que às 24 hai houve diminuição no número de genes induzidos em plantas do *pool* R (200 genes) e aumento no *pool* S (392 transcritos) (Figuras 6b e c).



**Figura 6** - Total de genes diferencialmente expressos em pools de plantas resistentes e suscetíveis de *Eucalyptus* spp. em resposta à infecção de *Ceratocystis fimbriata*, a partir de dados de RNA-seq. Total de genes (a) induzidos ou *up-regulated* e (b) reprimidos ou *down-regulated* entre genótipos e tratamentos.

Na análise de agrupamento de genes diferencialmente expressos no *pool* R foram formados sete grupos ou *clusters* diferentes de expressão, sendo novamente constatado que a expressão gênica mudou entre os tempos analisados e que o maior número de genes foi induzido às 12 hai nesse *pool* (Figura 7a). Os valores dos  $\log_2(\text{fold change})$  foram inseridos em gráficos de tendência em relação ao tempo (Figura 7b).

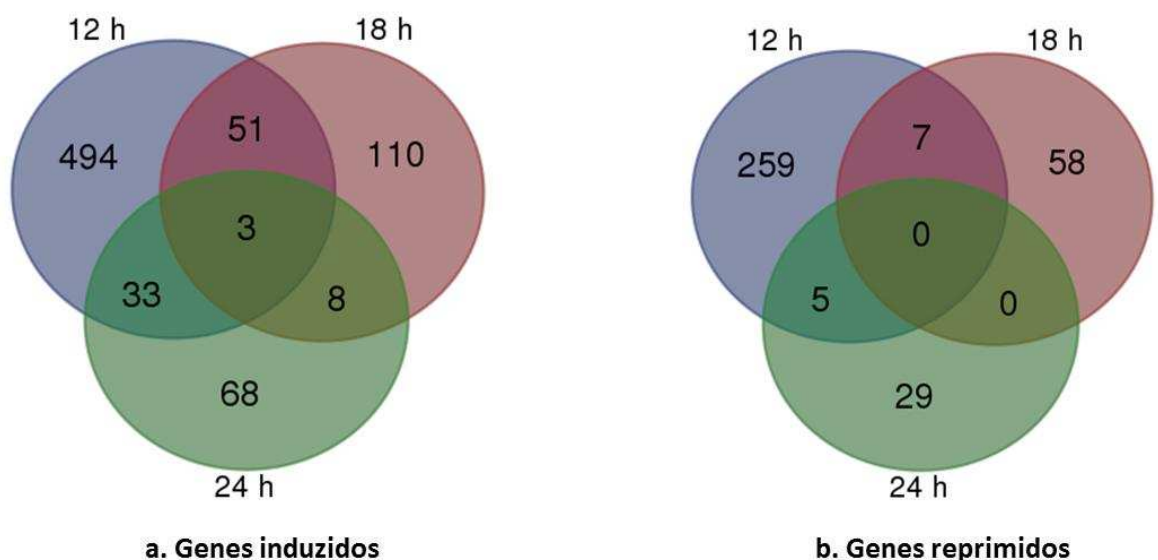


**Figura 7 -** Agrupamento de genes com base no perfil de expressão gênica (*Heatmap*) no *pool* de plantas de *Eucalyptus* spp. resistentes (R) à murcha-de-Ceratocystis às 12, 18 e 24 horas após inoculações (hai) com *Ceratocystis fimbriata*. Todos os genes diferencialmente

expressos foram agrupados tanto pela variação dos valores de  $\log_2(\text{fold change})$ . Na horizontal tem-se a diferença de valores de  $\log_2(\text{fold change})$  entre 12, 18 e 24 hai, enquanto na vertical tem-se o agrupamento dos genes (em *clusters*) quanto ao perfil de expressão ao longo do tempo. Tons verdes indicam genes reprimidos e tons vermelhos, genes induzidos (a). Gráficos dos agrupamentos de genes com base nos perfis similares de expressão ao longo do tempo (*clusters*), onde a linha amarela representa a média dos valores de  $\log_2(\text{fold change})$  dos pontos em cada tempo (b).

Comparando os genes diferencialmente expressos em comuns entre os tempos em plantas do *pool* R, constatou-se que dos genes induzidos 494 foram exclusivos às 12 hai, 110 às 18 hai e 68 às 24 hai (Figura 8a). Dos genes reprimidos, 259 foram exclusivos às 12 hai, 58 às 18 hai e 29 às 24 hai (Figura 8b).

### Pools plantas Resistentes (R)

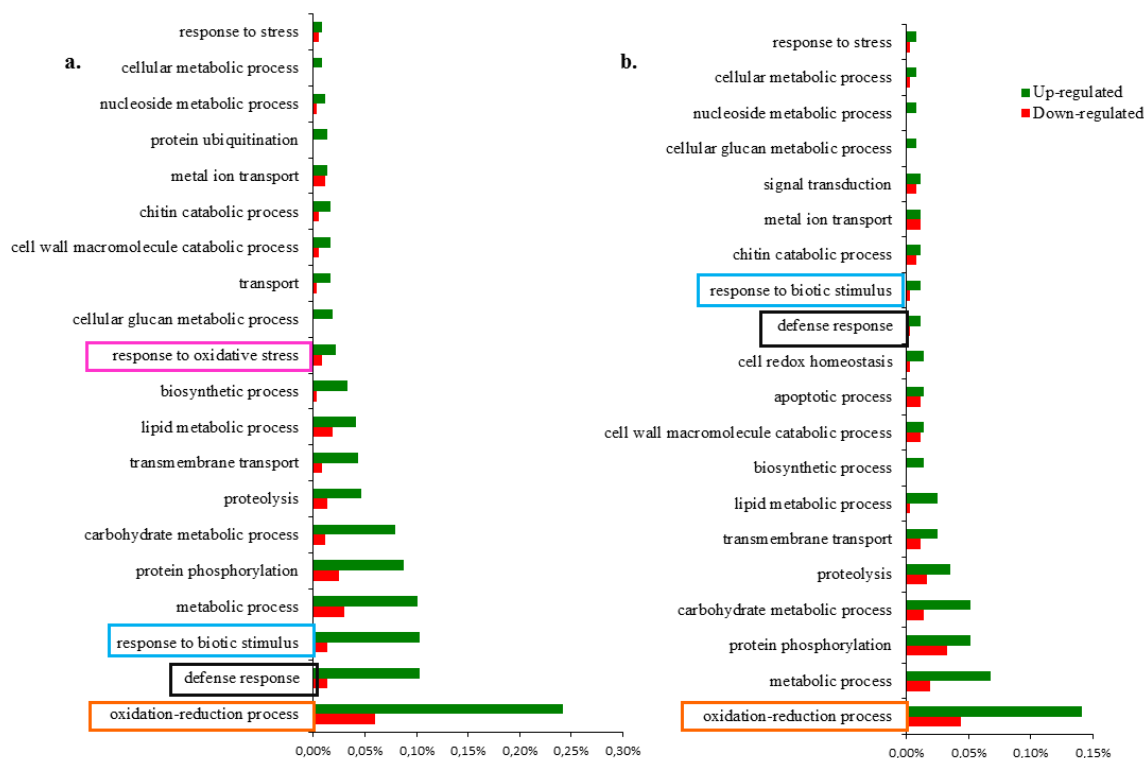


**Figura 8** - Número de genes (a) induzidos (*up-regulated*) e (b) reprimidos (*down-regulated*) em plantas de *Eucalyptus* spp. do *pool* resistente, exclusivos e em comum às 12, 18 e 24 horas após inoculação com *Ceratocystis fimbriata*.

### **Identificação de genes diferencialmente expressos**

As análises de enriquecimento de ontologia gênica (GO) no processo biológico mostraram que as respostas das plantas de *Eucalyptus* spp. do *pool* R às 12 hai com *C. fimbriata* compreende, em ordem de maior representação, a ativação de processos de redução-oxidação, seguidos da resposta de defesa, resposta a estímulo biótico, metabolismo, fosforilização de proteínas, metabolismo de carboidratos, proteólises, transporte transmembrana, metabolismo de lipídeos, processos biossintéticos e resposta ao estresse oxidativo, sendo este último não representado no *pool* S, entre outros (Figura 9a).

Os genes diferencialmente expressos em plantas do *pool* S às 12 hai também foram anotados e representados em várias categorias funcionais para os processos biológicos, em ordem de maior representação, sendo: processos de redução-oxidação, metabólicos, fosforilização de proteínas, metabolismo de carboidratos, transporte transmembrana, entre outros. Constatou-se que as respostas de defesa e o estímulo biótico no *pool* S apresentaram representação inferior em comparação ao *pool* R (Figura 9b). De modo geral, os *pools* R e S de plantas inoculadas apresentaram genes relacionados com a resposta de defesa ao patógeno, categorizados em processos como *resposta de defesa*, *resposta a estímulo biótico* e *resposta a estresse*. Entretanto, a quantidade de GOs representados em cada categoria variou entre os *pools*.



**Figura 9** - Análises de enriquecimento de termos de ontologia gênica (*Gene ontology*, GO) para “processos biológicos”. Somente os transcritos alinhados com o genoma de *Eucalyptus grandis* diferencialmente expressos nos *pools* R (a) e S (b) às 12 horas após as inoculações com *Ceratocystis fimbriata* foram utilizados nesta análise.

Como o fungo *C. fimbriata* alterou a expressão de muitos genes envolvidos na defesa de plantas de *Eucalyptus* spp. nos três tempos analisados, eles foram classificados e agrupados de acordo com as suas funções na defesa. Entre esses grupos funcionais sobressaíram as proteínas de reconhecimento de patógeno ou receptores ricos em leucina, conhecidos como receptores tipo quinases (*Receptor like kinase*, RLK), com um total de 33 genes diferencialmente expressos (Tabela 3 e Anexo A); a sinalização de cálcio, com 27 transcritos (Tabela 3 e Anexo A); os fatores de transcrição (FTs), com 68 transcritos (Tabela 4 e Anexo B); a sinalização hormonal, com 79 transcritos (Tabela 5 e Anexo C); o sistema redox (processos de redução-oxidação), com 115 transcritos (Tabela 6 e Anexo D), sendo essa a via com o maior número de genes diferencialmente expressos; as proteínas

relacionadas à patogenicidade (PRs), com 49 transcritos (Anexo E); e outros genes de defesa, com 46 transcritos (Tabela 7 e Anexo E).

No geral, os *pools* R e S apresentaram o maior número de genes reprimidos em todos os grupos funcionais às 12 hai, comparado com os outros tempos (Tabela 2). Já o número de genes induzidos apresentou comportamento inverso entre os *pools* R e S. Às 12 hai, todos os grupos funcionais apresentaram o maior número de genes induzidos no *pool* R, quando comparado com os outros tempos, destacando-se o sistema redox, os genes PRs e outros genes de defesa. Por outro lado, para o *pool* S, a maioria dos grupos funcionais apresentou o menor número de genes induzidos às 12 hai, com um aumento considerável às 24 hai (Tabela 2).

**Tabela 2** - Número de genes induzidos e reprimidos por grupo funcional nos *pools* de plantas resistentes (R) e suscetíveis (S) por tempo avaliado

Grupo Funcional	No. Genes Induzidos						No. Genes Reprimidos					
	<i>Pool R</i>			<i>Pool S</i>			<i>Pool R</i>			<i>Pool S</i>		
	12 hai	18 hai	24 hai	12 hai	18 hai	24 hai	12 hai	18 hai	24 hai	12 hai	18 hai	24 hai
Receptores tipo quinases (RLK)	13	5	1	3	1	4	2	2	0	7	1	0
Sinalização de cálcio	12	5	4	1	1	7	5	1	0	1	1	0
Fatores de transcrição (FTs)	21	4	6	12	4	22	8	2	1	9	1	0
Sinalização hormonal	28	11	8	7	15	28	5	1	0	10	1	0
Sistema redox	53	15	11	12	25	31	13	0	0	5	2	0
Genes PRs	37	3	5	4	24	21	1	1	0	1	0	0
Outros genes de defesa	35	20	4	3	18	15	2	0	1	5	3	0

A fim de compreender a resposta de defesa de plantas resistentes de *Eucalyptus* spp. à murcha-de-Ceratocystis, causada por *C. fimbriata*, foram identificados e comparados os genes diferencialmente expressos às 12 hai nos *pools* R e S, para os principais grupos funcionais. Em relação ao grupo de genes codificadores de receptores tipo quinases, no *pool* R 13 foram identificados genes induzidos e apenas dois reprimidos (Tabela 3). Entre os

transcritos relacionados com a sinalização dependente do cálcio, foram identificados genes que codificam proteínas de ligação ao cálcio calmodulina, a fosfodiesterase dependente do cálcio, proteínas EF-Hand ligantes de cálcio, entre outras. No *pool* R o número maior desses genes foi induzido (12 transcritos), tendo sido encontrados apenas cinco reprimidos (Tabela 3). No *pool* S somente um gene foi induzido e um reprimido.

**Tabela 3** - Receptores quinases e genes envolvidos na sinalização de cálcio, cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 12 hai

	Família Gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R	Pool S
<b>Receptores tipo quinases</b>		Eucgr.I00025	Transmembrane receptors;ATP binding	3,05	-
		Eucgr.G00255	Receptor lectin kinase	-	-1,29
		Eucgr.K03066	Receptor lectin kinase	1,14	-
		Eucgr.G01510	Receptor lectin kinase	-1,30	-
		Eucgr.L00813	Receptor-like kinase in flowers 1	2,45	-
		Eucgr.H01603	Receptor-like kinase in in flowers 3	1,08	-
		Eucgr.L01216	Receptor-like protein kinase 1	-	-2,44
		Eucgr.A00564	Receptor like protein 6	-	-1,39
		Eucgr.A01726	Receptor-like protein kinase-related family protein	2,25	-
		Eucgr.A01731	Receptor-like protein kinase-related family protein	2,23	-
		Eucgr.A01728	Receptor-like protein kinase-related family protein	2,22	-
		Eucgr.A01729	Receptor-like protein kinase-related family protein	2,04	-
		Eucgr.K01597	BR11-associated receptor kinase	2,03	-
		Eucgr.K01611	BR11-associated receptor kinase	-	-2,73
		Eucgr.E01789	Cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 10	-	4,11
		Eucgr.E03589	Cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 29	1,92	-
		Eucgr.B00290	Cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 42	1,76	-
		Eucgr.B00292	Cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 42	1,15	-
		Eucgr.J03152	Glutamate receptor 2.7	1,73	-
		Eucgr.B00241	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	-2,97	-
	Eucgr.H03824	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family;transmembrane receptors;	-	2,93	
	Eucgr.D00069	Disease resistance protein (TIR-NBS class)	-	1,62	
	Eucgr.H01894	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	-	-1,28	
	Eucgr.B01956	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	-	-2,14	
	Eucgr.L00518	Phytosulfokin receptor 1	-	-4,08	

<b>Sinalização dependente do cálcio</b>	<b>Calcium-binding EF-hand family</b>	Eucgr.F02935	Calcium-binding EF-hand family protein	1,40	-
		Eucgr.F02936	Calcium-binding EF-hand family protein	1,09	-
		Eucgr.B00947	Calcium-binding EF-hand family protein	-	1,44
		Eucgr.H02910	Calcium-binding EF-hand family protein	-	-7,68
	<b>Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily</b>	Eucgr.H01013	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein	1,20	-
		Eucgr.J02521	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein	1,18	-
	<b>Calcium-dependent lipid-binding</b>	Eucgr.F028461	Calcium-dependent lipid-binding (calb domain) family protein	1,07	-
	<b>Calmodulin (CaM)</b>	Eucgr.B00128	Calmodulin like 37	3,85	-
		Eucgr.B00125	Calmodulin like 37	1,89	-
		Eucgr.F03632	Calmodulin like 37	1,79	-
		Eucgr.B00123	Calmodulin like 37	1,72	-
		Eucgr.B00124	Calmodulin like 37	1,54	-
		Eucgr.B00127	Calmodulin like 37	1,23	-
		Eucgr.A00852	Calmodulin like 42	1,85	-
	<b>Outras</b>	Eucgr.F02431	Annexin 1	-1,07	-
Eucgr.F02433		Annexin 7	-1,21	-	
Eucgr.L01282		Calcium-dependent protein kinase 29	-1,67	-	

Os genes induzidos (*up-regulated*) e os reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

Entre as famílias de fatores de transcrição (FTs) que foram diferencialmente expressas às 12 h em *Eucalyptus*, em resposta ao ataque de *C. fimbriata*, foram identificadas a WRKY, NAC, bHLH, TCP, bZIP, AP2, CBF, entre outras (Tabela 4). Dos nove genes WRKY diferencialmente expressos, o *WRKY DNA-binding protein 72* destacou-se por ter sua expressão aumentada em até 4,28 (Eucgr.K02453) no *pool* R e quatro transcritos foram unicamente observados nesse *pool* (Eucgr.G02469, Eucgr.K02453, Eucgr.I01633, Eucgr.K00786). No *pool* S apenas três genes dessa família foram induzidos e um reprimido nesse tempo. A família de FTs responsivos ao etileno/apetala (AP2/ERFs) também se destacou, tendo oito transcritos induzidos no *pool* R e um no *pool* S. Um gene redox *Responsive Transcription Factor1* (RRTF1; Eucgr.I01153) e um fator de ligação à repetição-C 4 (CBF4; Eucgr.A02818) apresentaram aumento em expressões apenas no *pool* R (Tabela 4).

**Tabela 4** -Fatores de transcrição cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 12 hai

Família Gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R	Pool S
<b>WRKY</b>	Eucgr.G02469	WRKY DNA-binding protein 3	1,85	-
	Eucgr.G00619	WRKY DNA-binding protein 9	-	1,20
	Eucgr.D01811	WRKY DNA-binding protein 27	1,54	1,14
	Eucgr.C02660	WRKY DNA-binding protein 60	-1,54	-
	Eucgr.K02453	WRKY DNA-binding protein 72	4,29	-
	Eucgr.I01927	WRKY DNA-binding protein 72	-	1,48
	Eucgr.I01633	WRKY DNA-binding protein 75	1,57	-
	Eucgr.K00786	WRKY family transcription factor	1,25	-
	Eucgr.D02359	WRKY family transcription factor	-	-1,24
<b>NAC</b>	Eucgr.G01758	NAC transcription factor-like 9	-1,02	-
	Eucgr.B03208	NAC-like, activated by AP3PI	1,09	-
<b>basic/helix-loop-helix (bHLH)</b>	Eucgr.G03396	Basic helix-loop-helix (bhlh) DNA-binding superfamily protein	1,17	-
	Eucgr.K01039	Basic helix-loop-helix (bhlh) DNA-binding superfamily protein	-4,18	-
	Eucgr.B00366	Basic helix-loop-helix (bhlh) DNA-binding superfamily protein	-	1,96
	Eucgr.B02000	Basic helix-loop-helix (bhlh) DNA-binding superfamily protein	-	1,50
<b>TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA e PCF (TCP)</b>	Eucgr.J01466	TCP family transcription factor	-2,10	-
	Eucgr.G02354	TCP family transcription factor	-	2,67
	Eucgr.A02843	TCP family transcription factor	-	-1,05
<b>basic leucine-zipper (bZIP)</b>	Eucgr.I02396	Basic leucine-zipper 44	1,14	-
	Eucgr.J02482	Basic-leucine zipper (bzip) transcription factor family protein	-	-4,71
<b>APETALA 2/ethylene response element binding protein (AP2/EREBP)</b>	Eucgr.F02319	Related to AP2 1	1,08	-
	Eucgr.F02317	Related to AP2 1	1,02	-
	Eucgr.H04892	Related to AP2 6I	1,18	-
	Eucgr.B03048	AP2B3 transcription factor family protein	1,15	-
	Eucgr.G01236	AP2B3-like transcriptional factor family protein	-1,32	-
	Eucgr.G01241	AP2B3-like transcriptional factor family protein	-	1,69
	Eucgr.I00564	AINTEGUMENTA-like 6	1,51	-
	Eucgr.C03297	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	1,91	-2,08
	Eucgr.C03785	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-4,56	-
	Eucgr.C00780	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-	-4,20

	Eucgr.A02924	Ethylene-responsive element binding factor 13	1,47	-
	Eucgr.I01153	Redox responsive transcription factor 1(RRTF1)	3,01	-1,48
<b>C-repeat-binding factor/dehydration responsive element-binding factor (CBF)</b>	Eucgr.D01925	C-repeat binding factor 2	1,94	1,70
	Eucgr.A02818	C-repeat-binding factor 4 (CBF4)	4,24	-
	Eucgr.D02645	Homeobox 7	-1,06	-
	Eucgr.F02206	Homeobox-leucine zipper protein family	-	-1,58
	Eucgr.B00171	BTB and TAZ domain protein 1	1,92	-1,45
	Eucgr.K02284	NF-X-like 1	2,76	-
<b>Outras</b>	Eucgr.F03621	PLATZ transcription factor family protein	-1,16	-
	Eucgr.A01572	Sequence-specific DNA binding transcription factors	-	1,08
	Eucgr.H00624	Basic transcription factor 3	-	6,96
	Eucgr.D00033	FRS (FAR1 Related Sequences) transcription factor family	-	2,11
	Eucgr.G02787	Pseudo-response regulator 7	-	1,06
	Eucgr.A00903	GRAS family transcription factor	-	-1,89

Os genes induzidos (*up-regulated*) e os reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

Em referência aos genes envolvidos na sinalização hormonal, vários genes relacionados com auxinas (*Auxin-related gene*) foram diferencialmente expressos, como genes das famílias *auxin-responsive Gretchen Hagen 3 (GH3)*, *Small Auxin Up RNA (SAUR)*, o transportador de auxina *Auxin efflux carrier* e *glutathione-S-transferases (GSTs)*; Tabela 5). Quatorze desses genes tiveram suas expressões induzidas no *pool R*, dos quais um GH3 (Eucgr.E00072) e seis GSTs (Eucgr.H00155, Eucgr.D00025, Eucgr.D00024, Eucgr.H00110, Eucgr.H00157 e Eucgr.K03036) foram unicamente expressos nesse *pool* (Anexo C). Com relação aos genes GSTs, 11 genes foram induzidos no *pool R*, enquanto apenas dois apresentaram aumento nas suas expressões no *pool S*. Dos genes relacionados com auxinas, dois SAUR (Eucgr.J02607 e Eucgr.I01337), um GST (Eucgr.F01424) e dois genes *Dormancy/auxin associated* (Eucgr.H04545 e Eucgr.I02133) foram reprimidos às 12 hai exclusivamente no *pool S* (Tabela 5). Outros genes relacionados com a sinalização hormonal que foram diferencialmente expressos pertencem às famílias 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) sintase (ACS), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase (ACO) e UDP-glycosyl transferase (GTFs). Quatro genes ACS e nove GTFs foram induzidos unicamente no *pool R*. No *pool S*, apenas dois genes GTFs foram induzidos nesse tempo. Por outro lado, cinco genes GTFs foram unicamente identificados nesse último *pool* como reprimidos (Tabela 5).

**Tabela 5** - Genes envolvidos na sinalização hormonal cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 12 hai

	Família Gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R	Pool S
Genes relacionados com auxinas	<b>Gretchen Hagen 3 (GH3)</b>	Eucgr.E00072	Auxin-responsive GH3 family protein	2,19	-
		Eucgr.H02264	Auxin-responsive GH3 family protein	1,36	-
	<b>Small Auxin Up RNA (SAUR)</b>	Eucgr.F02085	SAUR-like auxin-responsive protein family	-	1,07
		Eucgr.J02607	SAUR-like auxin-responsive protein family	-	-1,18
		Eucgr.I01337	SAUR-like auxin-responsive protein family	-	-1,21
	<b>Glutathione-S-transferase (GSTs)</b>	Eucgr.H01172	Glutathione S-transferase 6	-1,07	-
		Eucgr.H00155	Glutathione S-transferase tau 7	1,48	-
		Eucgr.D00025	Glutathione S-transferase tau 7	1,30	-
		Eucgr.D00024	Glutathione S-transferase tau 7	1,12	-
		Eucgr.H00110	Glutathione S-transferase tau 7	1,11	-
		Eucgr.K03036	Glutathione S-transferase TAU 8	1,75	-
		Eucgr.K03034	Glutathione S-transferase TAU 8	1,66	-
		Eucgr.K03029	Glutathione S-transferase TAU 8	1,52	-
		Eucgr.K03031	Glutathione S-transferase TAU 8	1,45	-
		Eucgr.K03039	Glutathione S-transferase TAU 8	1,43	1,08
		Eucgr.K01234	Glutathione S-transferase PHI 9	1,36	-
		Eucgr.F01433	Glutathione S-transferase TAU 19	-1,99	Inf
		Eucgr.B02774	Glutathione S-transferase TAU 19	1,57	-
	Eucgr.F01424	Glutathione S-transferase TAU 19	-	-1,08	
	<b>Auxin Efflux Carrier (AEC) Family</b>	Eucgr.B01403	Auxin efflux carrier family protein	1,70	-
	<b>Dormancyauxin associated family</b>	Eucgr.H04545	Dormancyauxin associated family protein	-	-1,00
		Eucgr.I02133	Dormancyauxin associated family protein	-	-1,31
	<b>Proteína da família auxina-responsivos</b>	Eucgr.H00499	Auxin-responsive family protein	-	1,35
<b>1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (ACS) gene family</b>	Eucgr.D01814	ACC synthase 1	1,26	-	
	Eucgr.D01815	ACC synthase 1	1,78	-	
	Eucgr.D01817	ACC synthase 1	1,37	-	
	Eucgr.L02435	ACC synthase 1	1,88	-	

<b>1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase (ACO) gene family</b>				
	Eucgr.C03886	ACC oxidase 1	-	2,07
	Eucgr.L01657	UDP-glucosyl transferase 72E1	-1,30	-
	Eucgr.I01117	UDP-glucosyl transferase 73B3	1,16	-
	Eucgr.G02439	UDP-glucosyl transferase 73B3	-	-2,96
	Eucgr.E02950	UDP-glycosyltransferase 73B4	2,55	-
	Eucgr.I01116	UDP-glycosyltransferase 73B4	1,67	-
	Eucgr.E01247	UDP-glucosyl transferase 73D1;UDP-glucosyl transferase 85A5	-	-2,21
	Eucgr.H00279	UDP-glucosyltransferase 74F2	-	-2,78
	Eucgr.L00991	UDP-glucosyl transferase 85A2	1,12	-
	Eucgr.F03599	UDP-glucosyl transferase 85A3	1,63	-
	Eucgr.A02709	UDP-glucosyl transferase 88A1	2,86	-
	Eucgr.L00635	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	1,97	-
	Eucgr.K02513	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	1,51	-
	Eucgr.A00942	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	1,41	-
	Eucgr.H00446	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-1,33	-
	Eucgr.A01606	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-1,81	-
	Eucgr.G02216	UDP-glucosyl transferase 85A3;UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-	3,34
	Eucgr.E01068	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-	1,24
	Eucgr.C01902	UDP-glucosyl transferase 88A1	-	-1,55
	Eucgr.F00339	UDP-glucosyl transferase 85A2	-	-3,80

Os genes induzidos (*up-regulated*) e os reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

No que se refere à homeostase redox, muitos genes desse grupo foram identificados entre os transcritos expressos diferencialmente em *Eucalyptus*, após a infecção do patógeno, como: genes que pertencem às famílias Citocromo P450 (CYP450), FAD-binding Berberine, FADNAD(P)-binding oxidoreductase, oxigenase dependente de 2-oxoglutarato (2OG) e de Fe II, e Glutathione-S-transferase (GST). Notoriamente, às 12 horas de contato com o patógeno, 23 genes CYP450 foram induzidos no *pool* R e apenas seis foram induzidos no *pool* S. Genes FAD-binding Berberine, FADNAD(P)-binding oxidoreductase, oxigenase dependente de 2-oxoglutarato (2OG) e de Fe II também foram bem representados entre os genes induzidos no *pool* R, no entanto poucos desses genes foram induzidos no *pool* S. Outros genes relacionados com o sistema redox de grande importância na defesa que foram induzidos em eucalipto em resposta a *C. fimbriata* são os genes de *peroxidases* (POX, possíveis PR-9) e *Flavina monooxigenases* (FMO) (Tabela 6).

**Tabela 6** - Peroxidases e genes do sistema redox cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp., às 12 hai

Família Gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R	Pool S
<b>Cytochrome P450 (CYP450)</b>	Eucgr.H04879	Cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 35	3,51	-
	Eucgr.B00116	Cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3	2,49	-
	Eucgr.H04878	Cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 25	2,40	-
	Eucgr.D00203	Cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 6	2,24	-
	Eucgr.B03255	Cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 34	1,99	-
	Eucgr.F00172	Cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 3	1,87	-
	Eucgr.J00477	Cytochrome P450, family 94, subfamily C, polypeptide 1	1,77	-
	Eucgr.D01952	Cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 1	1,74	-
	Eucgr.I00766	Cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 2	1,59	-
	Eucgr.D01027	Cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 1	1,49	-
	Eucgr.B04037	Cytochrome P450, family 714, subfamily A, polypeptide 1	1,44	-
	Eucgr.H01954	Cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	1,40	-
	Eucgr.K03296	Cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 1	1,40	-
	Eucgr.F01486	Cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	1,36	-
	Eucgr.D01956	Cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 4	1,34	-
	Eucgr.D01955	Cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 4	1,32	-
	Eucgr.C02162	Cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 1	1,24	-
	Eucgr.A01647	Cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 4	1,23	-
	Eucgr.C00059	Cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 1	1,22	-
	Eucgr.C02161	Cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 1	1,16	-
	Eucgr.A01644	Cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 4	1,08	-
	Eucgr.I00744	Cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8	1,07	-
	Eucgr.E01149	Cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1	1,02	1,19
	Eucgr.F01390	Cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 15	-1,05	-
	Eucgr.J02808	Cytochrome P450 superfamily protein	-1,14	-
	Eucgr.B02269	Cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 1	-1,56	-
	Eucgr.J01934	Cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 1	-1,68	-
	Eucgr.B00716	Cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 34	-	3,64
	Eucgr.L00957	Cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	-	3,11
	Eucgr.L00981	Cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 26	-	2,35

	Eucgr.G03199	Cytochrome P450, family 98, subfamily A, polypeptide 3	-	1,91
	Eucgr.K02128	Cytochrome P450, family 82, subfamily G, polypeptide 1	-	1,13
	Eucgr.E03682	Cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 6	-	-1,07
	Eucgr.L02217	Cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	-	-1,39
	Eucgr.D02644	Cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 6	-	-2,00
	Eucgr.F02489	Cytochrome P450, family 735, subfamily A, polypeptide 1	-	-2,03
<b>FAD-binding Berberine family</b>	Eucgr.D00070	FAD-binding Berberine family protein	3,93	-
	Eucgr.D01003	FAD-binding Berberine family protein	3,46	-
	Eucgr.D01004	FAD-binding Berberine family protein	3,45	-
	Eucgr.D00073	FAD-binding Berberine family protein	3,04	-
	Eucgr.D01005	FAD-binding Berberine family protein	2,01	-
	Eucgr.D01008	FAD-binding Berberine family protein	1,48	-
	Eucgr.D00077	FAD-binding Berberine family protein	1,17	-
<b>FADNAD(P)-binding oxidoreductase family</b>	Eucgr.J03128	FADNAD(P)-binding oxidoreductase family protein	2,10	1,11
	Eucgr.I00273	FADNAD(P)-binding oxidoreductase family protein	1,98	-
	Eucgr.I01449	FADNAD(P)-binding oxidoreductase family protein	1,92	-
	Eucgr.I02513	FADNAD(P)-binding oxidoreductase family protein	1,30	-
<b>2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily</b>	Eucgr.C01285	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	3,16	-
	Eucgr.C01029	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	2,39	-
	Eucgr.A02644	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	2,21	-
	Eucgr.A01598	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,96	-
	Eucgr.H02600	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,61	-
	Eucgr.C01027	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,57	-
	Eucgr.J00951	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,34	-
	Eucgr.F02563	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,28	-
	Eucgr.I01203	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,10	-
	Eucgr.J03005	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	2,76	1,41
	Eucgr.A00518	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-1,00	-
	Eucgr.B02658	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-1,33	-
	Eucgr.L00350	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-1,41	-
	Eucgr.K02978	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	1,02
	Eucgr.I01191	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	1,34
Eucgr.K02429	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	1,19	
<b>Peroxidases (possíveis PR-9)</b>	Eucgr.J01616	Peroxidase superfamily protein	-	4,49
	Eucgr.H03915	Peroxidase superfamily protein	2,94	-
	Eucgr.H03910	Peroxidase superfamily protein	2,38	-
	Eucgr.A00966	Peroxidase superfamily protein	1,71	-
	Eucgr.B03091	Peroxidase superfamily protein	-1,19	-

	Eucgr.G02397	Peroxidase superfamily protein	-1,86	-
	Eucgr.G01642	Peroxidase superfamily protein	-2,08	-
	Eucgr.I01176	Peroxidase superfamily protein	-	-2,42
<b>Flavina monooxygenases (FMO)</b>	Eucgr.C03288	Flavin-dependent monooxygenase 1	3,95	-
	Eucgr.G01845	Flavin-dependent monooxygenase 1	1,06	-
	Eucgr.D02484	Flavin-binding monooxygenase family protein	1,85	-
	Eucgr.G00316	Flavin-containing monooxygenase family protein	1,04	-

Os genes induzidos (*up-regulated*) e os reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

Numerosos genes de proteínas relacionadas com a patogenicidade (PR; *Pathogenesis Related*) exibiram valores particularmente elevados na sua expressão, principalmente no *pool* R às 12 hai (Tabela 7). Enquanto no *pool* R foram identificados três genes PR-1, dois PR-4 (quitinases), dois PR-5 (proteínas com domínio taumatina), cinco possíveis PR-9 (peroxidases) e 30 genes PR-10 (proteína principal do *latex/major latex like protein*-MLP), com aumentos transcricionais, no *pool* S somente um gene PR-5, um possível PR-9 e um gene PR-10 foram induzidos após invasão do patógeno. Além disso, particularmente, um gene PR-9 (Eucgr.I01176) e um PR-10 (Eucgr.A00162) foram reprimidos unicamente no *pool* S (Tabela 7).

Outros genes de defesa como quitinases, genes relacionados com a biossíntese de compostos fenólicos e fortalecimento da parede celular como a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), a glicoproteína rica em hidroxiprolina abundantes de embriogênese tardia (LEA) implicada na resposta ao estresse hídrico, entre outros, foram diferencialmente expressos em plantas de *Eucalyptus* spp. inoculadas como o fungo (Tabela 7). Onze genes codificadores de quitinases foram induzidos em plantas do *pool* R e só quatro no *pool* S, no qual também quatro genes quitinases foram reprimidos. No que se refere à PAL, quatro genes foram induzidos no *pool* R e nenhum no *pool* S. Genes LEA estiveram entre os mais representativos no *pool* R, sendo encontrados 19 genes induzidos e um reprimido, enquanto no *pool* S somente um gene LEA foi induzido e outro reprimido (Tabela 7).

Outros genes relacionados à biossíntese de parede celular, como xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH), e ao metabolismo como componentes do complexo Acetil coenzima A carboxilase, ACC synthase 1, hydroxy methylglutaryl CoA reductase 1, acyl-CoA sterol acyl transferase 1, Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) *superfamily protein*, hexokinase 2 também foram diferencialmente expressos em plantas de *Eucalyptus* em resposta à infecção de *C. fimbriata*. De modo geral, genes relacionados com a defesa contra patógenos foram reprimidos principalmente às 12 hai no *pool* de plantas R; entre esses, genes de proteínas PRs (proteínas MLP, receptores tipo quinases e genes de proteínas com domínio TIR-NBS-LRR, entre outras), peroxidases, fatores de transcrição (WRKY, bHLH NAC,

PLATZ, AP2B3, TCP), glutathione S-transferase, genes relacionados com a biossíntese de parede celular (Xyloglucan endotransglucosylase), sinalização hormonal (lipoxigenases, giberelina), proteínas com repetições ricas em leucina, entre outros.

**Tabela 7** - Genes relacionados à patogenicidade (PRs) e outros genes de defesa cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 12 hai

Família Gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R	Pool S
<b>PR-1</b>	Eucgr.L02505	Pathogenesis-related gene 1	3,83	-
	Eucgr.G01134	Pathogenesis-related gene 1	2,80	-
	Eucgr.L01707	Pathogenesis-related gene 1	1,67	-
<b>PR-4</b>	Eucgr.B02124	Pathogenesis-related 4	1,22	-
	Eucgr.L03258	Pathogenesis-related 4	1,14	-
<b>PR-5</b>	Eucgr.E01382	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	1,47	-
	Eucgr.E01384	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	1,17	-
	Eucgr.E01385	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	-	1,25
<b>PR-10</b>	Eucgr.H03994	MLP-like protein 423	3,61	-
	Eucgr.H03995	MLP-like protein 423	3,41	-
	Eucgr.H04000	MLP-like protein 423	2,96	-
	Eucgr.H04009	MLP-like protein 423	2,85	-
	Eucgr.L02480	MLP-like protein 423	2,79	-
	Eucgr.H03993	MLP-like protein 423	2,50	-
	Eucgr.H03988	MLP-like protein 423	2,34	-
	Eucgr.H04019	MLP-like protein 423	2,32	-
	Eucgr.H03997	MLP-like protein 423	2,29	-
	Eucgr.H03987	MLP-like protein 423	2,22	-
	Eucgr.I00894	MLP-like protein 423	1,94	-
	Eucgr.I00900	MLP-like protein 423	1,93	-
	Eucgr.A00125	MLP-like protein 423	1,77	-
	Eucgr.I00902	MLP-like protein 423	1,76	-
	Eucgr.H04012	MLP-like protein 423	1,73	-
	Eucgr.H03990	MLP-like protein 423	1,68	-
	Eucgr.I00897	MLP-like protein 423	1,67	-
	Eucgr.H04017	MLP-like protein 423	1,66	-
	Eucgr.H03989	MLP-like protein 423	1,66	-
	Eucgr.H04018	MLP-like protein 423	1,55	-
Eucgr.A00141	MLP-like protein 423	1,54	-	

	Eucgr.I00898	MLP-like protein 423	1,54	-
	Eucgr.H04003	MLP-like protein 423	1,53	-
	Eucgr.H04001	MLP-like protein 423	1,51	-
	Eucgr.H04016	MLP-like protein 423	1,50	-
	Eucgr.H04007	MLP-like protein 423	1,35	-
	Eucgr.H04002	MLP-like protein 423	1,20	-
	Eucgr.H03998	MLP-like protein 423	1,19	-
	Eucgr.A00162	MLP-like protein 423	1,13	-1,72
	Eucgr.A00133	MLP-like protein 423	1,06	-
	Eucgr.B02546	MLP-like protein 423	-1,67	-
	Eucgr.I00896	MLP-like protein 423	-	1,14
	Eucgr.C02416	Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 proteinn	-	2,81
	Eucgr.C02418	Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein	-	1,77
	Eucgr.C00383	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	1,67	-
	Eucgr.C00393	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	2,36	-
	Eucgr.C00395	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	1,86	-
	Eucgr.L01120	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	1,76	-
	Eucgr.C04060	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	1,53	-
	Eucgr.L00615	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	1,08	-
	Eucgr.L02946	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	1,88	1,56
<b>Quitinases</b>	Eucgr.A00020	Homolog of carrot EP3-3 chitinase	1,42	-
	Eucgr.A00021	Homolog of carrot EP3-3 chitinase	1,19	1,35
	Eucgr.H00324	Homolog of carrot EP3-3 chitinase	1,71	-
	Eucgr.K02166	Homolog of carrot EP3-3 chitinase	1,48	-
	Eucgr.I02246	Basic chitinase	-	-3,94
	Eucgr.I02267	Basic chitinase	-	-5,81
	Eucgr.I02271	Basic chitinase	-2,61	-5,50
	Eucgr.K00308	Chitinase A	-	-1,32
	Eucgr.G02849	Phenylalanine ammonia-lyase 2	2,22	-
<b>Fenilalanina amônia-liase (PAL)</b>	Eucgr.G02850	Phenylalanine ammonia-lyase 2	1,03	-
	Eucgr.G02851	Phenylalanine ammonia-lyase 2	1,53	-
	Eucgr.G02852	Phenylalanine ammonia-lyase 2	1,04	-
	Eucgr.J02114	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2,72	-
<b>Glicoproteína rica em hidroxiprolina abundantes de embriogênese tardia (LEA)</b>	Eucgr.B03782	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2,42	-
	Eucgr.J02116	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2,30	-
	Eucgr.L02847	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2,16	-
	Eucgr.E00792	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2,07	-
	Eucgr.D01804	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,79	-

Eucgr.E00798	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,75	-
Eucgr.E00793	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,62	-
Eucgr.J02119	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,51	-
Eucgr.E00794	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,44	-
Eucgr.J02115	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,40	-
Eucgr.E00791	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,37	-
Eucgr.E00795	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,34	-
Eucgr.J02117	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,34	-
Eucgr.E00788	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,22	-
Eucgr.F02922	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,15	-
Eucgr.L02846	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,11	-
Eucgr.E00796	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,04	-
Eucgr.E00095	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,07	1,18
Eucgr.L03111	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-2,17
Eucgr.H02278	Late embryogenesis abundant protein, group 6	-1,51	-

Os genes induzidos (up-regulated) e os reprimidos (down-regulated) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

## DISCUSSÃO

As análises da expressão gênica de interações planta-patógeno são de grande relevância para o entendimento da base molecular de doenças específicas (Wise et al., 2007; Teixeira et al., 2014). Neste trabalho foi quantificado e analisado o transcriptoma de plantas de *Eucalyptus* durante o processo de infecção de *C. fimbriata* por meio de RNAseq, nos estágios iniciais da interação, ampliando consideravelmente o entendimento atual sobre a resistência à murcha-de-Ceratocystis e contribuindo para a compreensão geral da interação planta-patógeno.

Nesta pesquisa foi possível mapear um total de 39.427 transcritos contra o arquivo "Egrandis\_201\_v1.1.cds.fa" de sequências codificantes (46.315 sequências), dos quais 3.170 corresponderam a "TCONS", que podem ser considerados como *novos transcritos*, variantes de splicing, erros durante o alinhamento ou o sequenciamento encontrados pelo *pipeline* Tophat-Cufflinks-Cuffmerge-Cuffcompare, utilizado nas análises de bioinformática. Além dos genes conhecidos e anotados em bancos de dados atuais, muitos novos transcritos (especialmente aqueles RNAs longos não codificadores) estão faltando nos genomas de referência atuais. Esses novos transcritos podem ser identificados por meio da reconstrução de transcriptomas por RNA-seq, podendo-se melhorar a anotação de variantes genéticas (Chen et al., 2016). Assim, uma das vantagens do sequenciamento de transcriptomas por RNASeq é a identificação de novos transcritos (Denoëud et al., 2008; Trapnell et al., 2010; Roberts et al., 2011; Wang, 2016.). Os novos possíveis transcritos identificados nesta pesquisa servem como ferramenta para ajudar a melhorar o genoma disponível de *E. grandis* por complementação da informação de genes que podem estar faltando nesse genoma.

Nas análises de enriquecimento de termos GO, foi observado que plantas de *Eucalyptus* do *pool* R à murcha-de-Ceratocystis apresentaram vias de respostas de defesa, resposta a estímulo biótico e resposta a estresse mais bem representadas quando comparadas com as plantas do *pool* S. Além disso, nessas últimas plantas o estresse oxidativo não foi

representado. Durante o estresse oxidativo, a exposição contínua a espécies reativas de oxigênio (EROs) cria um ambiente que afeta a homeostase redox da célula (Alscher, 1997; Chiu & Dawes, 2012). Plantas de *Eucalyptus* resistentes à murcha-de-Ceratocystis são mais eficientes na ativação de resposta de defesas contra *C. fimbriata* que plantas suscetíveis, nas quais o efeito da doença é maior pela ausência de uma resposta ao estresse oxidativo.

Os “processos de proteólises”, “biosintéticos” e “processos metabólicos de lipídeos” estiveram bem representados durante a resposta de defesa na interação. Quando aminoácidos livres, peptídeos e proteínas estão presentes em altas concentrações, eles podem contribuir para a desintoxicação de EROs (Dröge, 2002). Além disso, quando há deficiência de carbono durante o estresse, existe uma forte demanda de esqueletos carbonados a partir de aminoácidos, com o objetivo de suplementar o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, havendo produção de amidas, aminoácidos e cetoácidos (Mifflin & Habash, 2002). Durante a resposta de defesa à murcha-de-Ceratocystis, plantas de *Eucalyptus* ativam genes que codificam enzimas relevantes no metabolismo de proteínas e lipídeos para providenciar compostos necessários para produção de energia e para mitigar o estresse oxidativo.

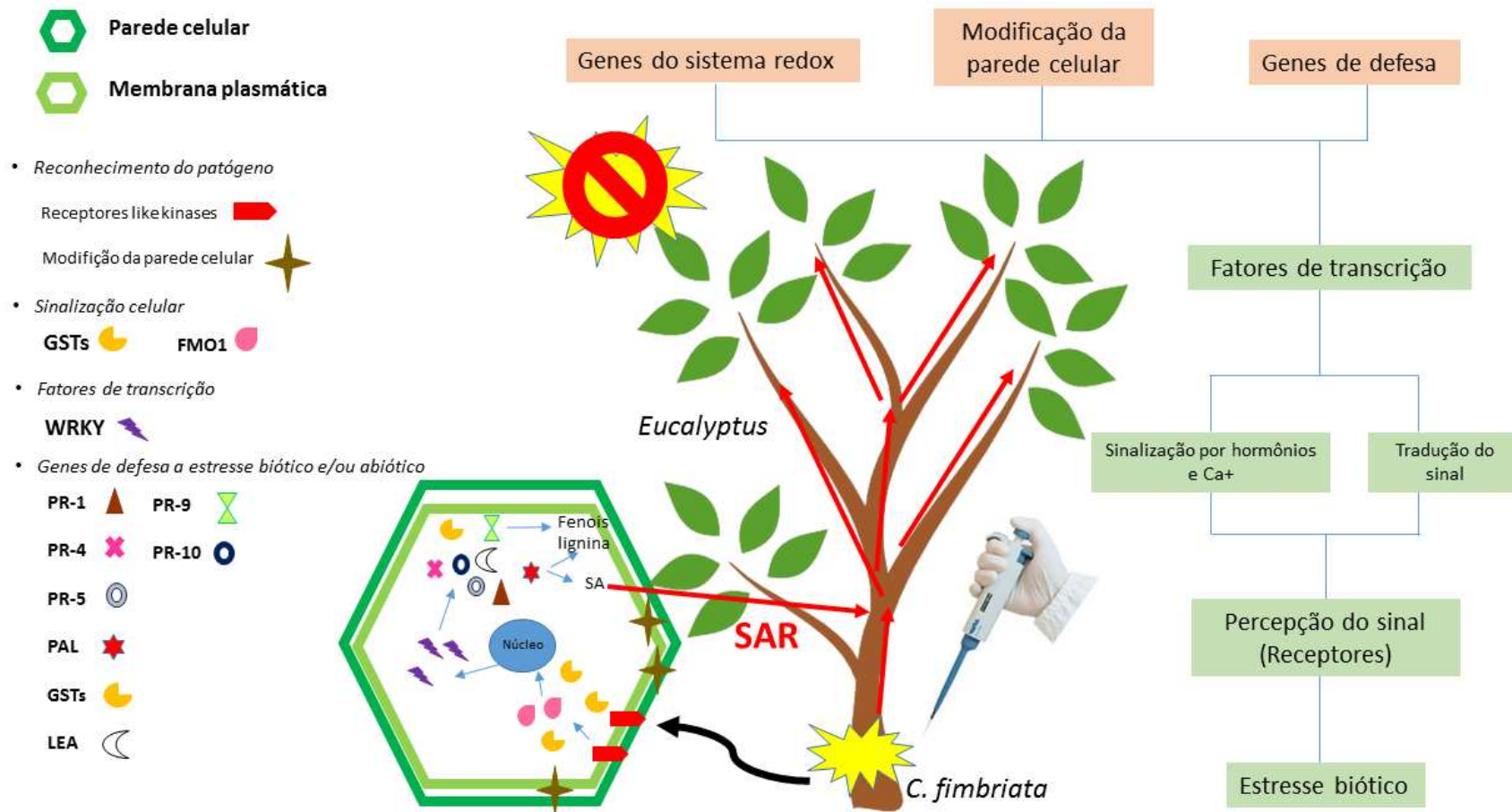
A resposta de defesa a fatores biótico e abiótico envolve a participação de receptores transmembranares que iniciam a transdução de sinais em cascata, proteínas quinases, fatores de transcrição, entre outros. Em *Eucalyptus*, *Ceratocystis fimbriata* alterou a expressão de genes de resposta ao estresse que participam em todas as etapas desse processo, desde receptores de reconhecimento do patógeno até genes que atuam na formação da parede celular, fatores de transcrição, genes da sinalização hormonal, genes da homeostase redox, entre outros. Foi observada uma nítida diferença entre os *pools* S e R de plantas de *Eucalyptus* inoculadas com *C. fimbriata* no padrão de expressão dos genes relacionados com a defesa. Desta maneira, nas plantas resistentes existem mecanismos de defesas constitutivos e outros que são ativados após o reconhecimento do patógeno. Entre os últimos estão a indução dos receptores tipo quinases e

fatores de transcrição que ativam uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos, resultando na expressão dos genes de defesa. Um esquema geral da resposta dessas plantas ao estresse biótico causado por *C. fimbriata* é apresentado na Figura 10.

Diferentes mecanismos são utilizados pelos hospedeiros durante as respostas de defesa, e o tempo e o grau em que esses mecanismos são ativados podem determinar o resultado da interação entre a planta e o agente patogénico (Tao et al., 2003). As plantas que compõem o *pool* R possuem uma resposta mais rápida ao ataque de *C. fimbriata*, o que foi inferido pelo maior número de genes relacionados com a defesa que foram induzidos às 12 hai, fazendo com que as plantas resistentes tenham a capacidade de inibir a colonização dos tecidos e, conseqüentemente, o progresso da doença. No que se refere às plantas do *pool* S, vários desses genes foram induzidos, no entanto essa indução aconteceu nas fases tardias da interação, o que provavelmente fez com que essas plantas não fossem eficazes no reconhecimento do patógeno, retardando assim a indução da expressão de genes de defesa e, conseqüentemente, não sendo suficiente para limitar a colonização. A ativação da transcrição tardia de genes nessas plantas pode ter refletido no geral, resultando em respostas incapazes de impedir o patógeno de completar o seu ciclo de vida como relatado para míldio (Li et al 2006; Huibers et al. 2009; Hok et al., 2011). Deste modo, o fenótipo de suscetibilidade à murcha-de-Ceratocystis em *Eucalyptus* pode ser atribuído à ausência, à baixa expressão ou à ativação retardada de genes necessários para bloquear o progresso de *C. fimbriata*.

A simultânea ativação e repressão de genes em interações planta-patógeno tem sido previamente relatada (Postel et al., 2010; Hok et al., 2011). Também tem sido evidenciada a inibição do sistema imunológico das plantas pelos agentes patogénicos durante o início da infecção (Dodds et al., 2009; Torto-Alalibo et al., 2009; Kelley et al., 2010). *Ceratocystis fimbriata* colonizou tecidos de plantas de *Eucalyptus* resistentes nas primeiras horas da interação, sem ter êxito no progresso da doença, como observado no trabalho de histopatologia (Capítulo 1). Pode-se hipotetizar que a repressão de alguns genes nessas plantas durante as primeiras horas da interação foi

resultado de uma inibição por parte do patógeno, na tentativa de colonizar tecidos e se desenvolver com êxito no hospedeiro.



**Figura 10** - Representação esquemática geral da resposta de defesa de *Eucalyptus* spp. contra *Ceratocystis fimbriata*. \* Os genes representados no esquema apresentaram indução na expressão gênica no hospedeiro durante a interação.

## Genes de receptores tipo quinases e genes de sinalização de cálcio

Durante a resposta ao estresse nas plantas, primeiramente acontece uma percepção do sinal e, em seguida, a retransmissão desse sinal no interior da célula leva a uma resposta celular de defesa (Tena et al., 2001; Yoo & Sheen, 2008). As proteínas quinases exercem um papel importante nessa sinalização após o reconhecimento de patógenos, levando à ativação dos mecanismos de defesa (Ding et al., 2009). Os receptores de membrana tipo quinase com repetições ricas em leucina (LRR-RLK) são reguladores-chave durante a interação com micro-organismos, dirigindo a resposta imune nas plantas (Wang et al., 1998; Zipfel et al., 2004, 2006; Chinchilla et al., 2007). Um número maior de RLKs foi induzido em plantas de *Eucalyptus* do *pool* R nas primeiras horas da interação com *C. fimbriata*, quando comparadas com as plantas do *pool* S. Esse resultado evidencia que as plantas do *pool* R são capazes de reconhecer o patógeno e ativar mecanismos de transdução de sinais mais rápido do que as plantas do *pool* S. A resistência a patógenos como *Fusarium oxysporum* em *A. thaliana* também foi atribuída à superexpressão de receptores tipo quinases (Berrocal-Lobo & Molina, 2008).

No *pool* S de plantas de *Eucalyptus* oito genes RLKs foram reprimidos às 12 h de contato com *C. fimbriata*, e estes genes não foram diferencialmente expressos no *pool* R. Nas regiões promotoras de algumas famílias de genes relacionados com a defesa nas plantas possuem sítios de ligação de FTs como o motivo *W-box* aos quais ligam-se WRKY (Eulgem et al., 2000), que são FTs que regulam a expressão de genes negativa ou positivamente e são envolvidos tanto na resistência como na suscetibilidade (Yu et al., 2001; Journot-Catalino et al., 2006; Knoth et al., 2007; Pandey & Somssich, 2009). O conjunto de genes LRR-RLK expressos durante várias interações planta-patógeno é conhecido por possuir motivos *W-box* em seus promotores (Postel et al., 2010; Hok et al., 2011). É possível que genes RLKs em plantas do *pool* S possuem motivos *W-box* que permitem a ligação de WRKYs, que os estão regulando negativamente, fazendo com que essas plantas sejam deficientes no reconhecimento do patógeno ou em ativarem a

resposta de defesa, tornando-as assim suscetíveis à murcha-de-Ceratocystis.

Além dos mensageiros conhecidos que participam na comunicação célula a célula em plantas, como os sinais elétricos, as moléculas de RNA, o metil salicilato (MeSa), o metil jasmonato (MeJa), o ácido salicílico (AS), o ácido jasmônico (AJ), as auxinas, o ácido abscísico (ABA), os EROs, entre outros, recentemente foi encontrada uma relação entre a propagação sistêmica do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e os EROs que permite que células vegetais transmitam sinais de longa distância (Szechynska-Hebda et al., 2010; Klessig et al., 2012; Spoel & Dong, 2012; Shah & Zeier, 2013; Gilroy et al., 2014; Choi et al., 2014; Mittler & Blumwald, 2015). Consequentemente, os sinais de cálcio também são reguladores centrais das respostas celulares a estímulos ambientais nas plantas (Tuteja & Mahajan, 2007; Vadassery et al., 2012). Vários genes relacionados com a sinalização dependente do cálcio foram diferencialmente expressos na interação *C. fimbriata* – *Eucalyptus* spp. A maioria desses genes foi induzida às 12 hai em plantas do *pool* R, quando comparadas com plantas do *pool* S, que apresentaram menor número desses genes diferencialmente expressos. A descoberta de componentes dessa via em plantas resistentes de *Eucalyptus* a *C. fimbriata* indica que essas plantas podem usar esse tipo de sinalização para ativar genes de defesa em resposta ao fungo.

### **Fatores de transcrição**

Após a percepção do sinal, as plantas ativam vários fatores de transcrição (FTs) que participam na ativação da expressão de genes de resposta ao estresse biótico e abiótico (Dietz et al., 2010; Seo & Park, 2010; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2010; Cheng et al., 2011). No geral, plantas de *Eucalyptus* do *pool* R tiveram maior número de FTs de várias famílias gênicas relacionadas com a defesa que foram induzidos rapidamente após o contato com *C. fimbriata*, quando comparadas com plantas do *pool* S. Outros FTs foram reprimidos às 12 hai, em ambos os *pools*. Uma modulação coordenada de fatores atuando positiva e negativamente pode permitir

amplitude e duração adequadas da resposta da planta durante o ataque de patógenos (Pandey & Somssich, 2009).

Dos FT identificados neste trabalho, os genes *WRKY* estiveram entre os mais representativos. Esses FTs estão envolvidos na reprogramação transcricional da resposta ao ataque de fitopatógenos, participando na regulação da expressão de genes de defesa como PRs e genes FTs da mesma ou de outras famílias gênicas, regulando-os negativa ou positivamente (Yu et al., 2001; Eulgem, 2005; Ryu et al., 2006; Naoumkina et al., 2008; Pandey & Somssich, 2009). A indução de genes *WRKY* durante a ativação de respostas de defesa em planta é conservada entre diferentes espécies (Dong et al., 2003). Constatou-se a indução dessas proteínas em plantas de tabaco resistentes após a infecção do vírus do mosaico (TMV, *tobacco mosaic virus*) ou em plantas tratadas com ácido salicílico (AS) (Wang et al., 1998; Yang et al., 1999). Em *Arabidopsis*, muitos desses genes foram induzidos após infecção com agentes patogênicos como *P. syringae* ou tratada com AS, o que indica que a principal função dessa superfamília de genes é a regulação de genes associados à resposta de defesa (Dong et al., 2003). Os genes *WRKY* também estão envolvidos na resistência a patógenos como *Botrytis cinerea*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Pythium sylvaticum* (Zheng et al., 2006; Lippok et al., 2007; Birkenbihl et al., 2012). Em plantas de *E. urophylla* × *E. tereticornis*, um gene *WRKY* foi significativamente induzido em plantas resistentes e reprimido em plantas suscetíveis a *Calonectria* (Chen et al., 2015). Dos genes *WRKY* encontrados neste trabalho, destacou-se o *WRKY72* (Eucgr.K02453), sendo o mais induzido em resposta a *C. fimbriata*. Em *A. thaliana*, um gene homólogo *AtWRKY72* não apresentou mudanças na sua transcrição após a infecção com *P. syringae* ou tratamento com AS (Dong et al., 2003). Possivelmente o gene *WRKY72*, identificado nesta pesquisa, tenha uma função específica na resposta de defesa a *C. fimbriata* ou a fungos em geral.

Os genes *WRKY* também atuam como reguladores negativos da sinalização durante a defesa (Journot-Catalino et al., 2006; Kim et al., 2006; 2008), e a superexpressão desses genes resulta em incremento da

suscetibilidade a patógenos, possivelmente pela regulação negativa da resposta de defesa mediada por AS (Pandey & Somssich, 2009). Talvez a indução de genes *WRKY* no *pool* S após a infecção de *C. fimbriata* influencie negativamente a resposta de defesa nessas plantas por meio do direcionamento ativo dos genes/fatores ou produtos sob seu controle, desencadeado pelo patógeno mediante a manipulação dessas proteínas por efetores.

Outra família de genes FTs que foram afetados por *C. fimbriata* e induzidos maioritariamente no *pool* R às 12 hai foi a *APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF)*, relacionada com a resposta a estímulos abióticos e bióticos, como a infecção de patógenos (Licausi et al., 2013). As proteínas ERFs regulam a biossíntese de etileno (ET) e ativam a transcrição de genes relacionados com a defesa, como genes PRs, quitinase, entre outros (Zhang et al, 2009; Li et al., 2011; Licausi et al., 2013). Vários genes *ERF* estão envolvidos na resistência a patógenos, como o gene *ERF1* e seus homólogos em *A. thaliana* (Lorenzo et al, 2003; Zarei et al, 2011; Moffat et al., 2012); o gene *OPBP1* de tabaco, que aumenta a resistência a patógenos quando é expresso em plantas de arroz transgênicas (Chen & Guo, 2008); o *RAP2.2* de *Arabidopsis*, que desempenha um papel na resistência a *B. cinerea* (Zhao et al., 2012); e o gene *OsERF922* de arroz, que regula negativamente a resistência a *Magnaporthe oryzae* (Liu et al., 2012).

Os genes *AP2 Redox Responsive Transcription Factor1 (RRTF1)* e o fator de ligação à repetição-C 4 (*CBF4*) destacaram-se por terem tido aumento nas suas expressões no início da interação somente no *pool* R. É sabido que os genes *RRTF1* sofrem aumento transcricional em resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos e que eles possuem função na resposta de defesa de plantas ao estimular o acúmulo de EROs (Foyer et al., 2014; Matsuo et al., 2014). Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, acredita-se que a expressão dos genes *AP2/ERF* é aumentada em *Eucalyptus* com o objetivo de ativar a transcrição de genes de defesa necessários para atingir uma resposta de defesa eficaz contra *C. fimbriata*. A

expressão de genes *RRTF1* exclusivamente em plantas do *pool* R pode estar relacionada com o acúmulo de moléculas EROs.

Os genes *CBF* são comumente conhecidos como genes de resposta ao estresse abiótico ocasionado por frio, sal, desidratação, entre outros (Novillo et al., 2012; Shi et al., 2014). Nesta pesquisa constatou-se o aumento de até 4,24 vezes de um gene *CBF4* (Eucgr.A02818) às 12 hai exclusivamente no *pool* R. Em *Arabidopsis* os genes *CBF1*, *CBF2* e *CBF3* desempenham papel-chave na resposta ao frio, ao sal e à seca (Novillo et al., 2012). Provavelmente o gene *CBF4* observado nesta pesquisa foi induzido como resposta ao estresse por déficit hídrico, ocasionado pelo bloqueio dos vasos pelas estruturas do fungo, o que dificulta a passagem de água. Outra possível hipótese é que a indução desse gene esteja diretamente relacionada com o estímulo biótico produzido pelo patógeno, e não só como resposta ao estímulo abiótico, como relatado na literatura. Estudos mais detalhados sobre a função de genes *CBF* em *Eucalyptus* são necessários para confirmar se esse gene tem função direta ou indireta na resposta de defesa a *C. fimbriata*.

### **Vias de sinalização hormonal induzidas pelo estresse**

Os hormônios vegetais desempenham papéis importantes na defesa ao estresse biótico e abiótico. Destes, o ácido abscísico (ABA) e o etileno (ET) são conhecidos por suas funções na defesa ao estresse abiótico, enquanto o ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (AJ) são fundamentais na defesa ao estresse biótico (Ecker, 1995; Wasternack, 2007; Ren et al., 2012; Danquah et al., 2014). Além desses hormônios, as auxinas, ou ácido indolacético (IAA), também estão envolvidas na resposta de defesa de plantas contra patógenos (Iglesias et al., 2011; Jung & Park, 2011). Nesta pesquisa, às 12 hai de *C. fimbriata*, 14 genes relacionados com auxinas tiveram suas expressões induzidas no *pool* de plantas R, e só três no *pool* S. Desses genes, dois *Gretchen Hagen 3 (GH3)* e 11 *GST* foram induzidos no primeiro *pool*. As proteínas GH3 modulam a homeostase de auxina e AJ, reguladores da expressão gênica, participando assim das respostas de

defesa de plantas contra organismos patogênicos (Hagen & Guilfoyle 1984; Park et al., 2007; Čarná et al., 2014). GSTs são enzimas multifuncionais que reduzem hidroperóxidos orgânicos para álcoois mono-hidroxilo menos tóxicos (Sandermann, 1992; Kilili et al., 2004; Jo et al., 2011). Essas enzimas participam na tolerância ao estresse biótico e abiótico por meio da sinalização hormonal, proveem proteção contra estresse oxidativo e apresentam também atividade peroxidase (Ulmasov et al., 1995; Adler et al., 1999; Cummins et al., 1999; Roxas et al., 2000; Cumming et al., 2001; Sheehan et al., 2001; Cho et al., 2001; Frova, 2003; Jo et al., 2011; Kilili et al., 2004).

Pesquisas prévias demonstraram que mutantes de *Arabidopsis* deficientes no transporte de auxinas são altamente suscetíveis a *Phytophthora cinnamomi* (Eshraghi et al., 2014). Também tem sido relatado que infecções por patógeno aumentam significativamente os níveis de IAA endógena e que a expressão de alguns genes regulados por auxina é induzida, entre estes os genes das famílias: *Small Auxin Up RNA* (SAUR), *AUX/IAA* e GH3 (Guilfoyle, 1999; Hagen & Guilfoyle, 2002; Čarná et al., 2014). Só um gene GST foi identificado como induzido em plantas de *Eucalyptus* infectadas com *Calonectria pseudoreteaudii*, em uma pesquisa realizada por Chen et al. (2015). Similarmente, em *Arabidopsis* só um gene GST foi induzido por vários estímulos como auxina, ácido salicílico, patógenos e herbicidas (Smith et al., 2003). A indução de um maior número de genes relacionados com auxinas em plantas resistentes de *Eucalyptus* inoculadas com *C. fimbriata* indica que o eucalipto utiliza a via das auxinas para se defender contra esse patógeno.

Vários genes relacionados com auxinas foram reprimidos unicamente no *pool* S às 12 hai, por exemplo, dois genes *SAUR*, um *GST* e dois genes *Dormancy/auxin associated*. Previamente foi relatada a relação de proteínas *Dormancy/auxin associated* com a resposta a condições ambientais adversas ocasionadas por fatores bióticos ou abióticos (Rae et al., 2014). Um gene *dormancy/auxin associated* foi relacionado com a resposta ao estresse ocasionado por *P. cinnamomi* em *Persea americana* (Mahomed & Van den Berg, 2011). Em plantas transgênicas de tabaco que sofreram

suplantação da resistência pelo vírus do mosaico (TMV – *Tomato Mosaic Virus*), oito genes relacionados com *dormancy/auxin associated*, auxinas, SAUR e LEA foram reprimidos (Jada et al., 2014). A repressão dos genes descritos pode estar contribuindo para o fenótipo de suscetibilidade à murcha-de-Ceratocystis em *Eucalyptus*. Análises mais detalhadas precisam ser feitas para conhecer o papel desses genes e de suas proteínas sob condições ambientais prejudiciais, como a doença causada por *C. fimbriata*.

Os genes codificadores das enzimas ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) sintase (ACS) e a ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) oxidase (ACO), também envolvidas na sinalização hormonal, foram induzidos em *Eucalyptus* após inoculação com *C. fimbriata*. Essas enzimas são fundamentais na biossíntese do ET pela glutathione (GSH), modulando a transcrição e a regulação pós-transcricional em resposta ao ataque de patógenos, ativando-se vários processos importantes para a defesa, como a sinalização, a produção de fitoalexinas, a indução da via dos fenilpropanoides e o reforço da parede celular (Bell, 1981; Chappell et al., 1984; Fan et al., 2000; Van de Poel B & Van Der Straeten, 2014; Datta et al., 2015). A indução desses genes principalmente em plantas resistentes indica que, como as auxinas, o etileno participa na resposta de defesa à murcha-de-Ceratocystis em *Eucalyptus*.

Os dados de RNASeq encontrados neste trabalho mostraram que plantas do *pool* R apresentaram um número maior de genes *UDP-glucosyltransferases* (GTF) induzidos às 12 hai, quando comparado com plantas do *pool* S, no qual vários desses genes foram reprimidos. Além disso, dois genes *GTF 73B4* (Eucgr.E02950 e Eucgr.I01116) foram induzidos unicamente no *pool* R. As proteínas GTF têm função no metabolismo dos fenilpropanoides, participam na glicosilação de flavonoides e de ácidos fenólicos, via essencial no desenvolvimento e na defesa das plantas contra patógenos (Mazel & Levine, 2002; Nishimura et al., 2003; Poppenberger et al., 2003; Langlois-Meurinne et al., 2005; Fraser & Chapple, 2011; Langenbach et al., 2013). Os glicosídeos desempenham várias funções em células vegetais: participam na sinalização, na biossíntese de parede celular, no armazenamento de energia e nas interações

intercelulares ou patógeno-hospedeiro (Bowles et al., 2005; Coutinho et al., 2003; Wang & Hou, 2009; Ostrowski & Jakubowska, 2014). Chen et al. (2015) relataram que a expressão do gene *GTF 73B4* (Eucgr.E02950) também foi fortemente induzida em plantas de *E. urophylla* x *E. tereticornis* em resposta a *Calonectria pseudoreteauidii*.

### **Sistema redox**

As condições de estresse, como a infecção de patógenos, podem perturbar a homeostase das células, aumentando a produção de EROs (Mittler, 2002). Essas alterações no estado redox das células ativam a sinalização redox para induzir respostas de proteção contra o dano oxidativo, com a intenção de restaurar o status original de homeostase depois de uma exposição temporal a EROs (Dröge, 2002, Hung et al., 2005). Desta forma, embora as altas concentrações de EROs possam afetar negativamente as plantas, alterações no estado redox desempenham um papel vital nas vias de sinalização que regulam a divisão celular e a resposta ao estresse (Mou et al., 2003; Schlaich, 2007; Chiu & Dawes, 2012; Das et al., 2015).

Vários genes relacionados com o sistema redox foram diferencialmente expressos no transcriptoma de *Eucalyptus* spp., em resposta à infecção de *C. fimbriata*. Tem sido relatado que durante a resposta de defesa das plantas a patógenos necrotróficos ocorre um desbalanço na homeostase redox que leva à destruição das células, promovido pela geração de EROs (Buchanan et al., 2000). A concentração elevada dessas moléculas induz a expressão de genes codificadores de proteínas com atividade antioxidante envolvidas em várias vias do sistema redox, favorecendo o aumento da glutathiona intracelular, mantendo assim a homeostase redox para proteger as células do dano oxidativo (Cuypers et al., 2001; Dröge, 2002; Mittler et al., 2004; Pérez-Ruiz et al., 2006).

Uma grande quantidade de genes relacionados com o citocromo P450 (CYP450) foi induzida principalmente em plantas de *Eucalyptus* resistentes, às 12 hai. CYP são um grupo de proteínas redox que catalisam várias reações oxidativas (Isin & Guengerich, 2007). Essas proteínas

desempenham papel importante na defesa de plantas, por meio da sua participação na resposta de hipersensibilidade e na síntese de terpenoides, lignina, pigmentos, ácidos gordos, fitolexinas e fenilpropanoides, e como moléculas de sinalização em todas as espécies de plantas (Durst & O'Keefe, 1995; Chou & Kutchan, 1998; Persans et al., 2001; Werck-Reichhart et al., 2002; Nielsen & Moller, 2005; Chen et al., 2013). As análises de expressão gênica têm revelado que genes CYP são estritamente regulados em resposta a fitohormônios (AS, AJ, ET e ABA), patógenos necrotróficos e vários estresses abióticos (Narusaka et al., 2004). Por exemplo, em plantas de *E. urophylla* x *E. tereticornis* foram induzidos genes CYP em resposta a *C. pseudoreteaudii*, e o gene *CYP736B* está envolvido na resposta de defesa a *Xylella fastidiosa* em videiras (Cheng et al., 2010; Chen et al., 2015). A indução de genes *CYP450* no transcriptoma analisado nesta pesquisa evidencia que a síntese dessas proteínas em eucalipto foi aumentada após a infecção de *C. fimbriata*, motivando a resistência a esse patógeno.

Outros genes do sistema redox identificados foram genes codificadores de GSTs e POXs. A GSTs é uma enzima necessária no metabolismo de xenobióticos que utiliza como cofator a glutathiona (GSH), que é um antioxidante não enzimático hidrossolúvel (Sandermann, 1992; Jo et al., 2011). As POXs também atuam como antioxidantes enzimáticos, ajudando na regulação de EROs (Chaudière & Ferrari-iliou, 1999; Sun et al., 2014). Além disso, essas últimas enzimas participam no catabolismo de auxinas e em processos de síntese de parede celular, como a oxidação de fenóis, suberização e lignificação em plantas hospedeiras durante a reação de defesa contra patógenos (Syros et al., 2004). O aumento de POXs tem sido correlacionado com mecanismos de resistência em um grande número de interações plantas-micro-organismos, devendo ser ressaltado que a sobre-expressão dessas proteínas aumenta a resistência e o seu silenciamento resulta em incremento da suscetibilidade (Mohammadi & Kazemi, 2002; Chen et al., 2015). As plantas de *Eucalyptus* resistentes à murcha-de-Ceratocystis possuem a capacidade de ativar a transcrição de genes GSTs e POXs durante o estresse oxidativo gerado na resposta de

defesa a *C. fimbriata*, possivelmente auxiliando na proteção das células contra o dano oxidativo e no reforço da parede celular.

Os genes de *Flavina monooxigenases* ou monooxigenases dependentes de flavina (*flavin containing monooxygenases* - FMOs) também foram induzidos às 12 hai unicamente em plantas do *pool* R. Essas enzimas podem catalisar passos específicos na biossíntese de auxina e no metabolismo de glucosinolatos e possuem ainda papel na defesa contra patógenos (Olszak et al., 2006; Schlaich, 2007). A reprogramação transcricional de genes relacionados com SAR em *Arabidopsis* é dependente da *FMO1*, e aumentos transcricionais dessa enzima e de genes PRs, acompanhado pelo acúmulo de ácido salicílico, são indicadores de SAR (Mishina & Zeier, 2006; Gruner et al., 2013). Foi sugerido que *FMO1* também pode participar na desintoxicação de compostos produzidos por patógenos de plantas, tornando-os menos agressivos e influenciando o estado redox das células vegetais (Schlaich, 2007). Em *Arabidopsis*, o gene *FMO1* é induzido em resposta a *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* (PSM), e a ausência dele leva à deficiência na expressão de genes de defesa e no acúmulo de ácido salicílico, prejudicando o estabelecimento de SAR (Mishina & Zeier, 2006; Schlaich, 2007). A indução em *Eucalyptus* de genes *FMO* indica que essas plantas empregam SAR durante a resposta de defesa a *C. fimbriata*.

### **Genes relacionados à patogenicidade e outros genes de defesa**

Vários genes relacionados à patogenicidade (PRs) foram diferencialmente expressos em *Eucalyptus* spp. contra *C. fimbriata*. As proteínas PRs são conhecidas por atuar como um sistema de defesa basal contra o estresse biótico e abiótico em plantas superiores, particularmente em resposta a infecções de patógenos (Van Loon & Van Strien, 1999; Vigers et al., 1992; Ebner et al., 2001; Rivière et al., 2008; Wang et al., 2010; Kim et al., 2014). Há o acúmulo dessas proteínas no espaço extracelular durante a SAR, em resposta a uma estirpe avirulenta do agente patogênico, tornando-as um componente fundamental da resposta de defesa nas plantas (Ross,

1961; Kuc, 1982; Van Loon et al., 2006; Rivière et al., 2008). Por serem os genes PR marcadores da sinalização hormonal de defesa, os diferentes genes PR putativos expressos em *Eucalyptus* spp. também evidenciam a participação da sinalização mediada por SA na resposta de defesa à murcha-de-Ceratocystis.

A expressão de diferentes genes de um mesmo grupo PR em *Eucalyptus* spp. poderia indicar que alguns deles têm funções ligeiramente diferentes e são todos utilizados durante a resposta de defesa a *C. fimbriata*, como observado em *E. nitens* em resposta a *P. cinnamomi* (Meyer et al., 2016). Como verificado nesta pesquisa, em *E. nitens* também foram induzidos genes *PR-1*, *PR-3*, *PR-4* e *PR-5* em resposta ao ataque de *P. cinnamomi* (Meyer et al., 2016). As plantas de batata resistentes a *Phytophthora* expressam *PR-1* constitutivamente, e a expressão desse gene em plantas transgênicas de tabaco confere resistência a *P. parasítica* (Alexander et al., 1993; Ali et al., 2014). Da mesma forma, as plantas transgênicas superexpressando genes *PR-5* têm demonstrado aumento na resistência a patógenos como *P. citrophthora* e *P. infestans* (Fagoaga et al., 2001; Pushin et al., 2010; Acharya et al., 2013). Já os genes *PR-3* e *PR-4* são associados com a resistência aos fungos necrotróficos *A. brassicicola* (Penninckx et al., 1996), *Botrytis cinerea* (Thomma et al., 1998) e *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthiolae* (Fom) (Bohlmann et al., 1998).

A infecção de *C. fimbriata* fez com que um gene *POX*, possível *PR-9* (Eucgr.I01176), e um *PR-10* (Eucgr.A00162) fossem reprimidos em plantas S de *Eucalyptus* às 12 hai em até -2,42 e -1,71 vezes, respectivamente. Meyer et al. (2016) constataram que genes putativos *PR-9*, *PR-14* e *PR-15* foram reprimidos em *E. nitens*, o que indica um possível papel dessa repressão na suscetibilidade dessas plantas a *P. cinnamomi*. Embora ainda precisem ser caracterizados e estudados com mais detalhes, a repressão desses genes *PRs* pode estar influenciando a suscetibilidade de *Eucalyptus* a *C. fimbriata*.

Um dado marcante nos resultados de RNASeq obtidos nesta pesquisa é que 30 genes de proteínas MLP-like (*PR-10*) foram induzidos somente em plantas resistentes de *Eucalyptus* às 12 hai. A mutação de um

gene *MLP43* em *Arabidopsis* levou ao incremento no acúmulo de EROs, e em plantas transgênicas com sobreexpressão desse gene foram obtidos aumentos significativos das atividades de SOD e CAT, dois antioxidases importantes que limpam o excesso de EROs para prevenir danos celulares, desempenhando um papel na eliminação da produção excessiva de EROs durante a tolerância à seca em plantas (Wang et al., 2016). As proteínas MLP também foram induzidas nas interações *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* - *Gossypium* e *Calonectria pseudoreteauidii* – *Eucalyptus* (Dowd et al., 2004; Chen et al., 2015). Neste trabalho, vários genes *PR-10* induzidos nessa última interação também foram identificados em resposta a *C. fimbriata* (Eucgr.H03995, Eucgr.H04010, Eucgr.H04007, Eucgr.H04003, Eucgr.H04019, Eucgr.A00125, Eucgr.A00133). Possivelmente, esses genes possuem função geral na resposta a estresse biótico, sem serem específicos da resposta de defesa a *C. fimbriata* em *Eucalyptus*.

Outros genes importantes relacionados com a defesa que foram induzidos em *Eucalyptus* pelo ataque de *C. fimbriata* foram os genes de quitinases e os genes implicados na biossíntese de compostos fenólicos e fortalecimento da parede celular, como genes da fenilalanina amônia-liase (PAL). A desagregação de quitina, principal componente da parede dos fungos, é catalisada pelas quitinases, que hidrolisam este composto em açúcares menores, portanto essas proteínas são essenciais na inibição de fungos patogênicos (Taira et al., 2002; Shin et al., 2008; Li & Greene, 2010). No geral, a modificação e o fortalecimento da parede celular é a primeira linha de defesa das plantas contra patógenos, e genes relacionados à biossíntese e modificação dos componentes da parede celular são ativados em várias interações planta-patógeno (Ellis et al., 2002; Lu et al., 2011; Hamann, 2012; Fu et al., 2012; Weeda et al., 2014). A PAL é induzida por vários estímulos, como patógenos, ferimento e hormônios. Essa enzima participa na biossíntese do AS, sinal importante para a ativação tanto das PAMP ou PTI como das ETI (Ritter & Schulz, 2004; Loake & Grant, 2007; Gao et al., 2015). A PAL também é uma enzima-chave na regulação do fluxo de carbono para a via dos fenilpropanoides (Shadle et al., 2003). Essa via não só contribui para o desenvolvimento das plantas, mas também

desempenha um papel crucial nas interações planta-patógeno, ao fornecer os precursores para a síntese de componentes antimicrobianos e estruturais, incluindo salicilatos, ligninas, fitoalexinas, flavonoides, antioxidantes, entre outros (Dixon & Paiva, 1995; Tohge et al., 2013). Quanto mais cedo é a formação desses compostos fenólicos, mais eficientemente limitadas são a extensão da infecção e a colonização do fungo patogênico (Eynck et al., 2009). A indução de genes relacionados com essa via indica que ela pode desempenhar um papel importante na defesa de *Eucalyptus* contra *C. fimbriata*. As pesquisas mostraram que plantas de *E. urophylla* x *E. tereticornis* apresentaram maiores teores de polifenóis e flavonoides do que cultivares suscetíveis após a infecção por *C. quinqueseptatum* e que um gene PAL foi induzido nessas plantas após infecção por *C. pseudoreteaudii* (Feng et al., 2008; Chen et al., 2015). Possivelmente, o aumento na expressão desses genes nas primeiras horas da interação ajudou na síntese de compostos antimicrobianos e no fortalecimento da parede celular, auxiliando no bloqueio de *C. fimbriata* e evitando o progresso da doença em plantas R de *Eucalyptus*.

Um outro importante grupo de genes codificadores de proteína de defesa ao estresse conhecida como glicoproteína rica em hidroxiprolina abundantes de embriogênese tardia (LEA) esteve entre os mais representativos em plantas do *pool* R. Essas proteínas possuem um papel na proteção celular durante a tolerância ao estresse abiótico, auxiliando na proteção das estruturas celulares contra os efeitos da perda de água e dessecação e na proteção de proteínas dos danos ocorridos pelo estresse (Serrano & Montesinos, 2003; Grelet et al., 2005; Hong-Bo et al., 2005; Tolleter et al., 2010; Hinchá & Thalhammer, 2012; Gao & Lan, 2016). Durante a resposta de defesa à murcha-de-Ceratocystis, as plantas de *Eucalyptus* resistentes induziram a produção de LEA para, possivelmente, mitigar os efeitos do estresse hídrico causado pelo patógeno.

Os genes de xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) também foram induzidos em plantas de *Eucalyptus* em resposta à infecção de *C. fimbriata*. Essas proteínas têm sido implicadas em muitos aspectos da biossíntese da parede celular e são consideradas essenciais para

determinados aspectos do remodelamento da parede, incluindo a arquitetura, a força e a extensibilidade (Fry, 1989; Nishitani & Tominaga, 1992). Além disso, é sabido que alterações anatômicas na parede celular que envolvem essas proteínas fazem parte da resposta de defesa (Vorwerk et al., 2004). Um acúmulo sistemático de XTHs no floema de aipo (*Apium graveolens*) foi relatado após a infecção com o pulgão *Myzus persicae* (Divol et al., 2007). Hwang et al. (2011) também observaram aumento significativo da expressão de um gene XTH em plantas resistentes de pimenta (*Capsicum annuum* L.), após a infecção com *Ralstonia solanacearum*. A rápida indução de genes XTH pode desempenhar um papel importante na reestruturação e no reforço da parede celular e/ou na formação de tiloses nos vasos do xilema, que resultam na limitação de movimento e proliferação de patógenos (Hwang et al., 2011). Como relatado no primeiro capítulo desta pesquisa, em clones resistentes e suscetíveis de *Eucalyptus* a *C. fimbriata* foi constatada a rápida formação de tiloses, sendo em maior abundância no clone resistente. Parece que a indução da expressão de genes XTH em *Eucalyptus* serve como mecanismo de defesa à infecção de *C. fimbriata*, participando na formação de tiloses como tentativa de bloquear o progresso do fungo através dos vasos do xilema.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem de forma especial à Suzano Papel e Celulose S.A., pelo suporte financeiro deste trabalho. Agradecemos também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pesquisa do primeiro autor; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro; e à Clonar Resistência a Doenças Florestais, por todo suporte nas inoculações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, J.I.M. et al. Melhoramento genético do eucalipto para resistência à doenças bióticas e abióticas. In: Patologia florestal: desafios e perspectivas. Lavras: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, UFLA, 2013. p. 137-155.
- ABRAF- Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário estatístico da ABRAF. 2012. Ano Base 2011. Brasília: 2012.
- ADLER, V. et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. **The EMBO journal**, v. 18, n. 5, p. 1321-1334, 1999.
- ALEXANDER, D. et al. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 15, p. 7327-7331, 1993.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**, 2nd ed. Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Editora UFV, 500p, 2009.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M. Emerging diseases in Eucalyptus plantations. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, 2008.
- ALI, A. et al. Quantitative proteomics and transcriptomics of potato in response to *Phytophthora infestans* in compatible and incompatible interactions. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1, 2014.
- ALSCHER, R. G.; DONAHUE, L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 224-233, 1997.
- ANDERS, S; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome biology**, v. 11, n. 10, p. 1, 2010.
- ACHARYA, K. et al. Overexpression of *Camellia sinensis* thaumatin-like protein, CsTLP in potato confers enhanced resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* infection. **Molecular biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 609-622, 2013.
- BARNES, I. et al. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 3, p. 361-366, 2003.
- BARTHOLOMÉ, J. et al. High-resolution genetic maps of *Eucalyptus* improve *Eucalyptus grandis* genome assembly. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1283-1296, 2015.
- BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. Annual Review of **Plant Physiology**, v. 32, n. 1, p. 21-81, 1981.
- BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. **Trends in plant science**, v. 13, n. 3, p. 145-150, 2008.
- BIRKENBIHL, R. P.; DIEZEL, C.; SOMSSICH, I. E. *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. **Plant physiology**, v. 159, n. 1, p. 266-285, 2012.
- LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

- BOHLMANN, H. et al. Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene Thi2. 1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. **Febs Letters**, v. 437, n. 3, p. 281-286, 1998.
- BOWLES, D. et al. Glycosyltransferases: managers of small molecules. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 3, p. 254-263, 2005.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons, 2015.
- ČARNÁ, M. et al. Auxins in defense strategies. **Biologia**, v. 69, n. 10, p. 1255-1263, 2014.
- CHAPPELL, J.; HAHLBROCK, K.; BOLLER, T. Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase. **Planta**, v. 161, n. 5, p. 475-480, 1984.
- CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 949-962, 1999.
- CHEN, G.; SHI, T.; SHI, L. Characterizing and annotating the genome using RNA-seq data. **Science China Life Sciences**, p. 1-10, 2016.
- CHEN, Q. et al. Transcriptome and proteome analysis of *Eucalyptus* infected with *Calonectria pseudoreteaudii*. **Journal of proteomics**, v. 115, p. 117-131, 2015.
- CHEN, Q. et al. Identification of *Calonectria* associated with *Eucalyptus* leaf blight in Fujian Province. **Journal of Fujian College of Forestry**, v. 2, p. 016, 2013.
- CHEN, X.; GUO, Z. Tobacco OPBP1 enhances salt tolerance and disease resistance of transgenic rice. **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 12, p. 2601-2613, 2008.
- CHENG, Y. et al. Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 35, p. 14694-14699, 2011.
- CHENG, D. W. et al. Transcriptional regulation of the grape cytochrome P450 monooxygenase gene CYP736B expression in response to *Xylella fastidiosa* infection. **BMC plant biology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.
- CHINCHILLA, D. et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 497-500, 2007.
- CHIU, J.; DAWES, I. W. Redox control of cell proliferation. **Trends in cell biology**, v. 22, n. 11, p. 592-601, 2012.
- CHO, S. et al. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 12749-12755, 2001.
- CHOI, W. et al. Salt stress-induced Ca<sup>2+</sup> waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 6497-6502, 2014.
- CHOU, W.; KUTCHAN, T. M. Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids. **The Plant Journal**, v. 15, n. 3, p. 289-300, 1998.

- CUMMING, R. C. et al. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through Redox regulation of GSTP1. **Nature medicine**, v. 7, n. 7, p. 814-820, 2001.
- CUMMINS, I.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. **The Plant Journal**, v. 18, n. 3, p. 285-292, 1999.
- CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. The Redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 657-664, 2001.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International journal of plant genomics**, v. 2008, 2008.
- COUTINHO, P. M. et al. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. **Journal of molecular biology**, v. 328, n. 2, p. 307-317, 2003.
- DANQUAH, A. et al. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 1, p. 40-52, 2014.
- DAS, P. et al. Oxidative environment and Redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 70, 2015.
- DATTA, R. et al. Glutathione regulates ACC synthase transcription via WRKY33 and ACC oxidase by modulating mRNA stability to induce ethylene synthesis during stress. **Plant Physiology**, pp. 01543.2015, 2015.
- DILLIES M.A.; RAU A.; AUBERT J. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. **Brief Bioinformatics**, v. 14, n. 6, p. 671-683, 2013.
- DOWEN, R. H. et al. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 32, p. E2183-E2191, 2012.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- YU, D.; CHEN, C.; CHEN, Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. **The Plant Cell**, v. 13, n. 7, p. 1527-1540, 2001.
- KLESSIG, D. F. et al. SOS—too many signals for systemic acquired resistance?. **Trends in plant science**, v. 17, n. 9, p. 538-545, 2012.
- DENOEUDE, F. et al. Annotating genomes with massive-scale RNA sequencing. **Genome biology**, v. 9, n. 12, p. 1, 2008.
- DIETZ, K.; VOGEL, M. O.; VIEHHAUSER, A. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. **Protoplasma**, v. 245, n. 1-4, p. 3-14, 2010.

- DING, X. et al. A rice kinase-protein interaction map. **Plant physiology**, v. 149, n. 3, p. 1478-1492, 2009.
- DIVOL F. et al. Involvement of the xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases encoded by celery XTH1 and Arabidopsis XTH33 in the phloem response to aphids. **Plant Cell Environ**, v. 30, p. 187-201, 2007.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1085, 1995.
- DODDS, P. N. et al. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. **New Phytologist**, v. 183, n. 4, p. 993-1000, 2009.
- DONG, J.; CHEN, C.; CHEN, Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant molecular biology**, v. 51, n. 1, p. 21-37, 2003.
- DOWD, C.; WILSON, I. W.; MCFADDEN, H. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 17, n. 6, p. 654-667, 2004.
- DURST, F.; O'KEEFE, D. P. Plant cytochromes P450: an overview. **Drug metabolism and drug interactions**, v. 12, n. 3-4, p. 171-188, 1995.
- EBNER, C.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; BREITENEDER, H. Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins. **Allergy**, v. 56, n. s67, p. 43-44, 2001.
- ECKER, J. R. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 667, 1995.
- ELLIS, C. et al. The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. **The Plant Cell**, v. 14, n. 7, p. 1557-1566, 2002.
- ESHRAHGI, L. et al. Suppression of the auxin response pathway enhances susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* while phosphite-mediated resistance stimulates the auxin signalling pathway. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.
- EULGEM, T. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. **Trends in plant science**, v. 10, n. 2, p. 71-78, 2005.
- EULGEM, T. et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in plant science**, v. 5, n. 5, p. 199-206, 2000.
- EYNCK, C. et al. Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. **Phytopathology**, v. 99, n. 7, p. 802-811, 2009.
- FAGOAGA, C. et al. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, v. 7, n. 2, p. 175-185, 2001.
- FAN, X.; MATTHEIS, J. P.; ROBERTS, R. G. Biosynthesis of phytoalexin in carrot root requires ethylene action. **Physiologia plantarum**, v. 110, n. 4, p. 450-454, 2000.
- FENG, L. Z. et al. Relationship between eucalyptus resistance to dieback and secondary metabolism [J]. **Chinese Journal of Eco-Agriculture**, v. 2, p. 032, 2008.

- FERREIRA, M. A. et al. Spatial–temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Forest Pathology**, v. 43, n. 2, p. 153-164, 2013.
- FERREIRA, E. M. et al. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 721-735, 2010.
- FERREIRA, F. A. et al. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista árvore**, v. 30, n. 2, p. 155-162, 2006.
- FERREIRA, F. A. et al. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, 1999.
- FERREIRA, M.; SOUZA, I.C.G. **Caracterização e identificação dos clones de *Eucalyptus* da Bahia Sul celulose S.A. Relatório final apresentado à BAHIA SUL CELULOSE S.A.** Piracicaba, SP. Junho, 1997.
- FERNANDES, B. V. et al. Damage and Loss Due to *Ceratocystis fimbriata* in *Eucalyptus* Wood for Charcoal Production. **BioResources**, p. 5473-5479, 2014.
- FONSECA, S. M. et al. Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto. **Editores UFV**, Viçosa, p. 200, 2010.
- FOYER, C. H.; KARPINSKA, B.; KRUPINSKA, K. The functions of WHIRLY1 and REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 in cross tolerance responses in plants: a hypothesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1640, p. 20130226, 2014.
- FRASER, C. M.; CHAPPLE, C. The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. **The Arabidopsis Book**, p. e0152, 2011.
- FRY, S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, v. 75, p. 532-536, 1989.
- FROVA, C. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. **Physiologia plantarum**, v. 119, n. 4, p. 469-479, 2003.
- FU, X. Z. et al. Different transcriptional response to *xanthomonas citri* subsp. *citri* between kumquat and sweet orange with contrasting canker tolerance. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 7, e.41790, 2012.
- GAO, Q. M. et al. Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in plant science**, v. 6, 2015.
- GAO, J.; LAN, T. Functional characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein gene family from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in *Escherichia coli*. **Scientific reports**, v. 6, 2016.
- GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome biology**, v. 5, n. 10, p. 1, 2004.
- GILROY, S. et al. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 10, p. 623-630, 2014.
- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, v. 179, p. 911–929, 2008.

- GRELET, J. et al. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. **Plant Physiology**, v. 137, n. 1, p. 157-167, 2005.
- GRUNER, K. et al. Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 252 p., 2013.
- GUILFOYLE, T. J. Auxin-regulated genes and promoters. **New Comprehensive Biochemistry**, v. 33, p. 423-459, 1999.
- GUIMARÃES, L. M. S. et al. *Eucalyptus pellita* as a source of resistance to rust, ceratocystis wilt and leaf blight. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p. 124-131, 2010.
- HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. **Plant molecular biology**, v. 49, n. 3-4, p. 373-385, 2002.
- HAGEN, G.; KLEINSCHMIDT, A.; GUILFOYLE, T. Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. **Planta**, v. 162, n. 2, p. 147-153, 1984.
- HARRINGTON, T. C.; THORPE, D. J.; ALFENAS, A. C. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, v. 101, n. 5, p. 555-566, 2011.
- HARRINGTON, T. C. 11 Ceratocystis Diseases. **Infectious forest diseases**, p. 230, 2013.
- HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 77, 2012.
- HINCHA, D. K.; THALHAMMER, A. LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 5, p. 1000-1003, 2012.
- HOK, S. et al. An *Arabidopsis* (malectin-like) leucine-rich repeat receptor-like kinase contributes to downy mildew disease. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 11, p. 1944-1957, 2011.
- HONG-BO, S.; ZONG-SUO, L.; MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3, p. 131-135, 2005.
- HUIBERS, R. P. et al. Disease-specific expression of host genes during downy mildew infection of *Arabidopsis*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 22, n. 9, p. 1104-1115, 2009.
- HUNG, S.H.; YU, C.W.; LIN C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 46, n. 1, p. 1-10, Jan. 2005.
- HWANG et al. Microarray Analysis of the Transcriptome for Bacterial Wilt Resistance in Pepper (*Capsicum annuum* L.). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 39, n. 2, p. 49-57, 2011
- IGLESIAS, M. J.; TERRILE, M. C.; CASALONGUÉ, C. A. Auxin and salicylic acid signalings counteract the regulation of adaptive responses to stress. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 3, p. 452-454, 2011.
- ISIN, E. M.; GUENGERICH, F. P. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 3, p. 314-329, 2007.

- JADA, B. et al. Multiple Different defense mechanisms are activated in the young transgenic tobacco plants which express the full length genome of the tobacco mosaic virus, and are resistant against this virus. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107778, 2014.
- JO, H. J.; LEE, J. J.; KONG, K. H. A plant-specific tau class glutathione S-transferase from *Oryza sativa* with very high activity against 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene and chloroacetanilide herbicides. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 101, n. 3, p. 265-269, 2011.
- JOURNOT-CATALINO, N. et al. The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 18, n. 11, p. 3289-3302, 2006.
- JUNG, J. H.; PARK, C. M. Auxin modulation of salt stress signaling in *Arabidopsis* seed germination. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 8, p. 1198-1200, 2011.
- KELLEY, B. S. et al. A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. **The Plant Journal**, v. 62, n. 3, p. 357-366, 2010.
- KILILI, K. G. et al. Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24540-24551, 2004.
- KIM, K. C. et al. Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. **The Plant Cell**, v. 20, n. 9, p. 2357-2371, 2008.
- KIM, K. C.; FAN, B.; CHEN, Z. Pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY7 is a transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae*. **Plant physiology**, v. 142, n. 3, p. 1180-1192, 2006.
- KIM, Y. J. et al. Functional characterization of the pathogenesis-related protein family 10 gene, PgPR10-4, from *Panax ginseng* in response to environmental stresses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, n. 3, p. 531-543, 2014.
- KNOTH, Colleen et al. Arabidopsis WRKY70 is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 20, n. 2, p. 120-128, 2007.
- KUĆ, J. Induced immunity to plant disease. **Bioscience**, v. 32, n. 11, p. 854-860, 1982.
- LANGENBACH, C. et al. UDP-glucosyltransferase UGT84A2/BRT1 is required for Arabidopsis nonhost resistance to the Asian soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **New Phytologist**, v. 198, n. 2, p. 536-545, 2013.
- LANGLOIS-MEURINNE, M.; GACHON, C. M. M.; SAINDRANAN, P. Pathogen-responsive expression of glucosyltransferase genes UGT73B3 and UGT73B5 is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 139, n. 4, p. 1890-1901, 2005.
- LEHTI-SHIU, M. D. et al. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. **Plant Physiology**, v. 150, n. 1, p. 12-26, 2009.

- LÉVESQUE, C. A. et al. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. **Genome biology**, v. 11, n. 7, p. 1, 2010.
- Li, B.; Dewey, C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12:323, 2011.
- LI, Z. et al. The ethylene response factor AtERF11 that is transcriptionally modulated by the bZIP transcription factor HY5 is a crucial repressor for ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 68, n. 1, p. 88-99, 2011.
- LI, H.; GREENE, L. H. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding. **PLoS one**, v. 5, n. 1, p. e8654, 2010.
- LI, C. et al. Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic-and polygenic resistance responses are mainly in timing. **Plant molecular biology**, v. 62, n. 1-2, p. 127-140, 2006.
- LICAUSI, F.; OHME-TAKAGI, M.; PERATA, P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. **New Phytologist**, v. 199, n. 3, p. 639-649, 2013.
- LIPPOK, B. et al. Expression of AtWRKY33 encoding a pathogen-or PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 420-429, 2007.
- LIU, D. et al. The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 10, p. 3899-3911, 2012.
- LOAKE G.; GRANT M. Salicylic acid in plant defence - the players and protagonists. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 466-472, 2007.
- LORENZO, O. et al. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, v. 15, n. 1, p. 165-178, 2003.
- LOVE, M.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, 550p, 2014.
- LU, G. et al. Transcriptional profiling of watermelon during its incompatible interaction with *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, p. 585–601, 2011.
- MAFIA, R. G. et al. Impact of Ceratocystis wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. **Forest Pathology**, v. 43, n. 5, p. 379-385, 2013.
- MAHOMED, W.; VAN DEN BERG, N. EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2011.
- MARGUERAT, S.; BÄHLER, Jürg. RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences*, v. 67, n. 4, p. 569-579, 2010.
- MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, v. 437, n. 7057, p. 376-380, 2005.

- MARTINELLI, F. et al. Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e38039, 2012.
- MATSUO, M. et al. High REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1 levels result in accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* shoots and roots. **Molecular plant**, v. 8, n. 8, p. 1253-1273, 2015.
- MAZEL, A.; LEVINE, A. Induction of glucosyltransferase transcription and activity during superoxide-dependent cell death in *Arabidopsis* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 133-140, 2002.
- MEYER, F. E. et al. Dual RNA-sequencing of *Eucalyptus nitens* during *Phytophthora cinnamomi* challenge reveals pathogen and host factors influencing compatibility. **Frontiers in plant science**, v. 7, 2016.
- MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 979-987, Apr. 2002.
- MISHINA, T. E.; ZEIER, J. The *Arabidopsis* flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. **Plant physiology**, v. 141, n. 4, p. 1666-1675, 2006.
- MITTLER, R.; BLUMWALD, E. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. **The Plant Cell**, v. 27, n. 1, p. 64-70, 2015.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.
- MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, Clare, v. 162, n. 4, p. 491-498, 2002.
- MOFFAT, C. S. et al. ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35995, 2012.
- MOU, Z.; FAN, W.; DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through Redox changes. **Cell**, v. 113, n. 7, p. 935-944, 2003.
- MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356-362, 2014.
- NAOUMKINA, M. A.; HE, X. Z.; DIXON, R. A. Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. **BMC plant biology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2008.
- NARUSAKA, M. et al. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. **Plant molecular biology**, v. 55, n. 3, p. 327-342, 2004.
- NIELSEN, K. A.; MOLLER, B.L. Cytochrome P450s in plants. In: **Cytochrome P450**. Springer US, p. 553-583, 2005.

- NISHIMURA, M. T. et al. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. **Science**, v. 301, n. 5635, p. 969-972, 2003.
- NISHITANI, K.; TOMINAGA, R. Endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 29, p. 21058-21064, 1992.
- NODA, R. W. N.; BORGES, C. M.; DE SOUSA, S. M. Anotação funcional de sequências com BLAST2GO. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2010.
- NOVILLO, F. et al. Genetic analysis reveals a complex regulatory network modulating CBF gene expression and *Arabidopsis* response to abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 1, p. 293-304, 2012.
- OLIVEIRA, L. S. S. et al. Aggressiveness, cultural characteristics and genetic variation of *Ceratocystis fimbriata* on *Eucalyptus* spp. **Forest Pathology**, v. 45, n. 6, p. 505-514, 2015.
- OLSZAK, B. et al. A putative flavin-containing mono-oxygenase as a marker for certain defense and cell death pathways. **Plant science**, v. 170, n. 3, p. 614-623, 2006.
- OSTROWSKI, M.; JAKUBOWSKA, A. UDP-glycosyltransferases of plant hormones. **Advances in Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 43-60, 2014.
- PANDEY, S. P.; SOMSSICH, I. E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. **Plant physiology**, v. 150, n. 4, p. 1648-1655, 2009.
- PARK, J. E. et al. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 10036-10046, 2007.
- PENNINCKX, I. A. et al. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **The Plant Cell**, v. 8, n. 12, p. 2309-2323, 1996.
- PÉREZ-RUIZ, J. M. et al. Rice NTRC is a high-efficiency Redox system for chloroplast protection against oxidative damage. **The Plant Cell**, v. 18, n. 9, p. 2356-2368, 2006.
- PERSANS, M. W.; WANG, J.; SCHULER, M. A. Characterization of maize cytochrome P450 monooxygenases induced in response to safeners and bacterial pathogens. **Plant Physiology**, v. 125, n. 2, p. 1126-1138, 2001.
- POPPEBERGER, B. et al. Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, p. 47905-47914, 2003.
- POSTEL, S. et al. The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in *Arabidopsis* development and immunity. **European journal of cell biology**, v. 89, n. 2, p. 169-174, 2010.
- PUSHIN, A. S. et al. Transgenic tomato plants expressing pr-5 protein genes demonstrated disease resistance against *Phytophthora infestans* and *xanthomonas vesicatoria*. In: **III International Symposium on Tomato Diseases 914**. 2010. p. 415-418.
- RAE, G. M. et al. DRM1 and DRM2 expression regulation: potential role of splice variants in response to stress and environmental factors in

- Arabidopsis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 289, n. 3, p. 317-332, 2014.
- REN, S. et al. Novel *Arabidopsis* jasmonate-responsive mutants have variations in bacterial disease resistance. **J Biotech Res**, v. 4, p. 80-91, 2012.
- RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3426-3436, 2004.
- RIVIERE, M. P. et al. Silencing of acidic pathogenesis-related PR-1 genes increases extracellular  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 6, p. 1225-1239, 2008.
- ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome biology**, v. 11, p. R25, 2010.
- RODAS, C. A. et al. *Ceratocystis neglecta* sp nov., infecting *Eucalyptus* trees in Colombia. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 73-84, 2008.
- ROBERTS, A. et al. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 27, n. 17, p. 2325-2329, 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.
- ROSADO, C. C. G. et al. Resistance to ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in parents and progênies of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Silvae Genetica**, v. 59, p. 99-106, 2010.
- ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, v. 14, n. 3, p. 340-358, 1961.
- ROXAS, V. P. et al. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 11, p. 1229-1234, 2000.
- ROUX, J. et al. A serious new wilt disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. **Forest Pathology**, v. 30, n. 3, p. 175-184, 2000.
- ROUX, J. et al. Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. **South African Journal of Science**, v. 97, p. 16-8, 2001.
- ROUX, J. et al. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, v. 53, p. 414-421, 2004.
- ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. *Ceratocystis* species: emerging pathogens of non-native plantation *Eucalyptus* and *Acacia* species. **Southern Forests**, v. 71, p. 115-120, 2009.
- RYU, H. Seung. et al. A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response. **Plant cell reports**, v. 25, n. 8, p. 836-847, 2006.
- SANDERMANN, H. Plant metabolism of xenobiotics. **Trends in biochemical sciences**, v. 17, n. 2, p. 82-84, 1992.
- SAVORY, E. A. et al. mRNA-Seq analysis of the *Pseudoperonospora cubensis* transcriptome during cucumber (*Cucumis sativus* L.) infection. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35796, 2012.

- SCHLAICH, N. L. Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. **Trends in plant science**, v. 12, n. 9, p. 412-418, 2007.
- SEDANO, J. C. S.; CARRASCAL, C. E. L. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. **Fitosanidad**, v. 16, n. 2, p. 101-113, 2012.
- SEO, P. J.; PARK, C. M. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 186, n. 2, p. 471-483, 2010.
- SERRANO, R.; MONTESINOS, C. Molecular bases of desiccation tolerance in plant cells and potential applications in food dehydration. **Food science and technology international**, v. 9, n. 3, p. 157-161, 2003.
- SHADLE, G. L. et al. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 153-161, 2003.
- SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.
- SHAH, J.; ZEIER, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 30, p. 23, 2013.
- SHI, H. et al. The Cysteine<sup>2</sup>/Histidine<sup>2</sup>-Type transcription factor *ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA6* modulates biotic and abiotic stress responses by activating salicylic acid-related genes and *C-REPEAT-BINDING FACTOR* genes in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 165, n. 3, p. 1367-1379, 2014.
- SHIN, S. et al. Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 9, p. 2371-2378, 2008.
- SMITH, A. P. et al. *Arabidopsis AtGSTF2* is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. **The Plant Journal**, v. 36, n. 4, p. 433-442, 2003.
- SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 89-100, 2012.
- SUN, L. et al. Sugar homeostasis mediated by cell wall invertase *GRAIN INCOMPLETE FILLING 1 (GIF1)* plays a role in pre-existing and induced defence in rice. **Molecular plant pathology**, v. 15, n. 2, p. 161-173, 2014.
- SYROS, T. et al. A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 1, p. 69-77, 2004.
- SZECHYŃSKA-HEBDA, M. et al. Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 22, n. 7, p. 2201-2218, 2010.
- TAIRA, T. et al. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the

- fungal cell walls. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 970-977, 2002.
- TAO, Y. et al. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, v. 15, n. 2, p. 317-330, 2003.
- TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245-4269, 2014.
- TENA, G. et al. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 5, p. 392-400, 2001.
- THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology (GO) Project in 2008. **Nucleic Acids Research**, 36: D440-D444, 2007.
- THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology (GO) Project in 2006. **Nucleic Acids Research**, 32: D322-D326, 2006.
- THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. **Nucleic Acids Research**, 32: D258-D261, 2004.
- THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Creating the gene ontology resource: design and implementation. **Genome Research**, v. 11, n. 8, p. 1425-1433, 2001.
- THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000.
- THOMMA, B. P. et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 15107-15111, 1998.
- TOHGE, T. et al. The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 48, n. 2, p. 123-152, 2013.
- TOLLETER, D.; HINCHA, D. K.; MACHEREL, D. A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1798, n. 10, p. 1926-1933, 2010.
- TORTO-ALALIBO, T. et al. Common and contrasting themes in host cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant symbionts described using the Gene Ontology. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2009.
- TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature protocols**, v. 7, n. 3, p. 562-578, 2012.
- TRAPNELL, C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010.
- TREMBLAY, A. et al. Gene expression in leaves of susceptible Glycine max during infection with *Phakopsora pachyrhizi* using next generation sequencing. **Sequencing**, v. 2011, 2012.

- TUTEJA, N.; MAHAJAN, S. Calcium signaling network in plants: an overview. **Plant signaling & behavior**, v. 2, n. 2, p. 79-85, 2007.
- ULMASOV, T. et al. The soybean GH2/4 gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. **Plant physiology**, v. 108, n. 3, p. 919-927, 1995.
- VADASSERY, J. et al. CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to Spodoptera herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 159, n. 3, p. 1159-1175, 2012.
- VAN DE POEL, B.; VAN DER STRAETEN, D. 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) in Plants: More than Just the Precursor of Ethylene!. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 640, 2014.
- VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.
- VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.
- VERA, J. C. et al. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. **Molecular ecology**, v. 17, n. 7, p. 1636-1647, 2008.
- VERHAGE, A.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 536-540, 2010.
- VIGERS, Alison J. et al. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. **Plant Science**, v. 83, n. 2, p. 155-161, 1992.
- VILLAR, E. et al. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.
- VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Sciences**, v. 9, p. 203-209, 2004.
- WANG, X. **Next-Generation Sequencing Data Analysis**. CRC Press, Taylor & Francis Group. A Chapman & Hall book. ISBN 9781482217889. 246 p, 2016.
- WANG, X. et al. Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene *TaPR5* from wheat induced by stripe rust fungus. **Physiologia Plantarum**, v. 139, n. 1, p. 27-38, 2010.
- WANG, J.; HOU, B. Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites. **Frontiers of Biology in China**, v. 4, n. 1, p. 39-46, 2009.
- WANG, G. L. et al. Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. **The Plant Cell**, v. 10, n. 5, p. 765-779, 1998.
- WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of botany**, v. 100, n. 4, p. 681-697, 2007.

- WEEDA, S. et al. *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e93462, 2014.
- WERCK-REICHHART, D.; BAK, S.; PAQUETTE, S. **Cytochrome P450**. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 2002.
- WISE, R. P. et al. Transcript profiling in host–pathogen interactions. **Phytopathology**, v. 45, n. 1, p. 329, 2007.
- XU, L. et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 15, p. 5607-5621, 2011.
- YANG, P. et al. A pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. **The Plant Journal**, v. 18, n. 2, p. 141-149, 1999.
- YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes and Development**, v. 11, p. 1621–1639, 1997.
- YOO, S.; SHEEN, J. MAPK signaling in plant hormone ethylene signal transduction. **Plant signaling & behavior**, v. 3, n. 10, p. 848-849, 2008.
- ZAREI, Adel et al. Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1.2* promoter in *Arabidopsis*. **Plant molecular biology**, v. 75, n. 4-5, p. 321-331, 2011.
- ZAUZA, E. A. V. et al. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v. 88, p. 758–760, 2004.
- ZHANG, Y. et al. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 42, p. 18220-18225, 2010.
- ZHANG, Z. et al. Transcriptional regulation of the ethylene response factor LeERF2 in the expression of ethylene biosynthesis genes controls ethylene production in tomato and tobacco. **Plant Physiology**, v. 150, n. 1, p. 365-377, 2009.
- ZHAO, Y. et al. *Arabidopsis* *RAP2. 2* plays an important role in plant resistance to *Botrytis cinerea* and ethylene responses. **New Phytologist**, v. 195, n. 2, p. 450-460, 2012.
- ZHENG, Zuyu et al. *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. **The Plant Journal**, v. 48, n. 4, p. 592-605, 2006.
- ZHU, Z. et al. *Arabidopsis* resistance protein SNC1 activates immune responses through association with a transcriptional corepressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 31, p. 13960-13965, 2010.
- ZIPFEL, Cyril et al. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature**, v. 428, n. 6984, p. 764-767, 2004.

ZIPFEL, C. et al. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**, v. 125, n. 4, p. 749-760, 2006.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Clones resistente e suscetível de *Eucalyptus* à murcha-de-Ceratocystis apresentaram reações similares à infecção, mas diferiram na velocidade e intensidade de resposta de defesa. Entre essas respostas encontram-se o fechamento das pontuações de vasos, a intensa formação de tiloses e géis, o acúmulo de material amorfo e de compostos fenólicos e a lignificação dos tecidos.
- Diferentemente do clone suscetível que não foi capaz de conter a colonização do fungo em seus tecidos, o clone resistente limitou a colonização do fungo aos vasos do xilema e aos tecidos ao redor dos vasos.
- *Ceratocystis fimbriata* alterou em *Eucalyptus* a expressão de genes de resposta ao estresse, desde receptores de reconhecimento do patógeno até genes que atuam na formação da parede celular, fatores de transcrição, genes da sinalização hormonal, genes da homeostase redox, entre outros.
- Foi possível observar que há nítida diferença entre plantas suscetíveis e resistentes de *Eucalyptus* spp. à murcha-de-Ceratocystis no padrão de expressão dos genes relacionados à interação planta-patógeno. As plantas resistentes possuem resposta mais rápida ao ataque do patógeno, o que foi inferido pelo maior número de genes relacionados com a defesa que foram induzidos nas primeiras horas, quando comparadas com aquelas suscetíveis, que responderam mais tardiamente.
- De acordo com os resultados encontrados, *Eucalyptus* reconhece a invasão de *C. fimbriata* por meio de proteínas receptoras de membrana, e assim rapidamente desencadeia múltiplas vias de sinalização, que levam à indução de genes implicados no reforço da parede celular, produção de outros compostos antimicrobianos, de genes característicos da

resposta sistêmica adquirida (SAR), como genes de fenilalaninas amonioliase, flavinas monoxigenases, genes *WRKY* e *PRs*, entre outros.

- O transcriptoma gerado pela técnica do RNASeq, nesta pesquisa, deu uma visão geral dos mecanismos de defesa e resistência à murcha-de-Ceratocystis em *Eucalyptus*, tornando uma importante ferramenta para futuros estudos que visam ao entendimento da interação e dos mecanismos de resistência.
- Esta pesquisa não só contribuiu para o melhor entendimento da base molecular do patossistema, mas também ajudará na identificação de marcadores moleculares no genoma de *Eucalyptus*, o que poderá facilitar a clonagem de genes de resistência. Com a informação gerada, será possível a identificação de novos genes-alvo para uso em transformação genética, com a finalidade de atingir a expressão de genes, resultando no desenvolvimento de plantas resistentes à murcha-de-Ceratocystis por meio de engenharia genética.

## **ANEXOS**

**Anexo A** - Receptores quinases e genes envolvidos na sinalização de cálcio, cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 18 e 24 hai

Família gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R		Pool S		
			18 hai	24 hai	18 hai	24 hai	
<b>Receptores tipo quinases</b>		receptor like protein 12	-	3,09	-	-	
	<b>Receptor-like kinase</b>	Eucgr.A01726	Receptor-like protein kinase-related family protein	-	-	-	1,43
		Eucgr.A01731	Receptor-like protein kinase-related family protein	1,33	-	-	-
		Eucgr.A01728	Receptor-like protein kinase-related family protein	1,41	-	-	-
		Eucgr.A01729	Receptor-like protein kinase-related family protein	1,95	-	1,18	1,31
		Eucgr.E03056	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 29	2,76	-	-	-
		Eucgr.E03586	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 29	-	-	-	Inf
		Eucgr.B00254	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 42	-	-	-	2,15
		Eucgr.A00602	lectin receptor kinase a4.1	2,15	-	-	-
		Eucgr.J00871	Malectinreceptor-like protein kinase family protein	-1,09	-	-	-
		Eucgr.J02706	FLG22-induced receptor-like kinase 1	-2,35	-	-	-
		Eucgr.K00355	PR5-like receptor kinase	-	-	-2,97	-
<b>Sinalização dependente do cálcio</b>		<b>Calcium-binding EF-hand family</b>	Eucgr.F02936	Calcium-binding EF-hand family protein	-	-	-
	Eucgr.E01001		Calcium-binding EF-hand family protein	1,90	-	-	3,22
	Eucgr.K00714		Calcium-binding EF-hand family protein	-	Inf	-	-
	Eucgr.H02908		Calcium-binding EF-hand family protein	-	-	-1,00	-
	Eucgr.J01357		Calcium-binding EF-hand family protein	-	-	-	1,52
	<b>Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family</b>	Eucgr.J01589	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	-	-	4,93	2,63

	Eucgr.B00125	calmodulin like 37	-	-	-	2,99
	Eucgr.F03632	calmodulin like 37	-	2,07	-	-
	Eucgr.B00124	calmodulin like 37	1,71	-	-	-
	Eucgr.J02318	calmodulin-like 38	1,96	-	-	-
	Eucgr.A00852	calmodulin like 42	1,86	-	-	2,11
<b>Calmodulin (CaM)</b>	Eucgr.B00745	Calmodulin binding protein-like	-	1,32	-	-
	Eucgr.C00868	calmodulin-binding family protein	1,49	-	-	1,54
	Eucgr.L03089	calmodulin-binding family protein	-	1,02	-	-
<b>Outras</b>	Eucgr.C00102	alpha-mannosidase 1	-3,91	-	-	-

Os genes induzidos (*up-regulated*) e os reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

**Anexo B** - Fatores de transcrição cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 18 e 24 hai

Familia gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R		Pool S	
			18 hai	24 hai	18 hai	24 hai
<b>WRKY</b>	Eucgr.G00619	WRKY DNA-binding protein 9	-	-	1,61	-
	Eucgr.J01756	WRKY DNA-binding protein 23	2,47	-	-	-
	Eucgr.D01811	WRKY DNA-binding protein 27	-	-	-	1,40
	Eucgr.K02940	WRKY DNA-binding protein 33	-	-	-	1,41
	Eucgr.C00675	WRKY DNA-binding protein 50	-	-	-1,39	-
	Eucgr.K02453	WRKY DNA-binding protein 72	-	-	2,33	-
	Eucgr.I01927	WRKY DNA-binding protein 72	1,86	2,11	-	2,51
	Eucgr.K00331	WRKY family transcription factor	-	-	1,95	-
	Eucgr.E00850	WRKY family transcription factor	-	-	-	1,00
	Eucgr.E04011	WRKY family transcription factor	-	-	-	1,29
<b>NAC</b>	Eucgr.F01091	NAC domain containing protein 2	-	-	-	1,89
	Eucgr.G01077	NAC transcription factor-like 9	-2,83	-	-	-
	Eucgr.G01052	NAC transcription factor-like 9	-	-1,23	-	-
	Eucgr.K01228	NAC domain containing protein 42	1,09	-	1,01	1,70
	Eucgr.A02070	NAC domain containing protein 47	-	-	-	1,23
	Eucgr.I00100	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	-	-	-	2,09
	Eucgr.I00058	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	-	-	-	1,39
	Eucgr.I00059	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	-	-	-	1,38

	Eucgr.F01093	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	-	1,23	-	1,32
	Eucgr.I00060	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	-	-	-	1,14
<b>basic/helix-loop-helix (bHLH)</b>	Eucgr.G03396	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	-	1,51	-	-
<b>basic leucine-zipper (bZIP)</b>	Eucgr.I02396	basic leucine-zipper 44	-	-	-	1,06
	Eucgr.H04892	related to AP2 6l	1,69	1,13	-	1,82
	Eucgr.G02345	AP2B3 transcription factor family protein	-	-	-	1,19
<b>APETALA 2/ethylene response element binding protein (AP2/EREBP)</b>	Eucgr.H03091	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-	-	-	1,78
	Eucgr.I00291	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-	-	-	1,76
	Eucgr.E00377	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-	-	-	1,48
	Eucgr.K03266	ethylene response factor 1	-	-	-	1,47
	Eucgr.E00378	ethylene responsive element binding factor 5	-	-	-	1,47
	Eucgr.B00171	BTB and TAZ domain protein 1	-	1,53	-	-
<b>Outros</b>	Eucgr.H03878	Mitochondrial transcription termination factor family protein	-1,91	-	-	Inf
	Eucgr.A01572	sequence-specific DNA binding transcription factors	-	1,28	-	-

Os genes induzidos (*up-regulated*) e os reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

**Anexo C** - Genes envolvidos na sinalização hormonal cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 18 e 24 hai

Familia gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R		Pool S	
			18 hai	24 hai	18 hai	24 hai
<b>Gretchen Hagen 3 (GH3)</b>	Eucgr.H02264	Auxin-responsive GH3 family protein	1,28	-	-	-
	Eucgr.I01087	Auxin-responsive GH3 family protein	-	-	-	1,95
<b>Small Auxin Up RNA (SAUR)</b>	Eucgr.C02131	SAUR-like auxin-responsive protein family	-	3,13	-	-
	Eucgr.D02026	SAUR-like auxin-responsive protein family	-	-	-	1,39
<b>Glutathione-S-transferase</b>	Eucgr.H00157	glutathione S-transferase tau 7	2,47	-	-	-
	Eucgr.H00154	glutathione S-transferase tau 7	-	-	-	1,19
	Eucgr.K03034	glutathione S-transferase TAU 8	-	-	-	1,20
	Eucgr.K03029	glutathione S-transferase TAU 8	-	-	1,06	-
	Eucgr.K03031	glutathione S-transferase TAU 8	-	-	-	1,44
	Eucgr.L01417	glutathione S-transferase TAU 8	1,19	-	-	-
	Eucgr.K03039	glutathione S-transferase TAU 8	-	-	1,01	-
	Eucgr.K01234	glutathione S-transferase PHI 9	-	1,56	1,27	-
	Eucgr.B03441	glutathione S-transferase TAU 10	-	-	1,57	-
	Eucgr.B02774	glutathione S-transferase TAU 19	1,53	1,94	1,47	2,31
	Eucgr.F01424	glutathione S-transferase TAU 19	-	-	-	1,48
	Eucgr.F01418	glutathione S-transferase TAU 19	-	-	-	1,73
	Eucgr.B02780	glutathione S-transferase TAU 19	-	-	-	1,67
	Eucgr.F01425	glutathione S-transferase TAU 19	-	-	-	1,44
	Eucgr.L01850	glutathione S-transferase TAU 25	-	-	-	1,48

Genes relacionados com auxinas

	Eucgr.F01416	glutathione S-transferase TAU 25	-	-	-	1,30
	Eucgr.K03192	Glutathione S-transferase family protein	1,54	-	-	-
	Eucgr.K03194	Glutathione S-transferase family protein	-	-	2,05	-
<b>Auxin Efflux Carrier (AEC) Family</b>	Eucgr.B01403	Auxin efflux carrier family protein	-	1,15	-	-
<b>Outros</b>	Eucgr.A01061	Auxin-responsive family protein	-	-	-	1,66
<b>1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (ACS) gene family</b>	Eucgr.D01814	ACC synthase 1	-	-	1,31	2,00
	Eucgr.D01815	ACC synthase 1	1,33	-	1,24	1,85
	Eucgr.D01817	ACC synthase 1	-	-	2,13	-
	Eucgr.L02435	ACC synthase 1	1,16	-	-	1,70
	Eucgr.L02436	ACC synthase 1	-	-	-	1,78
<b>1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase (ACO) gene family</b>	Eucgr.C03886	ACC oxidase 1	1,14	-	-	-
	Eucgr.A00947	UDP-glucosyl transferase 71B6	-	-	-	1,57
	Eucgr.E04315	UDP-glucosyl transferase 71C4	-	-	-	2,89
	Eucgr.I00448	UDP-glucosyl transferase 73B3	-	-	-	1,24
	Eucgr.F00338	UDP-glucosyl transferase 85A2	2,26	-	1,71	2,52
	Eucgr.F00342	UDP-glucosyl transferase 85A3	2,07	-	1,41	3,39
	Eucgr.F03599	UDP-glucosyl transferase 85A3	-	1,46	1,08	1,53
	Eucgr.A02706	UDP-glucosyl transferase 88A1	-	2,45	-	-
	Eucgr.A02710	UDP-glucosyl transferase 88A1	-	1,27	-	-
	Eucgr.H00446	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-	-	-1,02	-
	Eucgr.A00945	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	1,09	-	1,87	1,12
	Eucgr.G02216	UDP-glucosyl transferase 85A3;UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-3,41	-	-	-
	Eucgr.C03411	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-	3,68	-	-
	Eucgr.C03414	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-	-	1,37	-

<b>UDP-glycosyltransferase family (GTF)</b>	Eucgr.F00343	UDP-glucosyl transferase 85A2	-	-	1,19	-
	Eucgr.B03993	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-	-	-	3,86
	Eucgr.H02441	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	-	-	-	2,00
	Eucgr.B00655	UDP-glucosyl transferase 89B1	-	-	-	1,35
	Eucgr.B03858	UDP-glucosyl transferase 88A1	-	-	-	1,31

Os genes induzidos (*up-regulated*) e os reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

**Anexo D** - Peroxidases e genes do sistema redox cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 18 e 24 hai

Familia gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R		Pool S	
			18 hai	24 hai	18 hai	24 hai
<b>Cytochrome P450 (CYP450)</b>	Eucgr.H04879	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 35	-	-	-	2,19
	Eucgr.H04878	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 25	-	-	-	1,84
	Eucgr.B03255	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 34	-	-	2,29	2,22
	Eucgr.J00477	cytochrome P450, family 94, subfamily C, polypeptide 1	-	-	1,71	1,74
	Eucgr.I00766	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 2	1,49	-	-	-
	Eucgr.D01027	cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 1	-	-	-	1,30
	Eucgr.B04037	cytochrome P450, family 714, subfamily A, polypeptide 1	-	-	1,12	1,13
	Eucgr.H01954	cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	-	-	-	1,39
	Eucgr.K03296	cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 1	-	-	1,11	1,51
	Eucgr.I00744	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8	-	-	1,30	-
	Eucgr.L01095	cytochrome p450 81d1	2,91	-	-	-
	Eucgr.K00274	cytochrome P450, family 715, subfamily A, polypeptide 1	1,77	-	-	-
	Eucgr.C04097	Cytochrome P450 superfamily protein	1,44	-	-	1,77
	Eucgr.B04030	cytochrome P450, family 714, subfamily A, polypeptide 1	1,14	-	-	1,36
	Eucgr.B03107	Cytochrome P450 superfamily protein	-	Inf	-	-
	Eucgr.D00302	cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 1	-	4,48	-	-
	Eucgr.F01396	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 15	-	-	Inf	-
	Eucgr.I00746	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8	-	-	1,92	-
	Eucgr.L01403	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 1	-	-	1,19	-

	Eucgr.L01403	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 1	-	-	-	1,21
	Eucgr.B03130	Cytochrome P450 superfamily protein	-	-	1,16	-
	Eucgr.H01145	cytochrome P450, family 89, subfamily A, polypeptide 5	-	-	1,11	1,74
	Eucgr.A02195	cytochrome P450, family 94, subfamily D, polypeptide 2	-	-	-2,04	-
	Eucgr.F01453	cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 1	-	-	-	1,15
<b><i>FAD-binding Berberine family</i></b>	Eucgr.D00070	FAD-binding Berberine family protein	-	-	-	1,88
	Eucgr.D01003	FAD-binding Berberine family protein	-	1,99	1,65	-
	Eucgr.D01004	FAD-binding Berberine family protein	-	-	1,71	-
	Eucgr.D00073	FAD-binding Berberine family protein	1,99	-	2,14	1,32
	Eucgr.D01005	FAD-binding Berberine family protein	-	1,25	-	-
	Eucgr.D00077	FAD-binding Berberine family protein	1,18	-	-	-
	Eucgr.D00078	FAD-binding Berberine family protein	1,02	-	-	-
	Eucgr.D00071	FAD-binding Berberine family protein	-	3,59	-	-
<b><i>FADNAD(P)-binding oxidoreductase family</i></b>	Eucgr.J03128	FADNAD(P)-binding oxidoreductase family protein	-	1,73	1,56	-
	Eucgr.I00273	FADNAD(P)-binding oxidoreductase family protein	-	-	-	2,38
	Eucgr.I01449	FADNAD(P)-binding oxidoreductase family protein	-	-	1,38	2,40
<b><i>2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily</i></b>	Eucgr.C01029	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	-	1,57
	Eucgr.A02644	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	1,46	1,08
	Eucgr.C01027	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,17	-	-	-
	Eucgr.J00951	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,34	1,24	-	1,50
	Eucgr.F02563	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,57	1,44	1,70	-
	Eucgr.I01203	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	1,67	-
	Eucgr.J03005	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	-	1,48

	Eucgr.K02978	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1,22	-	1,08	1,37
	Eucgr.H03111	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	1,70	-	-
	Eucgr.I01197	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	2,38	-	2,08
	Eucgr.K02429	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	1,40	-
	Eucgr.I01194	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	1,38	-
	Eucgr.A02642	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	1,29	-
	Eucgr.H03118	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	-Inf	-
	Eucgr.L00353	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	-	Inf
	Eucgr.F03711	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	-	2,12
	Eucgr.B02957	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-	-	-	1,15
	Eucgr.J01616	Peroxidase superfamily protein	-	-	-	3,11
	Eucgr.J01618	Peroxidase superfamily protein	-	-	Inf	-
	Eucgr.L02460	Peroxidase superfamily protein	1,32	-	-	1,72
<b>Peroxidasas (possíveis PR-9)</b>	Eucgr.J02352	Peroxidase superfamily protein	1,28	-	-	-
	Eucgr.K00806	Peroxidase superfamily protein	-	-	1,48	1,26
	Eucgr.K00808	Peroxidase superfamily protein	-	-	1,88	-
	Eucgr.A02147	Peroxidase superfamily protein	3,41	-	-	2,61
<b>Flavina monooxigenases</b>	Eucgr.D02484	Flavin-binding monooxygenase family protein	-	2,06	-	-
	Eucgr.G00316	Flavin-containing monooxygenase family protein	-	-	-	1,18

Os genes induzidos (*up-regulated*) e os reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

**Anexo E** - Genes relacionados à patogenicidade (PRs) e outros genes de defesa cujos níveis de expressão (*Log2 foldchange*) foram afetados por *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus* spp. às 18 e 24 hai

Família gênica	<i>E. grandis</i> Gene ID	Descrição GO	Pool R		Pool S	
			18 hai	24 hai	18 hai	24 hai
<b>PR-1</b>	Eucgr.L02505	pathogenesis-related gene 1	-	-	-	9,10
	Eucgr.L01707	pathogenesis-related gene 1	-	1,67	-	-
<b>PR-5</b>	Eucgr.A01288	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	-2,40	-	-	-
<b>PR-10 (MLP-like protein)</b>	Eucgr.H03995	MLP-like protein 423	-	-	2,65	2,59
	Eucgr.H04000	MLP-like protein 423	-	-	1,68	1,73
	Eucgr.H04009	MLP-like protein 423	-	-	2,25	1,91
	Eucgr.H03993	MLP-like protein 423	-	-	1,55	-
	Eucgr.H03988	MLP-like protein 423	-	-	2,12	3,51
	Eucgr.H04019	MLP-like protein 423	-	-	1,42	1,74
	Eucgr.H03997	MLP-like protein 423	-	-	1,60	2,08
	Eucgr.H03987	MLP-like protein 423	-	-	1,18	1,74
	Eucgr.I00894	MLP-like protein 423	-	-	1,60	-
	Eucgr.I00900	MLP-like protein 423	-	-	1,59	-
	Eucgr.A00125	MLP-like protein 423	-	1,73	-	-
	Eucgr.I00902	MLP-like protein 423	-	-	1,10	-
	Eucgr.H04012	MLP-like protein 423	-	-	1,07	1,25
	Eucgr.I00897	MLP-like protein 423	-	-	1,40	-
	Eucgr.H04017	MLP-like protein 423	-	-	1,30	1,49
	Eucgr.H03989	MLP-like protein 423	-	-	1,39	1,28

	Eucgr.H04018	MLP-like protein 423	-	-	1,35	1,19
	Eucgr.I00898	MLP-like protein 423	1,68	-	-	-
	Eucgr.H04003	MLP-like protein 423	-	-	1,09	1,20
	Eucgr.H04001	MLP-like protein 423	-	-	1,26	1,58
	Eucgr.H04016	MLP-like protein 423	-	-	1,18	1,61
	Eucgr.H04007	MLP-like protein 423	-	-	1,13	1,29
	Eucgr.H04002	MLP-like protein 423	-	-	-	1,13
	Eucgr.H03998	MLP-like protein 423	-	-	1,80	-
	Eucgr.A00133	MLP-like protein 423	1,96	-	-	1,93
	Eucgr.I00896	MLP-like protein 423	1,98	-	-	-
	Eucgr.A00172	MLP-like protein 423	-	1,94	-	-
	Eucgr.H04010	MLP-like protein 423	-	1,17	-	-
	Eucgr.H01082	MLP-like protein 423	-	-	1,16	1,21
	Eucgr.A00141	MLP-like protein 423	-	-	1,05	1,54
<b>Outros</b>	Eucgr.F02733	pathogenesis-related family protein	-	1,40	1,16	1,00
	Eucgr.C00383	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	1,73	-	1,29	-
	Eucgr.C00393	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	-	-	1,53	-
	Eucgr.C00395	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	-	-	1,10	-
<b>Quitinases</b>	Eucgr.L01120	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	-	-	1,82	-
	Eucgr.C04060	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	1,35	-	1,08	-
	Eucgr.L00615	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	-	-	1,13	-
	Eucgr.L02946	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain	2,22	-	-	-

	Eucgr.A00020	homolog of carrot EP3-3 chitinase	1,18	-	-	-
	Eucgr.A00021	homolog of carrot EP3-3 chitinase	1,19	-	-	-
	Eucgr.K02166	homolog of carrot EP3-3 chitinase	1,15	-	-	-
	Eucgr.I02267	basic chitinase	-	-	-3,57	-
	Eucgr.I02271	basic chitinase	-	-2,33	-2,89	-
	Eucgr.A00999	Chitinase family protein	1,36	-	-	-
<b>Fenilalanina amônia-liase (PAL)</b>	Eucgr.G02850	phenylalanine ammonia-lyase 2	-	-	1,07	-
	Eucgr.G02851	phenylalanine ammonia-lyase 2	1,52	-	-	-
	Eucgr.C03570	phenylalanine ammonia-lyase 2	-	-	-1,45	-
<b>Glicoproteína rica em hidroxiprolina abundantes de embriogênese tardia (LEA)</b>	Eucgr.J02118	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-	-	4,30
	Eucgr.J02116	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,50	-	-	3,09
	Eucgr.L02847	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2,02	1,82	-	-
	Eucgr.E00792	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-	2,19	2,33
	Eucgr.D01804	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,93	1,14	1,81	2,09
	Eucgr.E00793	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,72	-	1,92	-
	Eucgr.J02119	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-	-	2,28
	Eucgr.E00794	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,40	-	-	1,44
	Eucgr.J02115	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,71	-	1,43	3,22
	Eucgr.E00791	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,13	-	-	1,25
	Eucgr.E00795	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	2,43	-	1,36	-
	Eucgr.J02117	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,86	2,03	1,39	3,12

Eucgr.E00788	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-	1,75	2,72
Eucgr.F02922	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,11	-	-	2,08
Eucgr.L02846	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-	-	2,68
Eucgr.E00796	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-	-	1,88
Eucgr.E00095	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1,11	-	1,26	-
Eucgr.L03223	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	3,12	5,67	2,10	-
Eucgr.L02847	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-	1,59	3,18
Eucgr.E00803	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	-	-	1,22	1,96

Os genes induzidos (*up-regulated*) eos reprimidos (*down-regulated*) estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.