

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ANÁLISE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA BASAL À *Magnaporthe oryzae*

Fernanda Severo Nichele Mühle
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Fitotecnia / Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Severo Nichele Mühle, Fernanda
ANÁLISE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA BASAL À Magnaporthe
oryzae / Fernanda Severo Nichele Mühle. -- 2015.
99 f.

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. resistência basal. 2. arroz. 3. brusone. 4.
resistência genética. 5. magnaporthe oryzae. I.
Gravina de Moraes, Marcelo, orient. II. Título.

FERNANDA SEVERO NICHELE MÜHLE
Engenheira Agrônoma - UFRGS
Mestre em Desenvolvimento Rural - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 26.05.2015
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 06.03.2017
Por

MARCELO GRAVINA DE MORAES
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

RENATA PEREIRA DA CRUZ
Departamento de Plantas de Lavoura
Faculdade de Agronomia/UFRGS

ANDRÉIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA
FEPAGRO

GISELE ABIGAIL MONTAN TORRES
EMBRAPA Trigo
Passo Fundo/RS

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade
de Agronomia

DEDICO

Aos meus pais, Maria Elenita e Idelmar (in memoriam) por me ensinarem o poder do esforço, do trabalho e a importância do estudo e aquisição de conhecimento. E por proporcionarem a mim todas as condições para que me dedicasse exclusivamente aos meus estudos.

Ao meu marido, Thomas Mühle, pelo amor e companheirismo, e pelos puxões de orelha nas horas certas e o conforto amoroso nos momentos que mais necessitei.

Aos meus irmãos Idelmar, Marlise e Beatriz, pelo apoio e por acreditarem nas minhas escolhas.

Ao meu futuro filho, Vitor, que me acompanha no final deste doutorado e me deu forças para finalizar esta etapa.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor incondicional e por acreditarem nas minhas capacidades.

À família Mühle pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Ao professor e orientador Marcelo Gravina pela acolhida em seu laboratório, pelos ensinamentos, paciência e por todas as condições criadas para que este trabalho fosse realizado.

À coordenação do PPG e à Secretária Marisa Belo pela compreensão e apoio, e por todas as oportunidades a mim dadas.

À UFRGS e à Faculdade de Agronomia por todos os meus estudos, da graduação à pós-graduação.

Aos meus colegas de lab: Sara, Julie, Guilherme e Gustavo, pelos momentos de descontração, pelos ensinamentos e paciência em biologia molecular e pelo apoio em todos os momentos.

Às minhas queridas amigas de tempos Pri, Chris, Rô e Lú, que sempre me apoiaram, aconselharam e me alegraram.

Em especial a minha grande amiga Mônica que foi pessoa fundamental para que esta tese fosse concluída, com muita paciência e muitos puxões de orelha que me fizeram ir em frente e não desistir do meu objetivo profissional. Obrigada Moni!

À todos os funcionários e professores do Departamento de Fitossanidade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

ANÁLISE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA BASAL À *Magnaporthe oryzae*¹

Autor: Fernanda Severo Nichele Mühle

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

Oryza sativa (arroz) é um dos cereais mais produzidos no Brasil e no Rio Grande do Sul. Contudo, perdas na produção podem ocasionar alta dos preços e prejuízos aos produtores. A brusone do arroz, causada por *Magnaporthe oryzae*, é uma das doenças que mais causa danos à cultura. A resistência genética à *M. oryzae*, raça-específica, tem sido majoritariamente o objetivo do melhoramento genético. Entretanto, essa característica é pouco durável no campo. Uma alternativa é a resistência de não-hospedeiro ou resistência basal, que confere à planta resistência de amplo espectro e de maior durabilidade. Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos de resistência basal de genes selecionados e comparar as respostas de uma espécie hospedeira *O. sativa*, e uma espécie não-hospedeira, *A. thaliana*, frente à infecção por *M. oryzae*. Os genes *EDR1*, *OsRac1*, *SGT1*, *HSP90*, *STP1*, *WRKY89*, *WRKY 53* e *Spl11* foram selecionados através de busca *in silico* nas bases de dados de *O. sativa* e *A. thaliana*. Foram testadas as isolinhas de *O. sativa* (IRBL-5M-*Pi5*, IRBL1-CL-*Pi1*, IRBL12-M-*Pi12* e LTH) e mutantes dos genes escolhidos de *A. thaliana*. Nas duas espécies foram avaliadas a severidade da doença e as frequências dos eventos microscópicos desta interação em 4, 18, 24 e 120hai. Nas isolinhas de *O. sativa* ainda foi mensurada a expressão dos genes selecionados em 0, 4, 18 e 24hai. De acordo com os resultados obtidos quatro genes demonstraram alto potencial de envolvimento na resistência basal de *M. oryzae*: *STP1*, *WRKY53*, *WRKY89* e *HSP90*. Os genes *WRKY53* e *HSP90* foram fortemente induzidos nas primeiras horas após a inoculação, demonstram atuar na regulação negativa de todas as etapas da interação, e mostraram ser dependentes do gene de resistência de efeito maior na isolinha IRBL1-CL-*Pi1* e IRBL5-M-*Pi5*, respectivamente. O gene *STP1* está ligado à regulação negativa da etapa de germinação dos esporos, formação de apressório e infecção, evitando assim o estabelecimento do fungo no hospedeiro. Este gene evidenciou ser dependente do gene de resistência da isolinha IRBL5-M-*Pi5*. O gene *WRKY89* mostrou ter alto potencial para regulação positiva de respostas de defesa basal, e pode estar agindo na repressão do estabelecimento de *M. oryzae* nas células de *O. sativa*. De modo geral, a paralisação do estágio de infecção do fungo foi o momento que mais contribuiu para a resistência nas primeiras horas após a inoculação. Para todos os genes que apresentaram potencial relação com a regulação da resistência basal são necessários aprofundamentos das avaliações nos primeiros momentos principalmente em 4hai, como a observação da formação de papilas e espécies reativas de oxigênio.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (99f.) Maio, 2015.

GENETIC ANALISYS FOR BASAL RESISTANCE TO *Magnaphorte oryzae*¹

Author: Fernanda Severo Nichele Mühle

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Oryza sativa (rice) is one of the most commonly produced cereals in Brazil and in Rio Grande do Sul. However, losses in production may lead to high prices and losses for producers. Rice blast, caused by *Magnaporthe oryzae*, is one the diseases that causes losses in field. The genetic resistance to *M. oryzae*, specific to race, has been one of the major goals of genetic improvement. However, this feature is not durable in the field. An alternative is non-host resistance or basal resistance, causing the plant to have a broad spectrum of resistance and durability. This study aims to investigate the basal resistance mechanisms of selected genes and to compare the responses of a host species *O. sativa*, and a non-host species, *A. thaliana*, to infection by *M. oryzae*. The genes *EDR1*, *OsRac1*, *SGT1*, *HSP90*, *STP1*, *WRKY89*, *WRKY 53* and *Spl11* were chosen through search in silico in the database of *O. sativa* and *A. thaliana*. The isolines IRBL-5M-*Pi5*, IRBL1-CL-*Pi1*, IRBL12-M-*Pi12* and LTH were tested for *O. sativa* and the mutants of chosen genes of *A. thaliana*. In both species, disease severity and the frequency of microscopic events of this interaction in 4, 18, 24 and 120hpi. Expression of selected genes from 0, 4, 18 and 24hpi in the *O. sativa* isolines was also measured. According to the results, four genes showed high involvement potential in basal resistance of *M. oryzae*: *STP1*, *WRKY53*, *WRKY89* and *HSP90*. The *WRKY53* and *HSP90* genes were strongly induced in the first hours after inoculation and showed that they operate in down-regulating in all stages of the interaction, and showed to be dependent on the resistance gene in the isolate IRBL1-CL-*Pi1* and IRBL5-M-*Pi5*, respectively. The *STP1* gene is linked to negative regulation of the spore germination step, appressorium formation and infection, thus avoiding the establishment of the fungus in the host. This gene showed to be dependent on the resistance gene in the isolate IRBL5-M-*Pi5*. The *WRKY89* gene showed to have high potential for up-regulation of basal defense response, and may be acting in the repression of the establishment of *M. oryzae* in *O. sativa* cells. Generally, the halt of the fungus infection stage was the moment that most contributed to the strength in the hours post inoculation. Deeper evaluations are necessary to all the genes that showed potential relationship with the regulation of basal resistance, especially in 4hpi such as observation of the formation of pappilae and reactive oxygen species.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (99p.) May, 2015.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos específicos	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 <i>Magnaporthe oryzae</i>	6
2.1.1 Aspectos da infecção e patogenicidade.....	9
2.1.1.3 Formação do apressório, penetração e melanização	13
2.2 Mecanismos de defesa da planta: o sistema imune em ação	14
2.2.1 Resistência Basal.....	18
2.2.1.1 A resistência basal à <i>M. oryzae</i>	19
2.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> : uma ferramenta no estudo da resistência basal	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Seleção <i>in silico</i> de genes	27
3.2 Cultivo de mutantes de <i>A. thaliana</i> e isolinhas de <i>O. sativa</i>	28
3.3 Produção de inóculo e inoculações	28
3.4 Análise microscópica dos eventos de interação.....	30
3.5 Análise de severidade em <i>O. sativa</i> e <i>A. thaliana</i>	31
3.6 Análise da expressão gênica nas isolinhas de <i>O. sativa</i>	32
3.6.1 Extração de RNA e PCR em tempo real	32
3.6.2 Quantificação relativa via qPCR.....	34
3.7 Oligonucleotídeos iniciadores para <i>O. sativa</i> e <i>A. thaliana</i>	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Genes envolvidos na defesa basal.....	39
4.2 Avaliação dos mutantes de <i>A. thaliana</i>	43
4.2.1 Avaliações de severidade dos mutantes de <i>A. thaliana</i> x <i>M. oryzae</i>	44
4.2.2 Avaliações dos eventos microscópicos dos mutantes de <i>A. thaliana</i> x <i>M. oryzae</i>	47
4.3. Avaliação das Isolinhas de <i>O. sativa</i>	54
4.3.1 Avaliações de severidade das isolinhas de <i>O. sativa</i> x <i>M. oryzae</i>	54
4.3.2 Avaliações dos eventos microscópicos das isolinhas de <i>O. sativa</i> x <i>M. oryzae</i>	56
4.4 Quantificação da expressão relativa dos genes candidatos em plantas de <i>O. sativa</i>	60
4.5 Fluxo de ação do genes	64

	Página
5 CONCLUSÕES.....	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7 APÊNDICES	74

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Acessos dos mutantes de <i>A. thaliana</i> do banco de sementes da ABRC (<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>) da Universidade do Estado de Ohio. 2013	26
2. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para genes em <i>O. sativa</i>	38
3. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para genes em <i>A. thaliana</i>	38

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Fotomicrografia em microscopia eletrônica de <i>M. oryzae</i> . AP, apressório; CO, conídio	8
2. Infecção da célula hospedeira por <i>M. oryzae</i>	12
3. Teoria zigzag: co-evolução de respostas de defesa e de infecção entre patógeno e hospedeiro ao longo do tempo.....	16
4. Padrões de lesão, tipos de infecção e notas para classificação de reações suscetíveis ou resistentes das isolinhas do IRRI.....	35
5. Esquema de organização de dados dos valores de expressão gênica.	36
6. Severidade dada pela área média relativa de lesão em mutantes e ecótipo Columbia (Col-0) de <i>A. thaliana</i> inoculados com <i>M. oryzae</i>	45
7. Sintomas em plantas mutantes e ecótipo Columbia (Col-0) de <i>A. thaliana</i> causados por <i>M. oryzae</i> , 5 dias após a inoculação.....	47
8. Representação dos eventos microscópicos da interação <i>M. oryzae</i> x mutantes de <i>A. thaliana</i>	50
9. Ocorrência de eventos microscópicos na interação entre <i>M. oryzae</i> e <i>A. thaliana</i> em 0, 4, 18, 24 e 120 hai dos mutantes <i>wrky53</i> , <i>hsp90</i> , <i>osrac1</i> , <i>spl11</i> , <i>sgt1</i> , <i>wrky89</i> , <i>stp1</i> e <i>edr1</i>	52
10. Severidade das isolinhas IRBL1-CL- <i>Pi1</i> , IRBL5-M- <i>Pi5</i> , LTH e IRBM12-M – <i>Pi12</i> inoculadas com o isolado 41 da coleção de <i>M. oryzae</i>	55
11. Representação fotográfica de sintomas causados pelo isolado 41 da coleção de <i>M.oryzae</i> em folhas das isolinhas de <i>O. sativa</i> IRBL5-M-PI5 – Pi5, LTH, IRBL1-CL – Pi1 e IRBL12 –M – Pi12.....	56
12. Representação dos eventos microscópicos da interação <i>M. oryzae</i> x isolinhas de <i>O. sativa</i>	57

13. Ocorrência de eventos microscópicos na interação entre <i>M. oryzae</i> das isolinhas de <i>O. sativa</i> IRBL5-M-Pi5, IRBL1-CL-Pi1, LTH e IRBL12-M-Pi12..	59
14. Quantificação relativa da expressão dos genes <i>EDR1</i> , <i>SGT1</i> , <i>STP1</i> , <i>WRKY53</i> , <i>WRKY89</i> , <i>SPL11</i> , <i>OsRac1</i> e <i>HSP90</i> nas isolinhas IRBL5-M-Pi5 , IRBL1-CL-Pi1, LTH e IRBL12-M –Pi12.	63

RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Tabela comparativa dos genes escolhidos para as duas espécies de estudo, <i>O. sativa</i> e <i>A. thaliana</i>	74
2. Sequências FASTA de mRNA de <i>Oryza sativa</i> e <i>A. thaliana</i> dos genes <i>EDR1</i> , <i>HSP90</i> , <i>OsRAC1</i> , <i>SGT1</i> , <i>SPL11</i> , <i>STP1</i> , <i>WRKY 89</i> e <i>WRKY53</i>	75
3. Análise estatística da expressão relativa dos genes <i>EDR1</i> , <i>OsRac1</i> , <i>SGT1</i> , <i>HSP90</i> , <i>STP1</i> , <i>WRKY89</i> , <i>WRKY 53</i> e <i>Spl11</i>	83

1 INTRODUÇÃO

O. sativa é um dos cereais mais produzidos no Brasil e no Rio Grande do Sul, sendo um grão constante na cesta básica e na alimentação diária da população. Contudo, perdas na produção podem ocasionar alta dos preços ao consumidor e prejuízos aos produtores. Uma das doenças de maior relevância nesta cultura é a brusone, a qual pode levar a perdas de 20 a 100 % na lavoura e está presente em todas as regiões produtoras do país e de outros países.

A brusone do arroz é causada por *Magnaporthe oryzae*, um fungo hemibiotrófico que infecta diversas partes da planta. Quando afeta a panícula pode comprometer o enchimento dos grãos ou então causar a quebra e morte da panícula. Esta doença é combatida por meio de controle químico, com o uso de fungicidas, e pelo controle genético, baseado na ação de genes que conferem resistência. Este último tem grande importância, pois pode reduzir o uso de produtos onerosos e nocivos ao ambiente.

A resistência à *M. oryzae*, denominada raça-específica, tem sido majoritariamente o objetivo do melhoramento. Entretanto, essa característica é, em geral, pouco durável no campo. Uma alternativa é a resistência de não-hospedeiro ou basal, que confere à planta resistência de amplo espectro e de maior durabilidade. Este fenômeno se caracteriza pela resposta de defesa de plantas a espécies de patógenos que

possuem a capacidade de infectar outras espécies vegetais, ou seja, não é específica à uma determinada raça. Ocorre quando o micro-organismo possui capacidade para penetrar na planta, porém não encontra condições favoráveis para colonizar e se reproduzir, não causando, assim, sintomas e conseqüentemente reduzindo os danos à cultura.

As respostas de defesa contra infecção por patógenos são ativadas através de mecanismos de percepção e transdução de sinais, dependentes da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno. Para o melhoramento vegetal, o estudo da resistência basal pode contribuir para a seleção de genes ou proteínas envolvidos na resistência a patógenos, e na posterior transferência destes genes para outras plantas, seja via cruzamentos ou pela obtenção de plantas transgênicas. A fim de facilitar e acelerar a caracterização destes mecanismos, plantas modelo vêm sendo utilizadas, devido à grande quantidade de informação genética e fisiológica disponível sobre as mesmas.

Uma planta modelo largamente utilizada é *Arabidopsis thaliana*, tendo em vista a abundância de informações sobre sua biologia, genoma, funções gênicas além do ajuste de técnicas para análise de expressão, e análise genética como silenciamento e superexpressão de genes. *A. thaliana* foi empregada em estudos para investigação da resistência basal e demonstrou resistência de não-hospedeiro a diversos patógenos, mostrando-se uma planta adequada a este tipo de análise.

Da mesma forma, uma análise sistêmica pode auxiliar na investigação de mecanismos da resistência basal. Esta abordagem compreende o estudo simultâneo dos processos envolvidos na ação de genes e mecanismos de defesa. Ou seja, os eventos microscópicos e de expressão gênica são observados e correlacionados com a resposta

de defesa ao mesmo tempo e no mesmo espaço. Neste caso, a análise sistêmica engloba a análise da expressão gênica, assim como os eventos espaciais a nível celular e sintomatológico da Brusone em *A. thaliana* (não-hospedeiro) e *O. sativa* (hospedeiro), com foco na resistência basal.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo investigar os mecanismos de resistência basal de genes selecionados e comparar as respostas de uma espécie hospedeira *Oryza sativa*, e uma espécie não-hospedeira, *Arabidopsis thaliana*, frente à infecção por *Magnaporthe oryzae*.

1.1 Objetivos específicos

1) Selecionar genes de *O. sativa* e *A. thaliana* via análise *in silico* que estão envolvidos na defesa basal contra *M. oryzae*

Hipótese 1: As espécies de plantas utilizam genes similares para defesa basal contra patógenos. Os genes que estão envolvidos na defesa a microrganismos em *A. thaliana* devem atuar da mesma maneira em *O. sativa*.

Estratégias de ação: A pesquisa foi realizada *in silico* nas bases de dados de *O. sativa* e *A. thaliana*. Foram selecionados genes que estão envolvidos na resistência e estão presentes nas duas espécies. Adicionalmente procurou-se estudos aprofundados em mecanismos de defesa basal para confirmação de que não existem informações sobre os genes selecionados. Desta forma, os genes foram comparados a partir de informações obtidas sobre função e sequência de nucleotídeos dos mesmos.

2) Verificar quais dos genes investigados têm relação com a resistência basal.

Hipótese 2: As respostas de defesa desencadeadas pelos genes selecionados no objetivo 1, que ocorreram nos tempos iniciais à inoculação e

sem desenvolvimento de sintomas, na planta hospedeira, são coordenadas pelos genes envolvidos na resistência basal. Plantas que não possuem os genes envolvidos na resistência basal apresentam sintomas.

Estratégias de ação: Avaliar a expressão espacial e temporal de genes candidatos e a sua relação com alterações citológicas nas plantas, em resposta à infecção por *M. oryzae*. Foram adquiridas sementes de isolinhas de *O. sativa* e mutantes dos genes candidatos de *A. thaliana*. Nas isolinhas de *O. sativa* (hospedeiro), foram analisados a expressão gênica em tempo real, e o avanço de sintomas e contagem de eventos microscópicos de infecção. Nos mutantes de *A. thaliana* foram observados quais apresentaram sintomas sob infecção pelo patógeno, em nível macro e microscópico. Nestas plantas, o desenvolvimento da doença foi avaliado pela mensuração da área afetada por folha. Cada uma das avaliações ocorreu em tempos iguais para as duas espécies.

3) Verificar se os genes envolvidos na resistência basal têm papel importante também na planta hospedeira.

Hipótese 3: Quando comparadas as respostas dos mutantes de *A. thaliana* e das isolinhas de *O. sativa* submetidos à infecção por *M. oryzae*, estas se conservam e se complementam. Ou seja, quando um gene está ligado a defesa basal, as isolinhas de *O. sativa* apresentam maior resistência e maior nível de expressão, enquanto os mutantes de *A. thaliana* demonstram maior severidade da doença.

Estratégias de ação: Comparar as respostas de defesa *in vivo* em plantas de *O. sativa* com as respostas em relação à *A. thaliana* quanto à resistência basal sob infecção por *M. oryzae*. A comparação foi realizada tempo a tempo e gene a

gene, entre as isolinhas de *O. sativa* e os mutantes de *A. thaliana* com base na análise da expressão gênica, análise microscópica e no desenvolvimento de sintomas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Magnaporthe oryzae*

A brusone do arroz está presente em todas as regiões produtoras de *O. sativa* no mundo e pode comprometer até 100% da lavoura. Os sintomas são manchas nas folhas, alongadas com borda irregular, elípticas, com o centro acinzentado. Devido a formação de lesões, as folhas podem coalescer e causar a morte da planta. Outro sintoma chamado brusone de “pescoço” caracterizado pela infecção no primeiro nó, abaixo da panícula, pode comprometer a panícula e o rendimento de grãos (Talbot, 2003).

A infecção inicia quando o conídio entra em contato com a superfície da folha ou órgão da planta e se adere à cutícula através de um adesivo presente no compartimento apical do esporo (Talbot, 2003). Os conídios são dispersos através do vento em longas distâncias (até 1000 metros) (Urashima et al., 2007) ou então pelas gotas de orvalho ou chuva, planta a planta.

A germinação é bastante rápida e em apenas duas horas o tubo germinativo já está formado e logo o apressório, sendo necessária água livre na superfície para que ocorra este processo. O *peg* de penetração do apressório é formado e o sítio de onde emerge é visível como um poro no apressório. O *peg* é formado por diversos filamentos, filossomos e microtúbulos, e a penetração via cutícula do tecido vegetal é resultado da

aplicação da pressão de turgor que pode chegar a 8 MPa (Talbot, 2003; Dean et al., 2005). As condições ideais a campo para que ocorra a doença são alta umidade do ar (acima de 90%), temperaturas entre 24 e 28°C e dias nublados (Lima, 2004). Novas lesões podem aparecer após quatro dias do início da infecção.

Magnaporthe oryzae (anamorfo de *Pyricularia oryzae* cav.) é um fungo ascomiceto filamentoso heterotático. Possui uma fase biotrófica e outra necrotrófica, sendo, portanto, considerado patógeno hemibiotrófico (Khang et al., 2010). Possui sete cromossomos, e um genoma com aproximadamente 11.000 genes (Dean et al., 2005). Este patógeno é haplóide e produz esporos chamados conídios, os quais estão presos aos conidióforos, geralmente em número de três. O conídio consiste de três células, são hialinos, em forma de pêra (piriformes).

Cada um dos conídios possui uma glicoproteína adesiva que adere o esporo à superfície da folha hospedeira. O conídio tem a capacidade de germinar rapidamente em um dos pólos. Ao final deste tubo germinativo, uma formação inchada e achatada cujas células entram em divisão mitótica, formam o apressório. O apressório se diferencia por ter uma parede celular engrossada e melanizada. (Figura 1).

Além da reprodução assexuada por conídios, existe outro aspecto reprodutivo de importância para a variabilidade de *M. oryzae*, o ciclo parassexual. O termo parassexualidade foi descrito por Pontecorvo (1956) e define os processos de reprodução que resultam na obtenção de recombinantes entre linhagens fúngicas. Dentre outros eventos, a recombinação intracromossomal (*crossing over*) e a recombinação intercromossomal (não-disjuncional), que ocorrem no ciclo parassexual, contribuem para a variabilidade genética dos fungos (Crawford et al., 1986, Barcellos & Pizzirani-Kleiner, 2003).

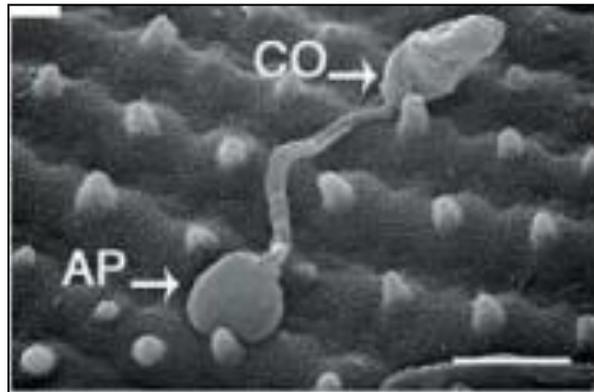


FIGURA 1. Fotomicrografia em microscopia eletrônica de *M. oryzae*. AP, apressório; CO, conídio. Fonte: Dean et al., 2005.

Evidências científicas mostraram que a especificidade ao hospedeiro é governada pela teoria gene-a-gene de Flor (Silué et al., 1992), e que existe grande variabilidade genética deste patógeno no ambiente (Leung et al., 1988; Borromeo et al., 1993; Talbot et al., 1993; Shi & Leung, 1995; Couch et al., 2005; Lara-Álvarez et al., 2010). Esta alta variabilidade está ligada à instabilidade genética de isolados no campo, seja esta determinada por mutações, seleção, transmissão de genes entre populações e recombinações genéticas. Através destes eventos podem ocorrer a má formação de estruturas, como apressório e hifas infectivas, a estruturação química diferenciada da membrana externa do conídio, como a cutina, ou a alteração da fertilidade e reprodução do fungo (Valent & Chumley, 1991; Zeigler, 1998; Kong et al., 2012). Estas características diferenciadas podem adicionar ao patógeno a habilidade de causar doença em outras espécies, como cevada e trigo, e ainda demonstram possuir alta especificidade quanto ao isolado e seu hospedeiro (Talbot, 2003).

M. oryzae é utilizado como organismo modelo para o esclarecimento de diversos aspectos de patogenicidade e especificidade do hospedeiro, descobertas estas que

auxiliam no entendimento de outros patossistemas (Valent, 1990). Novos aspectos desta interação como biologia da patogenicidade, sistema de sinalização, expressão gênica, estrutura genômica, variabilidade de isolados, mapeamento de genes de avirulência e de genes de resistência e epidemiologia, são descritos na literatura (Liu et al., 2010).

2.1.1 Aspectos da infecção e patogenicidade

Alguns aspectos específicos sobre a infecção e a patogenicidade na interação *M. oryzae* x *O. sativa* devem ser elucidados para a presente pesquisa. Características observadas a nível citológico e bioquímico podem acrescentar informações relevantes para a análise de eventos tanto relacionados à resistência quanto à suscetibilidade ao patógeno.

2.1.1.1 Barreiras à infecção

Os eventos infecciosos decorrentes da interação entre a planta hospedeira e o patógeno são compostos de diversas reações químicas nas células do hospedeiro na tentativa de resistir à infecção. O reconhecimento de um pelo outro ocorre através de uma cascata de sinais determinados pela ação de ETIs (*effector-triggered immunity*) e PTIs (*PAMP-triggered immunity*), cujas consequências são a resistência quando a planta consegue neutralizar todas as estratégias do patógeno e suscetibilidade quando a planta não o faz (Schneider & Collmer, 2010). Uma forma de elucidar os mecanismos microscópicos decorrentes destas sinalizações, nas reações de resistência e suscetibilidade e seus limites, é a observação sistemática das relações de tempo e espaço entre a infecção e a colonização do fungo no tecido vegetal.

Entre os diversos eventos pode-se destacar a morte celular localizada induzida, a formação de papilas e a lignificação da parede celular como resposta ao ataque do patógeno. A primeira resposta da planta ao patógeno é a tentativa de inibição da infecção ou estabelecimento de sua estrutura reprodutiva, o esporo, na superfície do tecido. Chamada de resistência basal, essa resposta culmina na indução de defesa apoplástica para a inibição das enzimas microbianas, reforço da parede celular ou intoxicação do patógeno (Schneider & Collmer, 2010). As proteínas relacionadas à patogênese, secretadas durante as respostas basais de resistência, são as quitinases, glucanases, tioninas, osmotinas, proteases e defensinas.

A reação de hipersensibilidade, reação rápida de resposta à infecção pelo patógeno, leva à morte celular localizada restringindo o patógeno a uma área menor. Esta é uma forte reação de defesa que pode estar ligada ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), de proteínas antimicrobianas e fitoalexinas, que impedem o crescimento de patógenos biotróficos ou hemibiotróficos. Assim, o papel da morte celular associada à reação de hipersensibilidade é complexo e pode depender também do tempo de acionamento dessa reação. Patógenos hemibiotróficos, passada sua fase inicial biotrófica, podem utilizar a morte celular como meio de nutrir-se e colonizar o tecido vegetal infectado. A produção de ROS pelo consumo de oxigênio molecular durante as interações patógeno-hospedeiro é chamada de explosão oxidativa. As espécies reativas de oxigênio mais importantes são o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o radical hidroperóxido ($\text{HO}_2\cdot$), o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e a espécie reativa de nitrogênio relacionada óxido nítrico (NO) (Greenberg & Yao, 2004; Shetty et al., 2008; Bhatacharjee, 2012; Barna, 2012).

A deposição local de componentes da parede celular, como a calose, é crucial para a resistência à penetração. A parede celular através da lignificação torna-se mais

resistente à pressão mecânica aplicada durante a penetração pelo apressório do fungo, a qual é relatada como uma das maiores pressões de turgor já conhecidas (Bechinger et al., 1999). A calose é um constituinte geral das aposições defensivas de parede celular, portanto, ela provavelmente constitui um importante fator de resistência à penetração contra patógenos invasores. Observações microscópicas de folhas de *O. sativa* inoculadas com *M. oryzae* revelaram a deposição de calose e reação de hipersensibilidade, claramente visíveis em interações incompatíveis, e o desenvolvimento livre de hifas infectivas em interações compatíveis (Kim et al., 2004). Assim como as aposições da parede celular que previnem contra a penetração de patógenos, as papilas têm componentes e organização celular distintos das células normais. Após este momento essas proteínas continuam a se acumular na papila, o que pode ser constatado pelo aumento na intensidade de coloração e do tamanho das áreas com formação de papilas coradas (Zeyen et al., 2002).

2.1.1.2 O caminho da infecção e a sinalização dos efetores citoplasmáticos

A infecção por hemibiotróficos é caracterizada por uma fase inicial biotrófica, onde a célula é invadida pelas estruturas infectivas do patógeno e a sinalização é mediada por efetores citoplasmáticos (proteínas que minimizam as defesas da planta e assumem o controle), sem que haja morte celular. A fase seguinte é a necrotrófica, onde a célula infectada coalesce assim que a estrutura infectiva fúngica adentra na célula adjacente (Schneider & Collmer, 2010; Khang et al., 2010; Horbach et al., 2011).

A biotrofia em *M. oryzae* inicia com invasões sucessivas da célula da epiderme de *O. sativa* através da hifa invasiva intracelular, que está circundada por uma membrana hifal extra-invasiva derivada da planta. O fungo então cresce como uma hifa

filamentosa fina, chamada de hifa primária. Na extremidade desta hifa é encontrada uma região onde estão concentrados os efetores citoplasmáticos (complexo interfacial biotrófico - *BIC*), os quais irão interferir nas defesas da célula, possibilitando o desenvolvimento da hifa invasiva por toda a sua extensão (Figura 2) (Schneider & Collmer, 2010; Khang et al., 2010; Horbach et al., 2011).

A hifa invasiva se diferencia em um formato mais espesso, similar a um bulbo, e em até dez horas após o início da infecção pode colonizar todo o citoplasma da célula. Quando não existir mais espaço para colonização o processo se reinicia através da colonização da célula adjacente, seja da epiderme ou do mesófilo. Após a formação da hifa invasiva ou da hifa filamentosa uma nova região de *BICs* se forma na nova célula garantindo a sobrevivência do fungo, e simultaneamente o *BIC* da célula anterior é desativado. Esta célula entra então na fase necrotrófica e é degradada. (Figura 2) (Khang et al., 2010).

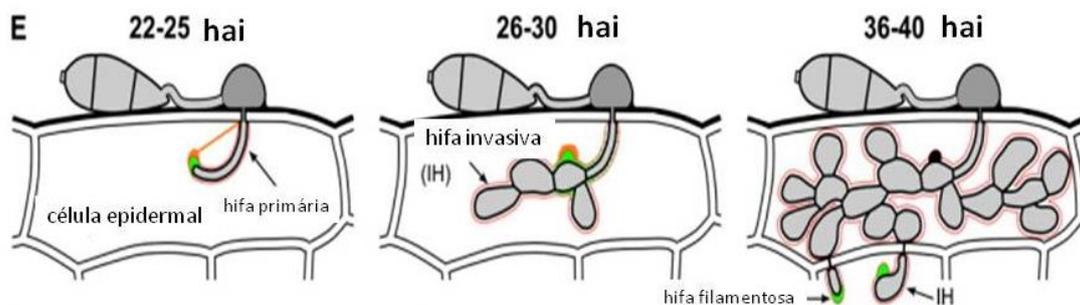


FIGURA 2. Infecção da célula hospedeira por *M. oryzae*. 22- 25 horas após inoculação (hai): hifa primária infecta célula epidermal de *O. sativa*, região *BICs* é acionada (em verde); 26-30 hai: hifa invasiva coloniza a célula hospedeira; 36-40 hai: hifa infectiva filamentosa invade a célula adjacente, região *BICs* é transferida para célula adjacente. (Adaptado de Khang et al., 2010)

2.1.1.3 Formação do apressório, penetração e melanização

A indução para formação do apressório ocorre entre duas e quatro horas após a deposição do conídio na superfície do hospedeiro (Howard & Valent, 1996). O crescimento e diferenciação do tubo germinativo em apressório dependerá do substrato com o qual este está em contato, seja físico ou químico como topografia da superfície, fluxo de íons, pedaços de cera da folha (Howard & Valent, 1996; Deising et al., 2000).

O apressório é um tipo de célula especializada na penetração do tecido hospedeira, seja através do uso da força ou por enzimas. Contudo, a aderência mediada por glicoproteínas da matriz celular tem papel fundamental, pois para que seja aplicada adequada pressão de turgor o apressório deve estar fortemente aderido à parede. A característica achatada na base para se adaptar à topografia indica uma melhor condição para aderência do apressório à superfície (Howard & Valent, 1996; Deising et al., 2000).

A fase final da formação do apressório compreende a deposição de uma camada de melanina em toda sua extensão, exceto na região achatada chamada de poro do apressório que está em contato com o substrato (Howard & Valent, 1996). A melanina é um pigmento de alto peso molecular, formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos que geralmente se apresentam em coloração marrom escuro ou preto (Jacobson, 2000).

Alguns estudos revelaram que patógenos sem melanina não obtinham sucesso na infecção se comparados com os que as produziam, tanto em comparações com isolados de diferentes fungos (Jacobson, 2000), quanto com mutantes sem produção de melanina (Chumley & Valent, 1990). A simples observação em microscopia óptica de campo

claro pode revelar esta coloração, que no caso do *M. oryzae*, sempre se apresenta na coloração marrom escura.

M. oryzae produz um pigmento cinza distinto, um tipo de melanina produzido pela biossíntese do policetídeo (metabólito secundário biossintetizado através da condensação de unidades de acetila ou malonila), a polimerização do 1,8 dehidroxinaftaleno (DHN). A melanina DHN é responsável pelo aumento da pressão hidrostática do apressório. Esta alta pressão fornece a força motriz essencial para a penetração mecânica da célula hospederia (Wolkov et al., 1983; Howard & Ferrari, 1989; Chumley & Valent, 1990; Howard & Valent, 1996; Jacobson, 2000).

2.2 Mecanismos de defesa da planta: o sistema imune em ação

As plantas estão constantemente expostas a diversos microrganismos que podem afetar seus processos metabólicos via infecção e obtenção de nutrientes para sua multiplicação e desenvolvimento. Segundo Coll et al. (2011), as plantas são organismos sésseis que não possuem um sistema circulatório e suas células estão emolduradas por uma rígida parede celular. No processo evolutivo, por estes dois motivos, as células vegetais desenvolveram um sistema imune autônomo. Este é responsável por discriminar danos causados por agentes externos e os causados por produtos da própria célula vegetal através de uma frente de respostas de defesa, que irá combater possíveis infecções e manter o bom funcionamento de todos os processos biológicos.

A resistência, que também é chamada de imunidade por alguns autores, é o resultado bem sucedido da capacidade de defesa, dirigida pelo sistema imune do hospedeiro, contra a infecção de um patógeno. O modelo atual para resistência explica a existência de “camadas” de defesa. A primeira camada consiste de barreiras pré-

formadas que bloqueiam ou inibem o crescimento do patógeno, como cutícula, espessamento da parede celular e expressão de genes constitutivos relacionados à defesa de amplo espectro. A segunda camada se caracteriza pelo reconhecimento de moléculas do patógeno por receptores da planta. E a terceira camada consiste de proteínas formadas dentro da célula que reconhecem os efetores do patógeno (Coll et al., 2011; Delteil et al., 2012).

O sistema imune funciona de duas formas principais, e que irão conferir resistência à infecção por patógenos. Uma é a defesa desencadeada pelo reconhecimento dos efetores do patógeno (moléculas produtos do patógeno) chamada ETI (*effector-triggered immunity*). Os efetores são moléculas de alta variabilidade entre isolados de uma espécie de patógeno, e são reconhecidas por produtos polimórficos de proteínas NB-LRR codificados pelos genes R. Os domínios NB-LRR (*nucleotide binding-leucine rich repeat*) ao reconhecer os efetores do patógenos ativam as respostas de defesa (Jones & Dangl, 2006). A defesa conferida por ETI é mais específica, de maior intensidade e menos durável no campo quando comparada à defesa conferida por PTI (*PAMP-triggered immunity*) (Chen & Ronald, 2011).

De outra forma, a defesa desencadeada pelo reconhecimento transmembrana, é chamada PTI. Os PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) ou MAMPs (*microbial associated molecular patterns*), que são moléculas conservadas dos patógenos como quitina em fungos e flagelina em bactérias, são reconhecidos pelos sensores do hospedeiro, também conhecidos por receptores padrão de reconhecimento, os PRRs (*pattern recognition receptors*). Os PAMPs são moléculas conservadas entre diversos isolados e mesmo entre espécies distintas de patógenos sendo essenciais para patogenicidade e sobrevivência destes microrganismos. Desta forma, a defesa resultante

de PTI é não específica e pode ser mais durável no campo quando comparada a ETI (Jones & Dangl, 2006; Tsuda & Katagiri, 2010; Chen & Ronald, 2011).

É necessário salientar que o sistema imune não é estático, e que existe uma co-evolução de processos entre os patógenos e as plantas, ou seja, no momento em que surge uma estirpe de patógeno que é capaz de superar mecanismos de defesa desenvolvidos pela planta, a planta, por sua vez, também desenvolve novas barreiras físicas ou bioquímicas que conferem resistência a tal estirpe. Essa co-evolução ocorre ao longo dos anos e pode melhor ser explicada pela Teoria Zigzag (Jones & Dangl, 2006), que inclui a resposta por PTI.

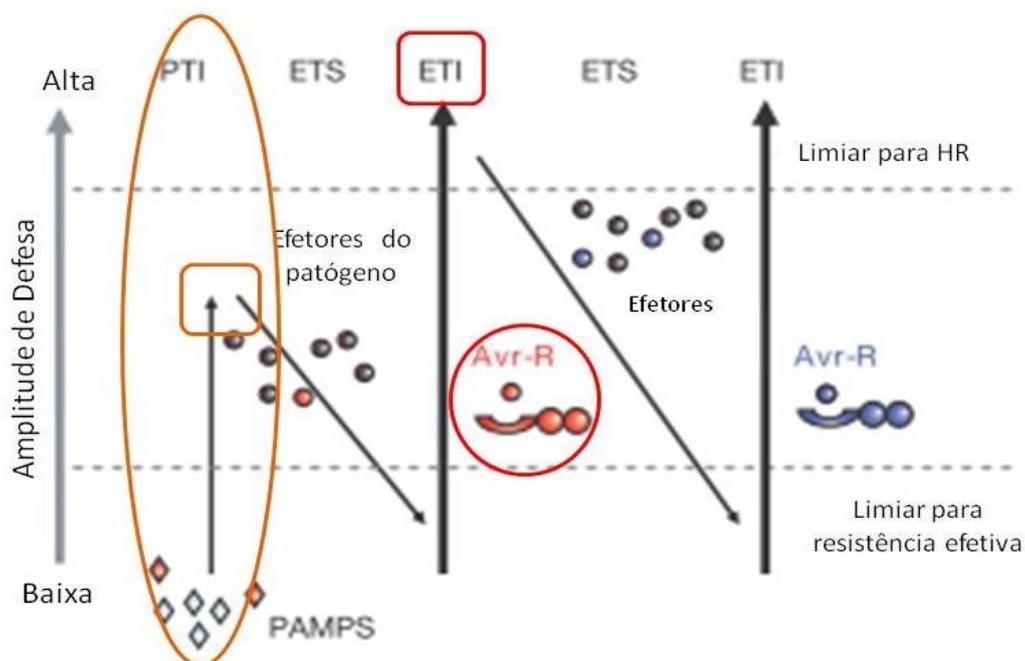


FIGURA 3. Teoria zigzag: co-evolução de respostas de defesa e de infecção entre patógeno e hospedeiro ao longo do tempo (Adaptado de Jones & Dangl, 2006).

A Teoria Zigzag (Figura 3) divide o processo coevolutivo em quatro fases principais. Na fase 1 os PAMPs são reconhecidos pelos PRRs e resultam na defesa por

PTI que impede o processo de colonização, e podem não aparecer sintomas. Ao passar do tempo, ocorre a fase 2, na qual os patógenos desenvolvem efetores que são capazes de superar os PRRs e contribuem para a sua virulência. A PTI então é superada e resulta na suscetibilidade da planta, chamada de ETS (*effector-triggered susceptibility*), a amplitude de defesa diminui e ocorrem danos aos tecidos da planta. Ao longo dos anos surgem as proteínas NB-LRR que codificam os genes R e que são capazes de reconhecer efetores específicos do patógeno (Avr), ocorrendo então a fase 3, caracterizada por uma resposta mais rápida e de mais alta amplitude de defesa do que em PTI, a ETI. Normalmente a ETI pode vir com reação de hipersensibilidade no sítio de infecção. A seleção natural ao passar do tempo direciona os patógenos à diversificação ou ao desenvolvimento de novos efetores que irão suprimir a ETI, causando novamente a doença nestas plantas. Da mesma forma, as plantas através da seleção natural ou do homem são direcionadas para a supressão da doença com a utilização de outros genes R e acabando por desencadear novamente a ETI.

Diante da alta variabilidade deste patógeno, os estudos voltados para investigação de genes de resistência em planta, um método de controle mais efetivo e economicamente viável para a doença, foram intensificados. Desde então, aproximadamente 100 genes de resistência em arroz foram listados por pesquisadores, e, dentre estes, genes da família multigene *Pi*, a mais importante da cultura (Liu et al., 2010; Zhu et al., 2012; Trang et al., 2012).

Evidências sugerem que a resistência de amplo espectro, que se caracteriza por uma resistência mais durável, requer a presença simultânea de inúmeros genes de resistência não-específicos a raça (Shidhar et al., 1999; Kou & Wang, 2010; Zhu et al., 2012). Pesquisas realizadas em diversos patossistemas têm demonstrado que uma alternativa para a obtenção de resistência mais durável pode ser obtida através de

estudos feitos em não-hospedeiros, resultando na caracterização da resistência basal, não específica a raça (Lipka et al., 2008; Hiruma et al., 2011; Maeda et al, 2010; An & Mou, 2012; Hiruma & Takano, 2011; Lan et al., 2012; Nakao et al., 2011).

2.2.1 Resistência Basal

Muitas plantas são resistentes a todas as estirpes de uma dada espécie de microrganismo. Os microrganismos que são fitopatogênicos e são incapazes de infectar qualquer cultivar de uma espécie de planta são chamados de patógenos heterólogos. E as plantas que são resistentes a todos os isolados de uma dada espécie de patógeno são chamadas planta não-hospedeira (Nürnberger & Lipka, 2005).

Sabe-se que este tipo de resistência está relacionado a distintos mecanismos de defesa. Barreiras pré-formadas presentes na superfície como camadas de cera, rigidez da parede celular e metabólitos antimicrobianos secundários estão envolvidos na paralisação do desenvolvimento da estrutura de infecção do patógeno (Nürnberger & Lipka, 2005, Nakao et al., 2011, An & Mou, 2012,). Já o reconhecimento da tentativa de infecção dá-se na membrana plasmática das células das plantas a partir da ativação de respostas de defesas basais desencadeadas pelos PAMPs, os PRRs (Coll et al, 2011; Delteil et al, 2012).

As barreiras físicas começam a se formar logo após os primeiros indícios de presença do patógeno. Um rearranjo do citoesqueleto envolvendo os microfilamentos de actina e agregação citoplasmática do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi ocorre no sítio de penetração do patógeno. Estas mudanças ocorrem para facilitar a deposição de material celular necessário para aumentar barreiras físicas e químicas (Holub & Cooper, 2004).

Embora alguns aspectos da PTI ainda não estejam suficientemente esclarecidos, diversos PRRs vêm sendo descobertos no estudo de muitos patossistemas, e estes podem ser úteis no desenvolvimento de ferramentas genéticas eficientes para construção de plantas resistentes. Segundo pesquisas com diversas espécies, e especialmente com *A. thaliana*, uma série de genes estão envolvidos na defesa basal como *PEN1*, *PEN2*, *PEN3*, *ETR1*, *NHO1*, *ETS1*, *SGT1*, *PAD4*, *SAG101*, *WIPK*, *Hsp70* e *Hsp90*, *PAD2*, *PAD3*, *AGBI*, *PMR5*, *MLO2*, *EDR1*, *ROR1*, *ROR2* e *FLS2*, em diferentes patossistemas (Uma et al., 2011, Feng et al., 2011, Fan & Doerner, 2012).

Estudos feitos com espécies hospedeiras, além de plantas modelos, também demonstram resultados relevantes, como na pesquisa feita por Zellerhoff et al. (2010) em cevada. Estes pesquisadores utilizaram isolados virulentos (adaptados ao hospedeiro) e não-virulentos (não-adaptados ao hospedeiro) de três gêneros de fungos: *Blumeria*, *Puccinia* e *Magnaporthe* para verificar as respostas transcricionais de defesa, principalmente a diferença entre isolados adaptados e não-adaptados. Os resultados do estudo apontam para o aumento considerável de respostas transcricionais no caso de isolados não-virulentos. Para *Magnaporthe* e *Blumeria*, as respostas foram fortemente correlacionadas com as respostas de outra linhagem de cevada a qual possuía os alelos *wild-type* e *mlo5* do gene *Mlo*, que conferem resistência basal ao oídio da cevada, além da expressão similar de diversas categorias de genes entre os isolados.

2.2.1.1 A resistência basal à *M. oryzae*

A pesquisa vem avançando na busca por variedades resistentes em inúmeros patossistemas, devido à descoberta de novos genes e mecanismos de resistência basal. Foram descritos genes e mecanismos de defesa que estão envolvidos na resistência basal

em resposta a infecção por *M. oryzae*. Estes estudos foram realizados tanto com o uso de *A. thaliana*, quanto com a espécie hospedeira, *O. sativa*.

Um estudo realizado por Maeda et al. (2009) demonstrou que *A. thaliana* poderia ser utilizada para entender o mecanismo de resistência basal à *M. oryzae*. Os resultados revelaram que os genes *AGBI* e *PMR5* contribuem para a resistência de pré-invasão mediada por *PEN2*. Após, estes resultados serviram de base teórica e prática para Nakao et al. (2011) investigarem quais eram as funções exatas de cada um destes genes na resistência basal, sabendo que *PEN2* está envolvido na resposta à penetração, e *PMR5* e *AGBI* são fatores reguladores positivos para resistência à penetração.

Ainda, investigaram a ação do gene *MLO* mutante que confere resistência à oídio, porém aumenta a suscetibilidade à *M. oryzae* e o gene *pi21*, o qual confere resistência ao crescimento de hifas nas células hospedeiras. Os resultados deste trabalho confirmaram que os genes *PEN2*, *AGBI*, *PMR5* e *MLO* têm função tanto na penetração quanto na fase de pós-penetração, ou seja, estes agem na diminuição da taxa de penetração, no alongamento das hifas e no crescimento das hifas para células adjacentes tanto da epiderme quanto do mesófilo. O gene *pi21* mostrou agir na diminuição do crescimento de hifas na epiderme. A conclusão do trabalho foi que esses genes têm ação efetiva na resistência basal de *A. thaliana* à *M. oryzae* e podem contribuir para aumento da resistência de plantas de *O. sativa*.

Da mesma forma que os genes acima citados, Berri et al. (2009) descreveram 24 diferentes membros da família WRKY, em plantas de *O. sativa*, relacionados com testes em condições de estresse. Alguns destes membros expressaram reações similares quando testados em *A. thaliana*. Sabe-se que os fatores de transcrição reunidos na

família WRKY estão envolvidos nas respostas a estresses abióticos e bióticos (Berri et al., 2009; Chen & Ronald, 2012).

Lan et al. (2012) caracterizaram a função do fator de transcrição, isolado em *O. sativa*, *OsWRKY77*, no patossistema *A. thaliana* x *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC300 (*PstDC300*). Segundo os resultados observados, *OsWRKY77* reprimiu o crescimento da bactéria, e os genes de defesa *PR1*, *PR2* e *PR5* tiveram os níveis de expressão aumentados. Com base nestes eventos observou-se a diminuição da suscetibilidade das plantas, e pode-se inferir que este fator de transcrição é um regulador positivo da expressão de genes PR, e é um regulador da resistência basal neste patossistema. Não existem ainda estudos que confirmem sua função em plantas de *O. sativa* para a resistência basal.

Uma pesquisa desenvolvida por Delteil et al. (2012), sobre resistência basal à *M. oryzae*, demonstra resultados de alto impacto para este patossistema. Neste estudo foram realizados testes com vinte genes representativos da resistência à doença, em mutantes de *O. sativa*. A análise da expressão gênica de cada um dos mutantes foi avaliada à 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação (hai). Foram avaliados os níveis de expressão de todos os genes contra todos, ou seja, em todos os mutantes também se avaliou a ligação dos níveis de expressão dos genes simultaneamente. Dentre os resultados, pode-se destacar que entre todos os genes testados, os que tiveram aumento nos níveis de expressão 1 hai foram *OsWRKY28*, *OsMAPK5a*, *OsWRKY45* e *SL1*. Além disso nos mutantes com os genes *nh1*, *oswrky28* e *cebip* houve o aumento da expressão de alguns dos genes estudados, demonstrando que estes possuem especificidade e genótipos moleculares contrastantes quando mensurada a expressão de genes de defesa. Por fim, é relevante ressaltar que os genes *OsWRKY28*, *NH1*, *rTGA1* e *CEBiP* estão ligados a resistência basal, pois segundo a análise do fenótipo dos

mutantes, estes apresentaram mais sintomas do que nas plantas silvestres, mostrando serem indispensáveis à resistência nos estágios iniciais da infecção. Estes resultados e os métodos utilizados neste estudo podem servir como passo inicial para novas pesquisas e descoberta de outros genes que atuam na resistência basal em *O. sativa*.

Um modelo desenvolvido por Chen & Ronald (2011) (Figura 2) sugere como ocorre a correlação entre os mecanismos da resistência basal à *M. oryzae* em *O. sativa*. O reconhecimento dá-se através dos PAMPs, como monômeros de quitina e esfingolipídeos. CEBiP, uma glicoproteína da membrana plasmática, tem papel fundamental na percepção e transdução do sinal derivado de quitina, assim como CERK1. O reconhecimento de elicitores derivados da quitina induzem uma série de respostas de defesa como ativação de MAPKs, produção de ROS, expressão de genes de resistência, produção de fitoalexinas e produção de ácido fosfatídico (PA), que é um sinal molecular importante para diversas respostas de estresse.

As cascatas de MAPK têm papel fundamental na transmissão de sinais extracelulares à jusante, tanto para ETI quanto para PTI. ETI e PTI ativam grandes mudanças na expressão de fatores de transcrição no núcleo das células, que incluem a família WRKY, que em *O. sativa* são aproximadamente cem fatores. Por fim, as moléculas de quitina podem ser reconhecidas por pequenas proteínas G, que codificam o gene *OsRAC1*, que funcionam através do complexo citosólico *RARI-SGT1-HSP90-HSP70* - este complexo é formado, pois as proteínas necessitam de chaperonas para traduzir a resposta de defesa. *OsRAC1* ativa MAPK6 mediada pela cascata de MAPK culminando na resposta de defesa por morte celular, produção de ROS, ativação da expressão de genes PR e produção de fitoalexinas.

2.3 *Arabidopsis thaliana*: uma ferramenta no estudo da resistência basal

Arabidopsis thaliana é um membro da família Brassicaceae, descoberta no século XVI por Johannes Thal. Possui um genoma pequeno que foi totalmente sequenciado em seus 5 cromossomos em 2000. *A. thaliana* é uma planta considerada modelo por diversas características: apresentar na literatura o genoma sequenciado, possuir o ciclo curto de desenvolvimento (seis semanas da germinação até a semente madura), proporcionar uma abundante produção de sementes e possibilitar seu cultivo em pequenos espaços, apresentar eficientes métodos de transformação utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, possuir um grande número de linhagens mutantes e de recursos genéticos à disposição em bancos de germoplasma. Além disso, existe uma comunidade acadêmica, pública e privada que gera informações científicas, protocolos, novos mutantes e conhecimento da função de grande parte de seus genes em diversos processos, inclusive o sistema de defesa da planta.

As informações referentes a estas descobertas estão disponíveis em bases de dados como o TAIR (*Arabidopsis Information Resource*), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e PREP (*Partnership for Research and Education in Plants*). Ainda, plantas transgênicas para muitos genes de importância no sistema de defesa da planta foram construídas e podem ser adquiridas, facilitando o desenvolvimento de pesquisas nesta área.

A. thaliana é largamente utilizada em estudos que investigam a resistência basal e a descoberta de genes e mecanismos envolvidos neste tipo de defesa. Dentre estes estudos, pode-se destacar o desenvolvido por Wen et al. (2011), que investigou os mecanismos de resistência basal de *A. thaliana* quando inoculada com um isolado de oídio proveniente de plantas de cardo (planta do gênero *Cynara* da família das Asteraceae, presente na Europa, África, e Argentina, utilizada na alimentação e com

cunho medicinal), não patogênico à *A. thaliana*. Os resultados revelaram que existe a formação de um invólucro ao redor do complexo haustorial relacionado com a resistência basal pós-haustorial similar às papilas, e que, a proteína RPW8.2 (envolvida na formação do invólucro) é responsável pelo aumento da produção deste invólucro.

Resultados significativos também foram demonstrados por An & Mou (2012). Estes investigaram a interação entre *A. thaliana* x *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) e observaram múltiplas respostas de defesa basal. Após constatar que *Xcc* não demonstrava crescimento ou declínio dos números de colônias em folhas infectadas de *A. thaliana*, os autores observaram que ocorreu imediato acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumento dos níveis de expressão do gene *GST1* (marcador da atividade de ROS em defesa). Da mesma forma observaram que os níveis de genes induzíveis pela flagelina fl22 (*FRK1*, *NHO*, *WRKY29*) que caracteriza a resposta rápida por PAMP de resistência basal, aumentaram. Houve aumento nos níveis de SA total e livre após a infecção, e os níveis de expressão gênica dos genes relacionados à patogênese e dependentes de SA: *PR1*, *PR2* e *PR5*, aumentaram após quatro horas na presença do patógeno. Resultado este que surpreende, pois SA sempre esteve relacionado a respostas mais tardias, coordenadas por genes R. A dissecação dos mecanismos de defesa e descoberta de genes relacionados adiciona mais ferramentas para o desenvolvimento de variedades de citros resistentes ao cancro, visto que o germoplasma resistente ao cancro cítrico é pequeno.

Técnicas apuradas para investigação de vias bioquímicas, análises genéticas e moleculares já foram descritas e facilitam o desenvolvimento de pesquisas em todas as áreas do reino vegetal. A utilização de técnicas de biologia molecular no estudo da interação entre plantas e patógenos pode ser útil na elucidação dos mecanismos envolvidos nas respostas de defesa das plantas. Uma ferramenta que vem sendo

amplamente utilizada é a técnica de expressão diferencial, possibilitando identificar facilmente um grande número de genes expressos diferencialmente na interação planta-patógeno. Esta técnica combinada com análise funcional desses genes *in vivo* através de técnicas de silenciamento gênico e superexpressão de genes são estratégias importantes na elucidação dos mecanismos de defesa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos deste projeto incluíram inúmeras etapas que foram desenvolvidas no Laboratório de Fitopatologia Molecular localizado no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Os mutantes de *A. thaliana* para cada um dos genes foram obtidos através da importação de sementes do banco de sementes da ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*) da Universidade do Estado de Ohio (Tabela 1), e as isolinhas de *O. sativa* do IRRI (*International Rice Research Institute*) foram fornecidos pela empresa RiceTec.

TABELA 1. Acessos dos mutantes de *A. thaliana* do banco de sementes da ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*) da Universidade do Estado de Ohio, 2013.

Gene	Acesso ABRC
EDR1	AT1G08720.1
OsRAC1	AT4G28950.1
SPL11	AT3G46510.1
WRKY89	AT2G46400.1
WRKY53	AT2G38470.1
HSP90	AT5G52640.1
SGT1	AT4G11260.1
STP1	AT1G11260.1

3.1 Seleção *in silico* de genes

A busca por genes envolvidos na defesa basal e de suas sequências de nucleotídeos foi realizada nos bancos de dados *TAIR* (*The Arabidopsis Information Resource*), *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) e *Gramene*. A pesquisa iniciou com a procura por genes já envolvidos na resposta de defesa, tanto nas espécies escolhidas para o projeto, *O. sativa* e *A. thaliana*, quanto em outras espécies e com outros patógenos.

Sabe-se que a interação *O. sativa* x *M. oryzae* foi exaustivamente estudada, e as respostas de defesa neste patossistema foram descritas em diversos estudos. Para auxiliar a pesquisa e diminuir a probabilidade de erro na escolha dos genes, (escolher genes que não estejam relacionados com a defesa a patógenos) alguns critérios foram adotados: i. os genes devem estar previamente relacionados à defesa contra patógenos; ii. não devem existir dados publicados que já atestaram a sua função na resistência basal em *O. sativa*; iii. as sequências nas duas espécies estudadas, *O. sativa* e *A. thaliana*, devem ser conhecidas. O último critério viabiliza a comparação da expressão dos genes em *O. sativa* com os mutantes de *A. thaliana*. Foram escolhidos 8 genes para estudo, os quais serão descritos nos resultados.

A comparação das sequências se dividiu em duas etapas. A primeira compreendeu a comparação das sequências dos genes entre *O. sativa* e *A. thaliana*, identificando as sequências completas na espécie que deu origem à escolha. Por exemplo, se o gene já foi estudado em *O. sativa*, a sequência foi identificada na base de dados NCBI ou Gramene.

A segunda etapa foi comparar esta sequência com as presentes na base de dados da outra espécie e escolher a sequência que possui alta similaridade e que codifica um

gene de mesma função (Apêndice 1). Por exemplo, se a sequência foi selecionada em *O. sativa*, esta é comparada com a base de dados TAIR para identificar o gene em *A. thaliana*. Esta segunda etapa é de elevada importância, pois é comum um gene ter uma nomenclatura diferente entre espécies e apresentar a mesma função. Para a comparação da similaridade entre as sequências foi utilizado o programa BLAST no NCBI.

3.2 Cultivo de mutantes de *A. thaliana* e isolinhas de *O. sativa*

Os mutantes de *A. thaliana* foram semeadas em substrato adequado homogeneizado e peneirado, e cultivadas por quatro semanas em fotoperíodo de 12 horas sob temperatura de 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Foi utilizado um ecótipo silvestre Columbia de *A. thaliana* como controle negativo para os experimentos, que apresentou resistência à infecção pelo isolado de *M. oryzae* utilizado nos experimentos.

Da mesma forma, foram selecionadas isolinhas de *O. sativa* com diferentes níveis de resistência e suscetibilidade para análise da expressão dos genes escolhidos. As plantas de *O. sativa* foram cultivadas em estufa de crescimento, sem monitoramento de temperatura e umidade até o momento da inoculação, e após o surgimento da terceira folha, totalmente expandida, foram inoculadas. A análise dos sintomas deu-se a partir de sete dias após a inoculação. As isolinhas selecionadas fazem parte da coleção do IRRI, e cada uma possui um gene de resistência de efeito predominante, isolinhas monogênicas da LTH: IRBL-5M – *Pi5*, IRBL1-CL- *Pi1*, IRBL12-M – *Pi12*. E a isolinha LTH, suscetível universal.

3.3 Produção de inóculo e inoculações

O isolado 41 de *M. oryzae* foi obtido da coleção de isolados do Laboratório de

Fitopatologia Molecular, advindo de pequenos pedaços de papel filtro, os quais foram posicionados diretamente sobre placas de Petri contendo meio Ágar-Aveia (50 g de farinha de aveia, 12 g de ágar completados com água destilada até completar o volume de 1L). As placas foram mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 27°C com luz constante provida por quatro lâmpadas fluorescentes extra luz do dia de 20 Watts, distantes 5cm das placas. Foi realizado o isolamento monospórico das colônias.

Para a produção de inóculo, o isolado foi repicado em meio sólido de ágar-aveia e durante 10 dias foi mantido em câmara de crescimento à temperatura de 27°C sob luz constante provida por quatro lâmpadas fluorescentes extra luz do dia de 20 watts, 5 cm distantes das placas. Após, quando a colônia completou aproximadamente 80% do espaço da placa, o micélio foi raspado com auxílio de um pincel de cerdas duras umedecido em água esterilizada e mantido novamente em câmara de crescimento por mais quatro dias. Nesta fase, a esporulação alcançou a concentração ideal para inoculação. A suspensão de inóculo foi produzida através da lavagem destas placas com a solução de inoculação (gelatina 3%, Tween ® 0,01% em água destilada). O micélio foi cuidadosamente raspado com a utilização de um pincel de cerdas macias, e a suspensão dos esporos foi coletada após passar por uma gase para retirada de pedaços de micélio. Os esporos foram contados em uma câmara de Neubauer, e quando necessário realizou-se o ajuste da suspensão dos esporos para 10^5 esporos mL^{-1} . A inoculação foi realizada pela aspersão da suspensão de esporos nas partes abaxial das folhas com o auxílio de um aerógrafo e um compressor de ar. Após a inoculação as plantas foram mantidas em casa de vegetação com saturação de umidade.

3.4 Análise microscópica dos eventos de interação

Após a inoculação as amostras foram coletadas em momentos determinados e iguais em todos os experimentos, tanto para os mutantes de *A. thaliana* e do ecótipo Columbia, quanto para as isolinhas de *O. sativa*: 4, 18, 24 horas após a inoculação (hai). De cada planta foram coletadas no mínimo três segmentos de folhas com aproximadamente 1 cm de comprimento cada. As amostras foram avaliadas em microscopia óptica de campo claro e contraste de fase através de microscópio óptico Olympus BX 41. Para a visualização das estruturas fúngicas foi realizada coloração com *Trypan Blue*.

Para visualização das estruturas fúngicas, os segmentos de folha coletados foram descoloridos em metanol 100% por 24 horas. As amostras foram fervidas por 5 minutos em uma solução de *Trypan Blue* 0,03% e NaCl 0,85%. As folhas foram então clareadas por imersão em etanol 70% por 1 h e armazenado em glicerol 50%. Para as análises, os segmentos foliares corados foram montados com a superfície adaxial voltada para cima, cobertos com uma lamínula e selados com uma camada de esmalte. Em cada lâmina foram quantificados o número de esporos germinados, com formação de apressório, infecção, colonização e morte celular.

Para adequada avaliação dos eventos microscópicos na interação *M. oryzae* x *A. thaliana* foi necessário padronizar uma referência para cada tipo de evento: germinação, formação de apressório, infecção, colonização e morte celular. Foi considerado um esporo em germinação aquele que se apresenta sobre a superfície do tecido, com início da germinação do tubo germinativo em um dos pólos. Para formação do apressório, foi considerada a presença deste, melanizado. A infecção foi considerada a partir do início da penetração através da pressão de turgor do apressório e formação da hifa primária. O início da colonização compreendeu o desenvolvimento da hifa invasiva dentro da célula.

E a morte celular foi considerada quando a célula demonstrava o seu interior colapsado em coloração azul escuro e/ou coloração marrom escuro.

A análise estatística utilizada para análise de dados foi ANOVA e teste Tukey, com 5% de significância, realizada no programa GraphPad Prism® 5. Os dados avaliados foram os de frequência relativa, da ocorrência da cada um dos eventos microscópicos descritos acima, apresentados em percentual (%).

3.5 Análise de severidade de Brusone em *O. sativa* e *A. thaliana*

Para a avaliação da severidade dos mutantes de *A. thaliana* foi esperado o período de cinco dias após a inoculação, momento em que os sintomas eram visíveis e mensuráveis. A severidade de Brusone observada nas rosetas dos mutantes foi calculada através do programa computacional AxioVision® da empresa Zeiss. Foram feitas análise de todas as folhas de cada roseta, e calculada a média por mutante. A mensuração consistiu na delimitação de área sadia e da área doente, o cálculo da área total e área doente relativa a área total, e posterior cálculo da severidade por folha. A análise estatística foi realizada através da ANOVA e teste Tukey, no programa GraphPad Prism®.

Nas avaliações das isolinhas de *O. sativa* o método de análise de severidade utilizou uma escala desenvolvida por Hayashi et al. (2009) (Figura 4). Nesta escala, as isolinhas são divididas em resistentes e suscetíveis através de seis diferentes notas, caracterizadas pelo tamanho e tipo de lesão apresentada nas folhas. A nota 0 é caracterizada pela ausência de lesões; a nota 1 é caracterizada pela presença de manchas marrons uniformes ou dispersas; nota 2 por pequenas lesões com centros bronzeados distintos circundadas por margem marrom escuro; nota 3 por manchas longelíneas

circundadas com halo marrom, com centro bronzeado, com até 1,5 mm; a nota 4 por manchas de tamanho intermediários de 2mm de diâmetro com centro bronzeado, circundada por halo marrom escuro e amarelo; e a nota 5 para manchas com mais de 2mm de diâmetro com centro esporulativo e halo amarelado. O padrão de reação para a isolinha que possui o gene *Pi12(t)* foi considerado similar a isolinha que carrega o gene *Pib* (Chen et al., 1998). O percentual das reações de resistência foi calculado através do número de recorrência de notas para cada uma das isolinhas. A avaliação foi realizada sete dias após a inoculação.

3.6 Análise da expressão gênica nas isolinhas de *O. sativa*

Da mesma forma e simultaneamente às coletas para a avaliação dos eventos microscópicos foram coletadas amostras para a análise da expressão gênica, tanto para os mutantes de *A. thaliana* quanto para as plantas de *O. sativa*: 4, 18, 24 e 120 horas após a inoculação (hai).

3.6.1 Extração de RNA e PCR em tempo real

A extração do RNA de cada uma das isolinhas seguiu os seguintes passos: em 100 mg de tecido triturado foram adicionados 1000 µL do reagente TRIzol®, homogeneizados e incubados em temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Após, a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 10 min, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foram adicionados 100µL de clorofórmio, o qual ficou incubado em TA por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 500µL de isopropanol, e agitados em vortex. A amostra foi incubada por 10 min. em TA, centrifugada por 8 min. a 12.000 g e foi descartado o sobrenadante. Foi

adicionado 1000 μ L de etanol 70%, centrifugado por 5 min a 7.500 g, e após descartado. O pellet formado ficou em TA por 30 min para secagem, e após foram adicionados 30 μ L de água livre de RNase.

A quantificação do acúmulo de mRNA de cada um dos genes foi realizada em qPCR de uma amostra de tecido de cada isolinha (mínimo de três plantas). A reação de amplificação consistiu de 4 μ L de cDNA diluído 20 vezes, tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP; 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador; SYBR® Green (Invitrogen) diluído 10000X; 0,2 μ L de ROX (Invitrogen); 0,25 U de Platinum® Taq e 3,05 μ L de água ultrapura. Todas as reações de qPCR foram executadas em um sistema de detecção de sequência modelo 7300 Applied Biosystems com as seguintes condições de termociclagem: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C. Curva de dissociação: 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, 15 seg a 95°C e 15 seg a 60°C.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de genes endógenos nas isolinhas de *O. sativa* e nos mutantes de *A. thaliana* estão descritos abaixo.

Gene Actina: direto CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA

reverso CGACCACCTTTGATCTTCATGCTGCTA

Gene Gapdh: direto GAAATGCATCTTGCACTACCAACTGTCTTGC

reverso CCCGTTGAGTTTTTCCTTTGA

3.6.2 Quantificação relativa via qPCR

A fim de realizar a quantificação relativa do nível de expressão gênica dos genes candidatos foi utilizado o Método Livak de comparação entre gene alvo e gene de referência (ou endógeno). Este método compara níveis ou mudanças na expressão dos genes alvos (genes de interesse) com a expressão de um gene de referência expresso na planta. Os genes de referência são os genes endógenos que possuem nível de expressão equalizados em todos os processos celulares, como genes envolvidos na produção de parede celular e em outros processos essenciais para o metabolismo vegetal.

O gene de referência utilizado para as plantas de *O. sativa* foi o gene que codifica a proteína actina, que é uma proteína globular a qual forma os microfilamentos e é um dos elementos principais na formação do citoesqueleto. Para as plantas de *A. thaliana* foi utilizado o gene *Gapdh* responsável pela ação da enzima Gapdh envolvida no processo de glicólise e outros processos não metabólicos como ativação de transcrição e apoptose (Tarse et al, 2003).

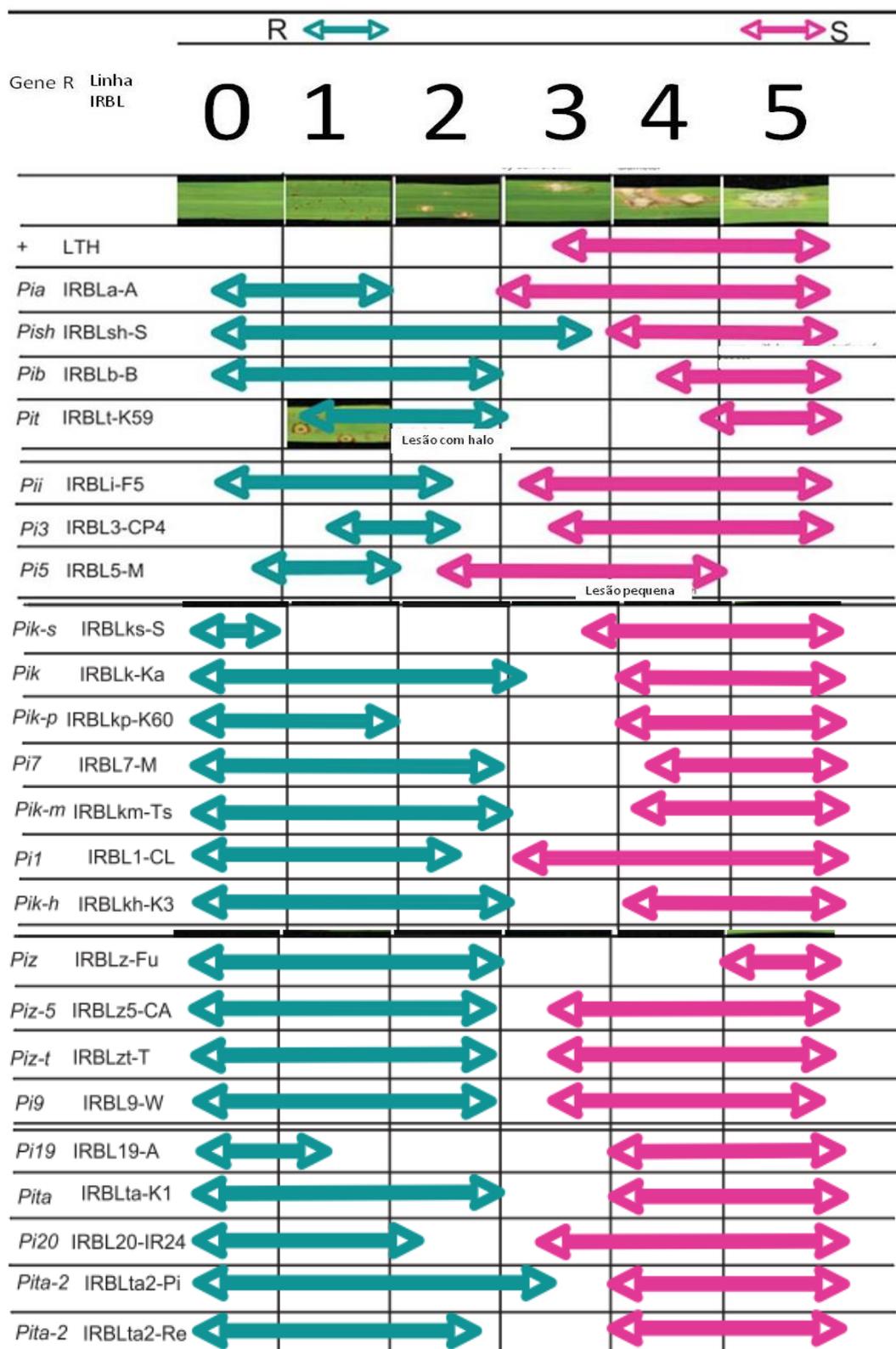


FIGURA 4. Padrões de lesão, tipos de infecção e notas para classificação de reações suscetíveis ou resistentes das isolinhas do IRRI (Adaptado de Hayashi et al., 2009). Padrão para isolinha IRBL-12M (*Pi12(t)*) = Padrão para isolinha IRBLb-B (*Pib*).

O Método Livak (Livak & Schmittgen, 2001) utiliza três passos principais para normalização dos dados de expressão e comparação dos níveis de expressão de dados em PCR em tempo real. Além dos valores de expressão do gene de referência e do gene alvo são utilizados valores de expressão do calibrador (controle negativo, condição de testemunha) e do teste (amostra da qual será avaliada a expressão do gene alvo) (Figura 5). Dois critérios devem ser observado para tal avaliação: os dois genes (alvo e referência) devem ter eficiência perto de 100%, e devem ter diferença de até 5% em eficiência entre os mesmos. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas com a aplicação do teste Tukey ($p < 0,05$).

O primeiro passo é a normalização do valor de Ct (medida relativa da concentração do gene alvo na reação de PCR) do gene alvo para o Ct do gene de referência. O segundo passo é a normalização do Δ Ct da amostra teste para a amostra calibradora. Por fim, realiza-se o cálculo da diferença de expressão entre a amostra teste e a amostra controle do gene alvo.

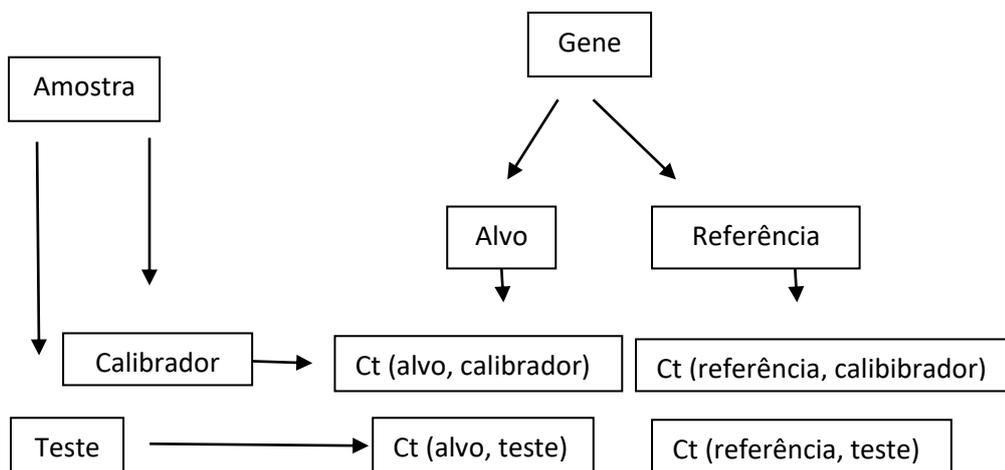


FIGURA 5. Esquema de organização de dados dos valores de expressão gênica.

Fórmulas:

Passo 1: Calibrador $\Delta Ct = Ct(\text{alvo, calibrador}) - Ct(\text{referência, calibrador})$

Teste $\Delta Ct = Ct(\text{alvo, teste}) - Ct(\text{referência, teste})$

Passo 2: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{teste}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$

Passo 3: $2^{(-\Delta\Delta Ct)} = \text{Taxa de expressão normalizada}$

3.7 Oligonucleotídeos iniciadores para *O. sativa* e *A. thaliana*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos foram elaborados com o auxílio do programa Primer-BLAST, disponível *online* no NCBI. Para o melhor desempenho do primer específico na qPCR, os seguintes parâmetros foram adotados: T_m (*Melting Temperature*) ótima de 60°C, produto com tamanho aproximado de 120 pb, % GC entre 55 e 60 %, e tamanho do primer de aproximadamente 20 pb (Tabelas 2 e 3)

Cada um dos oligonucleotídeos foi testado para uma eficiência de aproximadamente 100 % seguindo a construção de uma curva padrão no termociclador para PCR em tempo real. O cálculo da eficiência foi realizado com os valores de *slope* (valor que indica ambos direção e declividade de uma reta) dados pela curva de cada um dos oligonucleotídeos em diferentes diluições: 1/4, 1/16, 1/64 e 1/256. Para todos a diluição de maior eficiência foi de 1/16.

Fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ Onde: E = eficiência

$\text{slope} = \text{valor dado pela curva}$

Para testar a especificidade de cada um dos oligonucleotídeos em cada uma das espécies, *O. sativa* e *A. thaliana*, foram realizadas reações de PCR e a reação de amplificação verificada em gel de agarose. Para todos os mutantes de *A. thaliana* não

foi observada amplificação, o que já se esperava visto que os mutantes não devem ter os genes expressos. Nas isolinhas de *O. sativa* foram amplificados produtos de tamanhos variados, com bandas específicas, atestando o correto funcionamento de cada oligonucleotídeo (dados não apresentados).

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para genes em *O. sativa*.

Denominação		Sequência	Tm	%GC	Produto
EDR1	F	GCCGCTACCGGGACTACAAC	62.90	65	140
	R	GTCGCCTATGCCCGTTTGAA	61.02	55	
HSP90	F	TCTCGCGTCTCTCGGAA	60.05	61.11	103
	R	CAATGCATCGGAGGAGTTGG	61.92	60	
SGT1	F	TAGAGGGAAGCCCACCTGAT	59.66	55	101
	R	CCAAGTGATGACTCAGGCCG	60.74	60	
SPL11	F	GGCTGCCTTTTTGGGAGGAA	60.83	55	118
	R	GCACGGATACACAGTAGACG	58.18	55	
STP1	F	GGCAGGCAAGGACTACC	59.73	66.67	119
	R	GGACGTCACACCACCTGATATAC	60.49	52.17	
WRKY53	F	TCTCAGCAAGATGACAGCCG	60.11	55	105
	R	TTGCTGCTCTTGCTCCTTGA	59.89	50	
OsRac1	F	TTCATCAAGTGCGTCACCGT	60.25	50	101
	R	ACGGTGGGGATGTAATCGGT	60.98	55	
WRKY89	F	TCAACTGTGGCTCAAGCACC	60.82	55	103
	R	CACACCTATAGTAGCTCCTGGAA	58.78	47.83	

TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para genes em *A. thaliana*.

Denominação		Sequência	Tm	%GC	Produto
EDR1	F	ACACCTGGCTTTGAAGCTGT	60,11	50	130
	R	CCAGCCTCTGTACCAACACA	59,60	55	
HSP90	F	CGATCTGGTTGAGGAAGCCA	59,75	55	121
	R	AGCTGACCCTCCACTGAGAA	60,18	55	
SGT1	F	CACCGAGTTTGCCTTCAAGC	60,04	50	80
	R	AGGTGCTGCAGGAATTGGAA	59,89	55	
SPL11	F	ATTGAGCCTCCAAAGCCTCC	60,03	55	112
	R	TTCCGTACGCAAGTCTCCAC	60,04	55	
STP1	F	CTTCGGCGGCATACTCTTCT	59,90	55	130
	R	GTACAGTGGCACAGCCTGAT	60,04	55	
WRKY53	F	ACCATCGGTTGTCCAGTGAG	59,68	55	101
	R	GCAGGAACATCGTGGTTGTG	59,76	55	
OsRac1	F	GGTGGTTCTTCAGCCTCCAA	59,89	55	103
	R	GGTGCAACCTCCACAGACAA	60,47	55	
WRKY89	F	GGGTCTGCAATTACCAGCGA	60,39	55	124
	R	ACGACCACAACCAATCCTGT	59,73	50	

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genes envolvidos na defesa basal

Através da pesquisa *in silico*, genes foram escolhidos para a investigação da reação de defesa basal frente à infecção por *M. oryzae* em mutantes de *A. thaliana* e em isolinhas de *O. sativa*. São estes: *EDR1*, *OsRac1*, *SGT1*, *HSP90*, *STP1*, *WRKY89*, *WRKY 53* e *Spl11* (Apêndice 2). As informações pertinentes a cada um dos genes, já descritas na literatura, e que levaram a esta escolha, estão descritas a seguir. Com os genes escolhidos foi formado um grupo heterogêneo quanto à forma de regulação das respostas de defesa, com ação em diferentes rotas metabólicas e regulação positiva ou negativa das respostas de defesa. Estes resultados, bem como os genes selecionados, contemplam o primeiro objetivo deste estudo.

Frye & Innes (1998) demonstraram que o gene *EDR1* está envolvido na regulação negativa da resistência de plantas de *A. thaliana* ecótipo silvestre à oídio e *Pseudomonas syringae*. Frye et al. (2001) isolaram o gene *EDR1* e determinaram que este codifica uma MAPKK quinase similar ao *CTR1*, um regulador negativo de respostas da via do etileno em *A. thaliana*. Da mesma forma, verificaram que *EDR1* estava à montante da cascata de respostas das MAPKK quinases, que regulam negativamente as respostas de defesa induzíveis pela rota do ácido salicílico. As rotas de

defesa da via do etileno e do ácido salicílico são respostas de defesa tardias. Da mesma forma, Tang et al. (2005) demonstraram que *EDR1* além ser um regulador negativo da morte celular, como resposta de defesa, também atua nas respostas a estresses abióticos como o déficit hídrico.

No entanto, contrariando resultados anteriores, em 2011, Hiruma e Takano identificaram a ação de *EDR1* na resistência de não-hospedeiro de *A. thaliana* a espécies não adaptadas de *Colletotricum* sp. Neste trabalho, observou-se que em plantas mutantes *edr1* o fator de transcrição *MYC2*, o qual suprime a expressão de defensinas, foi inativado, de tal forma a restaurar a expressão dessas defensinas. Concluiu-se, então, que o gene *EDR1* cancela a função de *MYC2*, indicando que *EDR1* exerce um papel crítico na resistência de não-hospedeiro, em parte por induzir um peptídeo antifúngico através da interferência da função de *MYC2*. Estes resultados direcionam para conclusões, em parte, conflitantes da função de *EDR1* somente como um regulador negativo das respostas de defesa, e deixam uma lacuna a ser investigada.

As respostas de defesa ainda podem ser ativadas através da cascata de MAP quinases. Segundo Chen & Ronald (2011), os mais novos avanços acerca de estudos do sistema imune inato em *O. sativa* identificaram e caracterizaram sensores em hospedeiros. Estes sensores codificam receptores quinases que têm a capacidade de perceber as assinaturas conservadas dos patógenos e microrganismos em geral.

O gene *OsRAC1*, que codifica uma pequena proteína G sinalizadora da superfície da célula, é um destes sensores no sistema imune que ativa as respostas de defesa. *OsRAC1* pode interferir diretamente no sistema NB-LRR do sistema imune (proteínas *Pit*), ou pode desencadear respostas através do complexo *RAR1-HSP90-HSP70-SGT1-RACK1*, que atua na ativação da cascata de MAP quinases fazendo a

transdução do sinal das assinaturas. Quando a resposta de defesa é dada pela ativação de MAPKs, pode-se observar os efeitos dessa resposta a partir dos primeiros tempos após a infecção, no caso do *OsRAC1* por morte celular, acúmulo de ROS, ativação da expressão de genes PR e produção de fitoalexinas (Chen & Ronald, 2011). Apesar deste gene estar relacionado à regulação positiva de defesa, ainda não foram publicados dados que confirmem respostas de defesa basal.

Deste mesmo complexo fazem parte os genes *OsSGT1* e *HSP90*. *HSP90* é uma *heat shock protein*, altamente conservada na maior parte dos microrganismos, que faz a transdução do sinal de imunidade dado por *OsRAC1* (Seo et al., 2008; Chen & Ronald, 2011). Kanzaki et al. (2003) demonstraram a importância de *HSP90* na resposta de defesa basal diante da interação de não-hospedeiro entre plantas de tabaco e *Pseudomonas cichori*. O silenciamento de *HSP90* levou ao aparecimento de sintomas na folhas inoculadas, provando seu efeito de defesa contra o patógeno.

Uppalapati et al. (2011) a fim de entender o processo molecular da ação da coronatina na formação de lesões necróticas causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em plantas de tomate, descobriram que o gene *SGT1* tem papel na indução de clorose por coronatina. Ao silenciar *SGT1* em plantas de tomate observaram a redução dos sintomas associados à doença, morte celular e clorose, indicando que existe uma conexão entre o aparecimento desses dois sintomas. Em plantas de *A. thaliana* somente o gene *AtSGT1b* foi necessário para o desenvolvimento de sintomas mediado por coronatina. Acerca destes resultados, os autores concluíram que *SGT1/SGT1b* são necessários para o desenvolvimento de doença necrótica em plantas de tomate e *A. thaliana*. Dessa forma o gene *SGT1* foi caracterizado como um regulador negativo de defesa à doença.

Porém, outros estudos confirmaram que *SGTI* é um regulador positivo de defesa contra patógenos. Peart et al. (2002) demonstraram através do silenciamento do gene *SGTI* em plantas de *Nicotiana benthamiana*, transformadas com diferentes genes de resistência, que sua ausência comprometeu a resistência às doenças causadas por *P. syringae*, *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas axonopodis*. Ainda observaram que quando silenciado o gene, ocorreu a supressão da reação de hipersensibilidade das células de *N. benthamiana*, reação esta comum à resposta a todas as bactérias testadas em plantas não silenciadas, e relacionado à resistência basal.

Os genes *SGTI* e *HSP90*, por fazerem parte de um complexo, interagem e são essenciais para respostas de defesa. Botër et al. (2007) mostrou que *RARI* (gene que faz parte do mesmo complexo) foi essencial para o aumento da interação entre *HSP90* e *SGTI*, o que resultou na acumulação de uma proteína R em *Solanum tuberosum*, a proteína Rx, que confere resistência ao vírus PVX. Dessa forma, *HSP90* e *SGTI* demonstraram ter funções importantes na resistência contra diferentes patógenos, e no caso de *SGTI*, ainda existem lacunas quanto à regulação da resposta de defesa, se positiva ou negativa.

A família de genes WRKY têm sido relatada como portadora de fatores de transcrição que ativam respostas de defesa. Pesquisas confirmaram a participação destes fatores de transcrição na sinalização destas respostas (Berri et al., 2009; Chen & Ronald, 2011; Delteil et al., 2012; Abbruscato et al, 2012; Wei et al., 2013; Inoue et al., 2013; Yokotani et al., 2013; Lee et al., 2013; Kim et al., 2013). Para esta pesquisa, foram selecionados os genes *STPI*, *WRKY89*, e *WRKY53* desta família. Segundo Kim et al. (2013), o gene *STPI* demonstrou ser um regulador positivo relacionado à sinalização de defesa contra *Pseudomonas carotovorum* sp. *carotovorum* em plantas de *A. thaliana*. Já os genes *WRKY89* e *WRKY53* demonstraram altos percentuais de redução de doença na

interação *Oryza sativa* x *M. oryzae* (Deiteil et al., 2012; Chen & Ronald, 2011). Apesar destes resultados relacionarem os referidos genes à defesa das plantas, nenhum estudo aprofundou quanto à resistência basal.

Mutantes chamados *spotted leaf* pertencem à classe de mutantes que têm a capacidade de produzir lesões necróticas em plantas, espontaneamente, sem qualquer contato com patógenos. O fenótipo desses mutantes se assemelha à morte celular induzida pela reação de hipersensibilidade, sugerindo que essa mutação resulta na ativação de respostas de defesa (Wang et al., 2005). Muitos dos mutantes que produzem essas lesões em *O. sativa* mostraram aumento da resistência à *M. oryzae*. O gene *Spl11* (*spotted leaf11*), consiste em um desses mutantes.

O gene *Spl11* foi identificado na população da cultivar IR68 (Singh et al., 1995). A caracterização da função na resposta à doença através da fenotipagem das plantas a campo demonstrou que *Spl11* confere um aumento de 85 a 90% na resistência não-específica à raça, no caso de plantas de *O. sativa* inoculadas com *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *M. oryzae*. Resultados semelhantes foram encontrados por Yin et al. (2000) e Xu et al., (2014). Estes percentuais indicam que o gene tem forte influência na regulação da defesa (Deiteil et al., 2011; Zeng et al., 2004), mostrando-se um forte candidato para pesquisas em resistência basal.

4.2 Avaliação dos mutantes de *A. thaliana*

Com o objetivo de avaliar as respostas de plantas de *A. thaliana* frente à infecção por *M. oryzae* foram realizadas avaliações de severidade e dos eventos microscópicos de cada um dos mutantes. Estas avaliações contaram com a observação da expressão

espacial e temporal de genes candidatos e a sua relação com alterações sintomáticas e microscópicas.

4.2.1 Avaliações de severidade de Brusone dos mutantes de *A. thaliana* x *M. oryzae*

As plantas mutantes de *A. thaliana* controle (não inoculadas) e o ecótipo Columbia não apresentaram sintomas (dados não apresentados). Os ecótipos Columbia que foram inoculados com *M. oryzae* apresentaram ausência de sintomas, considerados então para este estudo resistentes à infecção do isolado 41 de *M. oryzae* (Figura 7).

A partir da análise dos resultados obtidos pode-se inferir que todos os genes estão relacionados às respostas de defesa da planta, de forma que a sua ausência dos genes nos mutantes determinou a presença de sintomas. A avaliação de severidade demonstrou um padrão de lesão nos mutantes de *A. thaliana*, revelando-se de forma irregular, com regiões amareladas a necrosadas, e no centro destas lesões a presença de pontos acizentados, o centro esporulativo. Cada um dos mutantes apresentou um sintoma de magnitude diferente, mas em sua maioria o amarelecimento inicial das folhas foi predominante. Park et al. (2009) obtiveram os mesmos resultados quando comparados os sintomas com os de ecótipos Ws- 0 e Col-0 de *A. thaliana* suscetíveis a isolados específicos de *M. oryzae*.

As lesões, se comparadas com às das isolinhas de *O. sativa* (Figura 11), mostraram um padrão diferente, pois iniciaram em qualquer área das folhas, e em seu estágio final mostraram um aspecto mais translúcido do tecido e com um formato disforme (Figura 7). O aspecto diferenciado destas lesões pode estar relacionado com a diferença entre a estrutura foliar de *A. thaliana* e de *O. sativa*. As folhas de *O. sativa*

têm maiores quantidades de cera superficial e suas células têm formato retangular, característica que pode influenciar no aparecimento de lesões mais delimitadas, ao contrário das folhas de *A. thaliana*, mais sensíveis a umidade e com menores quantidades de cera superficial, e cujas células têm formato irregular.

De acordo com a observação direta das folhas, nos mutantes que demonstraram uma severidade mais intensa, foi comum observar folhas com necrose em estágio avançado, tendo como consequência a perda parcial de tecidos da folha, como em *edr1*, *stp1* e *hsp90* (Figura 7). De outra forma, nos mutantes onde a severidade foi menos intensa, *spl11*, *sgt1* e *osrac1*, o amarelecimento das bordas das folhas foi o sintoma predominante.

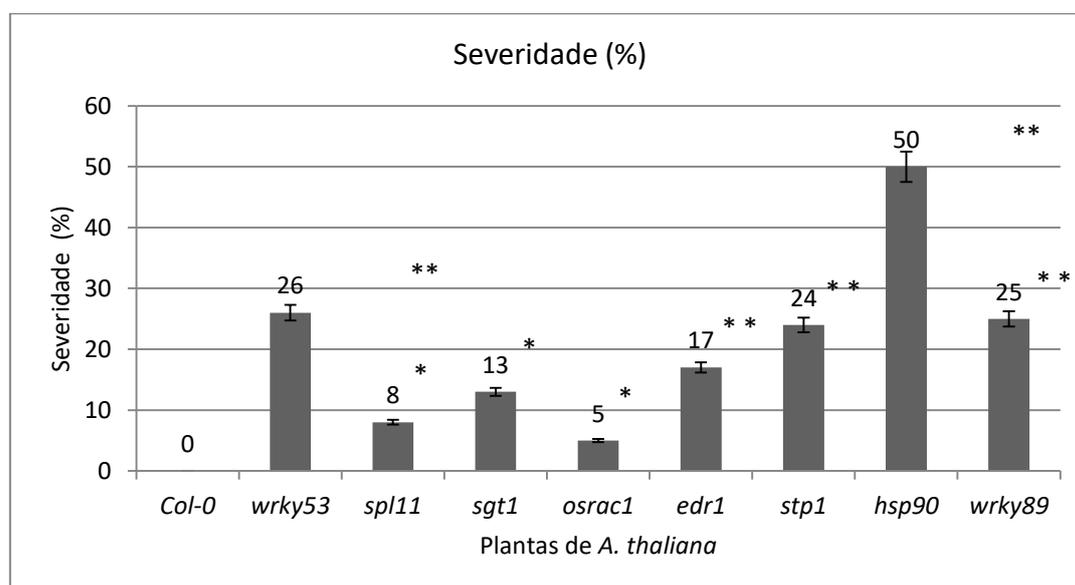


FIGURA 6. Severidade relativa de lesão em mutantes e ecótipo Columbia (Col-0) de *A. thaliana* inoculados com *M. oryzae*. *diferença significativa de 5% segundo teste T em comparação ao controle, Col-0.

Os resultados de severidade de *A. thaliana* mostraram que existe uma variação dos sintomas e de área de lesão, quando comparados entre os mutantes e o ecótipo

Columbia. O mutante do gene *hsp90* mostrou ter severidade de 50%, a maior diferença de todos os mutantes, se comparados ao controle. Mesmo mostrando este resultado, os mutantes *wrky53*, *wrky89*, *stp1* e *edr1* com valores menores de severidade de 26, 25, 24 e 17% estatisticamente não diferiram do resultado de *hsp90* se comparados ao controle (Figura 6). Resultados semelhantes foram encontrados por Park et al. (2009) quando foram comparados os ecótipos de *A. thaliana* suscetíveis com ecótipos resistentes a distintos isolados de *M. oryzae*. Os resultados desses autores demonstraram que existe diferença entre os sintomas, onde o ecótipo Col-0 mostrou maior suscetibilidade aos dois isolados de *M. oryzae*, KJ201 e 70-15, enquanto que o ecótipo Ws-0 foi mais suscetível ao isolado HJ201.

O mutante do gene *osrac1* mostrou severidade de 5%, e diferiu estatisticamente do controle, cujo resultado foi similar aos mutantes *spl11* (8%) e *sgt1* (13%) (Figura 6). Apesar dos resultados observados demonstrarem que *OsRAC1* e *Slp11* são importantes para resistência de *O. sativa* à *M. oryzae* (os mutantes apresentaram sintomas) esperava-se que estes demonstrassem percentual maior de severidade se comparados aos outros mutantes e ao controle. O gene *OsRAC1* é um sinalizador de membrana e pode não ser o único a ativar o mesmo complexo de defesa da planta. Neste caso, poderia ter a sua função sobreposta com outro gene, o que estaria mantendo os percentuais baixos de severidade da doença. No caso do gene *Spl11*, as lesões espontâneas geradas por este gene podem ter ocorrido na fase biotrófica do fungo, acabando por não propiciar o largo desenvolvimento do fungo nos tecidos. Neste caso, o fungo poderia estar mimetizando uma reação de hipersensibilidade e por fim paralisando o desenvolvimento da doença na maior parte dessas lesões, resultado este não esperado para este mutante.

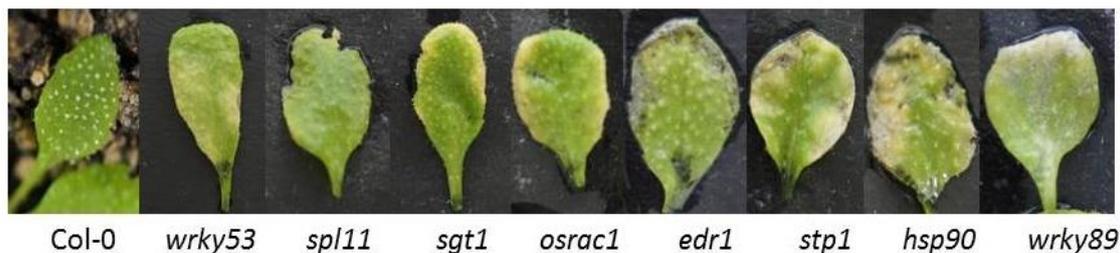


FIGURA 7. Sintomas em plantas mutantes e ecótipo Columbia (Col-0) de *A. thaliana* causados por *M. oryzae*, 5 dias após a inoculação.

4.2.2 Avaliações dos eventos microscópicos dos mutantes de *A. thaliana* x *M. oryzae*

A avaliação dos eventos microscópicos da interação *A. thaliana* x *M. oryzae* foi realizada em distintos momentos após a inoculação. Foi realizada uma caracterização de cada um dos eventos analisados em *A. thaliana*. As células vegetais de *A. thaliana* apresentaram-se em formato irregular, em média com 100 μm de diâmetro.

O ecótipo Columbia, o qual mostrou ausência de sintomas, foi avaliado de acordo com os mesmos parâmetros usados para os mutantes, porém não apresentou a progressão do desenvolvimento do fungo a nível microscópico. Os esporos aspergidos sobre suas folhas não germinaram, não formaram apressórios ou infectaram as células (dados não apresentados). As causas para este fato não foram investigadas neste trabalho, mas sabe-se que para que ocorra uma reação compatível, e o fungo encontre condições adequadas para seu estabelecimento, é necessário o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno. Dessa forma, pode-se sugerir que a sinalização através da membrana não foi efetiva, o que culminou na paralisação de qualquer desenvolvimento das estruturas do fungo sobre a superfície do hospedeiro.

Para a caracterização dos eventos, a germinação dos esporos foi considerada a partir do surgimento do tubo germinativo nos pólos do esporo. A formação de apressório pela simples presença do apressório melanizado na superfície da célula. Nos casos onde os apressórios não infectavam a célula, estes se apresentavam em coloração marrom bastante intensa e com alta turgidez. O processo de infecção foi observado tanto através da epiderme, quanto no limite entre as células e através dos estômatos. O início da infecção deu-se pela penetração da hifa infectiva a partir do apressório. Em muitas observações, no momento inicial da infecção, quando a hifa infectiva adentra na parede celular, o esporo apresenta-se sem turgidez e esta hifa em coloração azulada (Figura 8c). A colonização dos tecidos foi observada a partir do crescimento das hifas secundárias no interior das células, e visualizadas em coloração azul. E a morte celular ocorreu mais frequentemente nas células do mesófilo, as quais se apresentaram em coloração azulada ou marrom, e com anatomia disforme (Figura 8). Observou-se que, apesar da germinação e da formação do apressório atingir, na maior parte das avaliações e dos mutantes, 100% de frequência, nem todos conseguem infectar e colonizar o tecido.

De acordo com os resultados das avaliações de microscopia dos mutantes de *A. thaliana*, a germinação dos esporos tende a aumentar após a inoculação, na maioria dos mutantes (Figura 9). Nos mutantes *edr1*, *hsp90*, *sgt1*, *stp1*, *spl11* e *osrac1*, em 24 hai o percentual de germinação alcançou 100%, sendo que em *edr1*, *hsp90* e *osrac1* todos os esporos formam apressórios neste mesmo tempo. Após 24 hai a germinação apresentou um decréscimo nos percentuais nestes mesmos mutantes. Este decréscimo pode estar ocorrendo devido à desidratação e morte do esporo com o passar do tempo, impossibilitando sua germinação.

Observou-se também que nos mutantes *wrky53* e *stp1* houve um aumento nos percentuais de formação de apressório de 24 hai a 120 hai, passando de 38% a 100%, e

69% a 81%, respectivamente, enquanto nos demais mutantes a tendência foi a diminuição do percentual. A diminuição da formação de apressórios pode estar ocorrendo pelo mesmo motivo descrito para a germinação de esporos.

Os percentuais de infecção são menores do que a germinação e a formação de apressórios. Nos mutantes *stp1*, *edr1*, *wrky89*, *hsp90*, *spl11* e *osrac1* os percentuais de infecção acompanharam a tendência dos percentuais de germinação e formação de apressório, mas com frequências menores. Park et al. (2009) compararam o processo inicial de desenvolvimento de *M. oryzae* entre *O. sativa* e ecótipos de *A. thaliana*, e descobriram que as duas espécies quando em reações de resistência utilizam das mesmas armas de defesa contra o patógeno, a formação de papilas, uma membrana de consistência densa que impossibilita a colonização dos tecidos através do impedimento físico da penetração da hifa infectiva, logo após a formação do apressório. Porém, estes resultados são referentes à análise das amostras após 48hai, e foram relacionados também ao aumento da expressão dos genes de resposta tardia, e não relacionados à resistência basal.

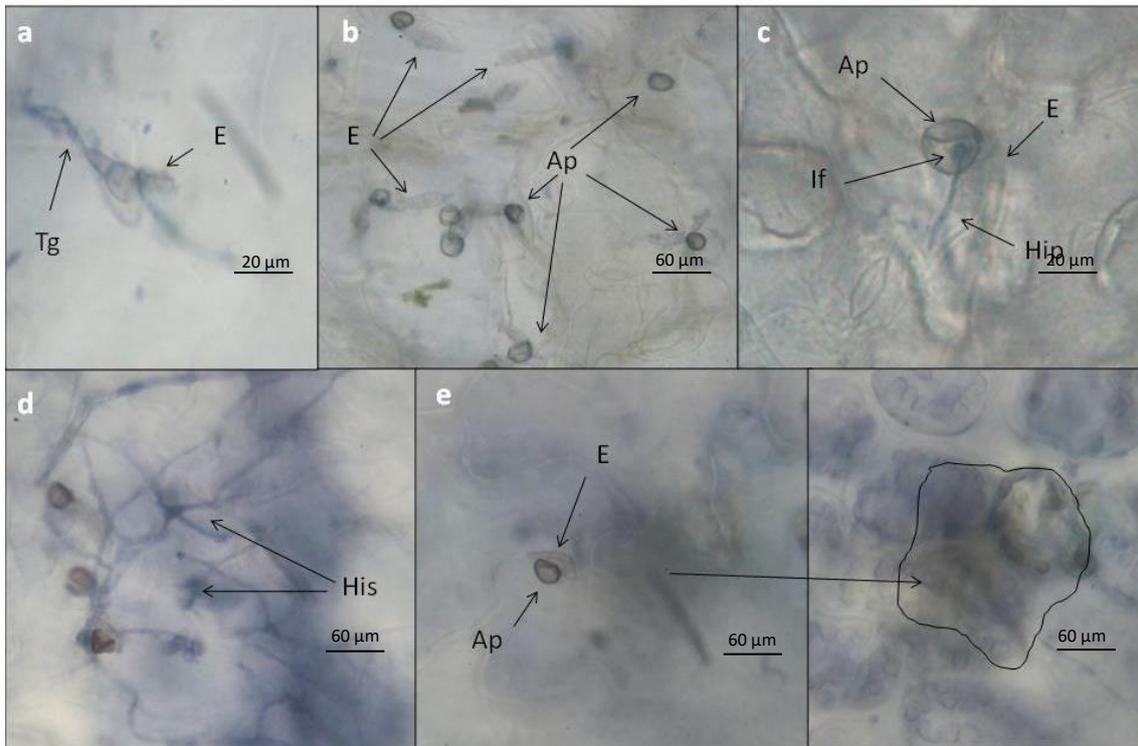


FIGURA 8. Representação dos eventos microscópicos da interação *M. oryzae* x mutantes *de A. thaliana*. (a) Germinação de esporos. (b) Formação do apressório; (c) Início da infecção; (d) Colonização do tecido; (e) Morte de células do mesófilo. E: esporo; Tg: tubo germinativo; Ap: apressório; If: início da infecção; Hip: hifa infectiva primária; His: hifa infectiva secundária.

Nos mutantes *spl11*, *sgt1* e *osrac1* os percentuais de infecção, colonização e morte têm valores aproximados dentro da avaliação de cada mutante, indicando que a maior parte dos esporos que germinaram, formaram apressório, infectaram as células, conseguiram colonizar os tecidos e causar morte celular. Apesar deste resultado indicar que estes são os mutantes com maior percentual de desenvolvimento após a infecção, foram os que apresentaram os menores percentuais de morte celular em 6%, 3% e 1%, respectivamente. Ao contrário, os mutantes *wrky53*, *stp1*, *edr1*, *wrky89* e *hsp90* demonstraram maior percentual de morte celular de 34%, 27%, 21%, 27% e 47%, respectivamente, apesar da tendência de evolução dos percentuais de infecção,

colonização e morte celular não ser a mesma. No caso do mutante *stp1*, os percentuais de colonização e morte celular foram muito baixos e somente aumentaram em 24hai. Este resultado pode indicar que o gene *STP1* está fortemente ligado a repressão dos processos de germinação do esporo, formação do apressório e infecção do que aos processos de colonização e morte celular.

Os genes *EDR1*, *WRKY89* e *WRKY53* mostraram estar mais envolvidos no impedimento da colonização dos tecidos pelo fungo, atuando diretamente na repressão dos processos de germinação do esporo, formação de apressório e infecção. Nota-se que existe uma diferença de mais de 30 pontos percentuais entre os níveis de infecção e de colonização (18hai) (Figura 9), indicando que estes genes devem ser necessários no impedimento do pleno estabelecimento do fungo dentro do seu hospedeiro. O gene *EDR1* mostrou-se importante na ativação da defesa da planta. Nos mutantes *edr1* a severidade foi de 17%, considerada baixa, mas não diferente significativamente dos mutantes de *hsp90*. Nos eventos microscópicos avaliados, este mutante mostrou alta frequência de formação de apressório e infecção, que não foram acompanhadas das frequências de colonização e morte celular. Com este resultado é possível ponderar que este gene pode estar envolvido na ativação de respostas dos primeiros estágios da interação com *M. oryzae*, onde o fungo pode ou não encontrar condições adequadas para aderir ao hospedeiro.

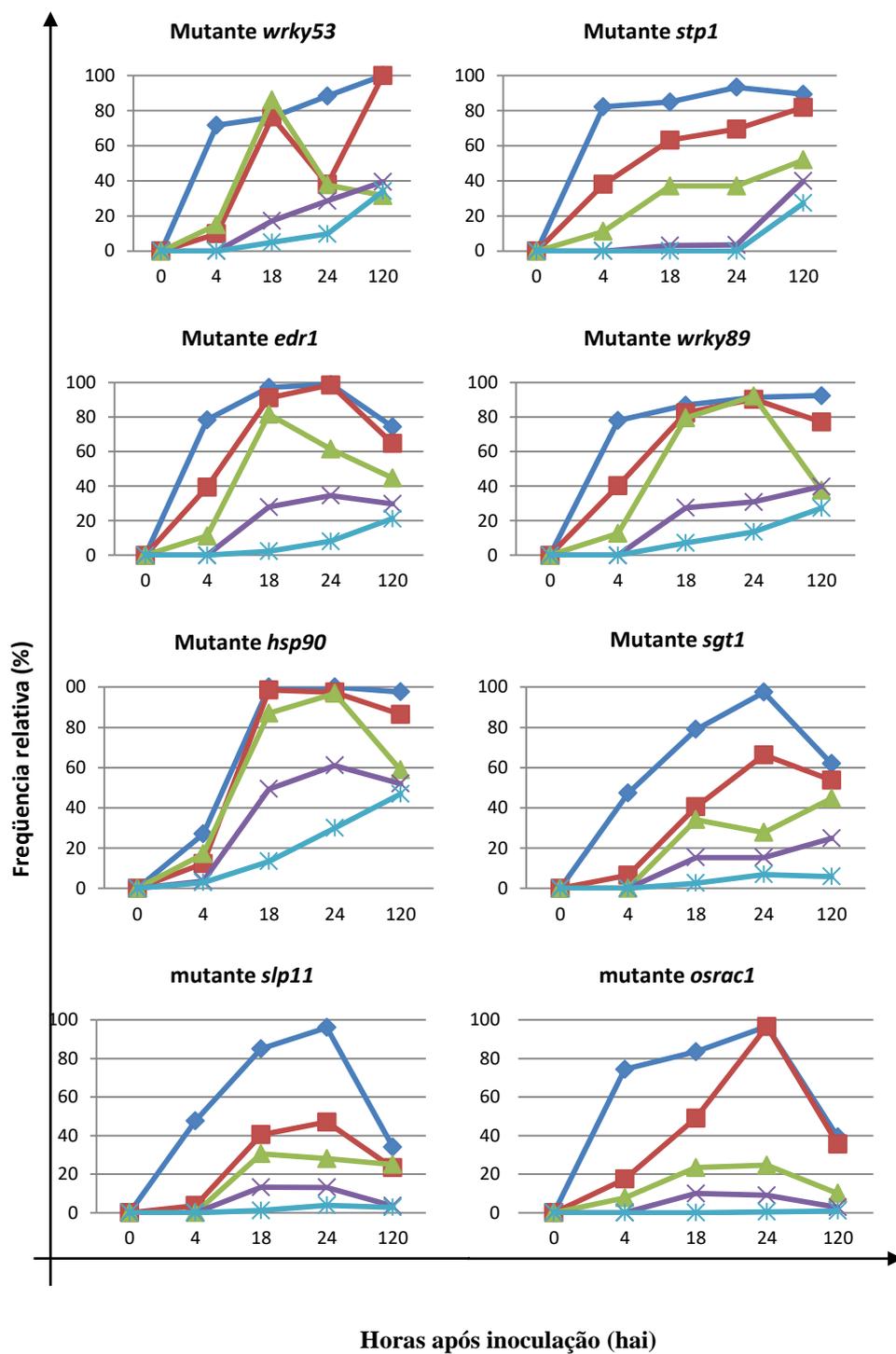


FIGURA 9. Ocorrência de eventos microscópicos na interação entre *M. oryzae* e *A. thaliana* em 0, 4, 18, 24 e 120 hai dos mutantes *wrky53*, *hsp90*, *osrac1*, *spl11*, *sgt1*, *wrky89*, *stp1* e *edr1*. Legenda: ◆: germinação do esporo; ■: formação do apressório; ▲: infecção da célula; ×: colonização do tecido; ✱: morte celular.

De forma global, a partir da análise dos eventos microscópicos, é possível afirmar que os dados concordam com os resultados de severidade. Os mutantes que apresentaram aumento do percentual de morte celular ao longo das horas de coletas, logo após 4hai, são os mesmos onde se observou maior severidade, *hsp90*, *wrky53* e *wrky89*. Somente nos mutantes *hsp90* e *wrky53* os percentuais foram muito similares, em destaque para *hsp90* que obteve os mais altos percentuais de infecção, colonização e morte celular a partir de 4hai.

O gene *HSP90* faz parte do complexo desencadeador de respostas de defesa que é ativado por *OsRAC1*. Os resultados demonstraram que sua ausência aumentou a severidade dos mutantes, ao contrário do que se observou e do que se esperava nos mutantes de *osrac1*, e dos mutantes de *sgt1*, que também faz parte deste mesmo complexo. Dessa forma, pode-se inferir que o gene *HSP90* tem papel independente e fundamental para que a ativação da resposta de defesa através de *OsRAC1* seja transduzida corretamente e a função do complexo seja efetiva. Estes resultados corroboram os de Kanzaki et al. (2003) em plantas de tabaco inoculadas por *P. cichori*, já relatados neste trabalho.

Os genes *WRKY 53* e *WRKY 89* fazem parte da família de genes *WRKY*, e em estudos anteriores (Delteil et al., 2012; Lan et al., 2012; Berri et al., 2009) mostraram estar relacionados com respostas de defesa rápidas, nas primeiras horas após a inoculação. No presente estudo, os mutantes destes genes apresentaram desempenho regular, pois não mostraram diferença de comportamento nas horas iniciais do processo infectivo (germinação, formação de apressório e infecção) dos demais mutantes, mas as frequências de colonização e morte celular a partir de 24hai são mais semelhantes ao mutante *hsp90*. Com estes resultados pode-se inferir que estes genes são importantes em todos os estágios do processo infectivo. Acrescenta-se ainda que estes genes podem

estar sinalizando o final de uma cascata de respostas ativada por genes R, os quais terão níveis elevados de expressão depois das respostas de resistência basal, dias após a infecção e não só nas horas iniciais, atuando em dois momentos distintos da reação de resistência.

4.3. Avaliação das Isolinhas de *O. sativa*

Isolinhas de *O. sativa* foram avaliadas quanto à expressão espacial e temporal dos genes escolhidos. A relação entre as alterações sintomáticas e microscópicas foram analisadas assim como foi realizado com os mutantes de *A. thaliana*, em resposta à infecção por *M. oryzae*. Foram realizadas avaliações de severidade, dos eventos microscópicos e de expressão dos genes escolhidos para este trabalho nestas isolinhas. Em alguns casos foi possível observar uma breve relação entre a resposta de defesa através da ação dos genes de maior efeito, *Pi5*, *Pi1* e *Pi12* com os genes selecionados.

4.3.1 Avaliações de severidade de Brusone das isolinhas de *O. sativa* x *M.*

oryzae

Os sintomas de *M. oryzae* em plantas de *O. sativa* apresentaram-se como pontuações amarronzadas no início da infecção e em reações de resistência. À medida que a doença evoluiu, estas pontuações aumentaram em área na folha e iniciaram a formação de um halo amarelado nas bordas da lesão com o centro acinzentado e pequenas pontuações escuras (centro esporulativo) (Figura 11). Nas isolinhas mais suscetíveis, as lesões evoluíram rapidamente para um aspecto mais seco, causando o enrolamento da folha, e posteriormente morte.

As avaliações de severidade seguiram o padrão segundo Hayashi et al. (2009), que determina notas para classificação de reações de suscetibilidade ou resistência nestas isolinhas. As notas padrão para cada uma são: nota 1 para a isolinha IRBL5-M-*Pi5*, nota 5 para a isolinha LTH, nota 2 para a isolinha IRBL1-CL-*Pi1* e nota 4 para a isolinha IRBL12-M – *Pi12* (Figura 4). De acordo com as avaliações feitas em casa de vegetação, as isolinhas apresentaram as seguintes notas frente à inoculação com o isolado 41: nota 0 IRBL1-CL-*Pi1*, nota 0 IRBL5-M-*Pi5*, nota 5 LTH e nota 4 para IRBL12-M – *Pi12* (Figura 9). Diante do exposto pode-se observar que o padrão de severidade de cada isolinha não difere muito do apresentado por Hayashi et al. (2009), inoculadas com o isolado 41. As isolinhas IRBL1-CL-*Pi1* e IRBL5-M-*Pi5* podem ser consideradas resistentes ao isolado 41, e as isolinhas LTH e IRBL12-M – *Pi12* podem ser consideradas suscetíveis.

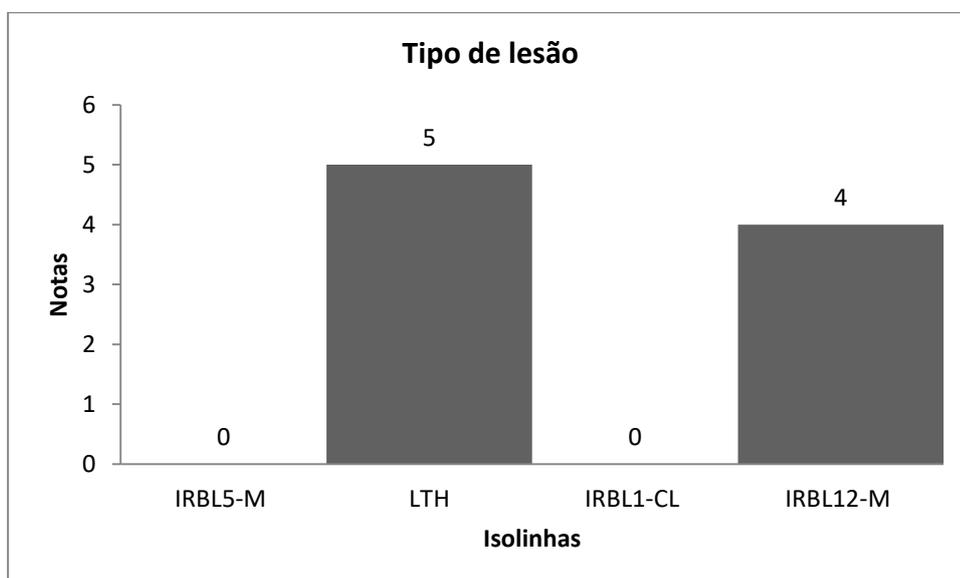


FIGURA 10. Severidade das isolinhas IRBL1-CL-*Pi1*, IRBL5-M-*Pi5*, LTH e IRBL12-M – *Pi12* inoculadas com o isolado 41 da coleção de *M. oryzae*, segundo sistema de notas construído por Hayashi et al. (2009).

Com base nestes resultados, tanto das reações com o isolado 41 quanto com os 39 isolados da coleção, é possível afirmar que as isolinhas IRBL1-CL – *Pi1* e IRBL5-M – *Pi5* mostraram um comportamento resistente à infecção por *M. oryzae*, com a progressão mais lenta das lesões, porém não caracterizando reações de hipersensibilidade, que seriam reações relacionadas à resistência basal. Quanto às isolinhas LTH e IRBL12-M – *Pi12* pode-se afirmar que são suscetíveis, pois apresentaram a progressão mais rápida das lesões e maior severidade. Dessa forma, pode-se inferir que os genes de resistência presentes nas isolinhas têm forte influência em seu comportamento de resposta à infecção por *M. oryzae*, independente do isolado inoculado, caracterizando o tipo de reação de resistência ou suscetibilidade.

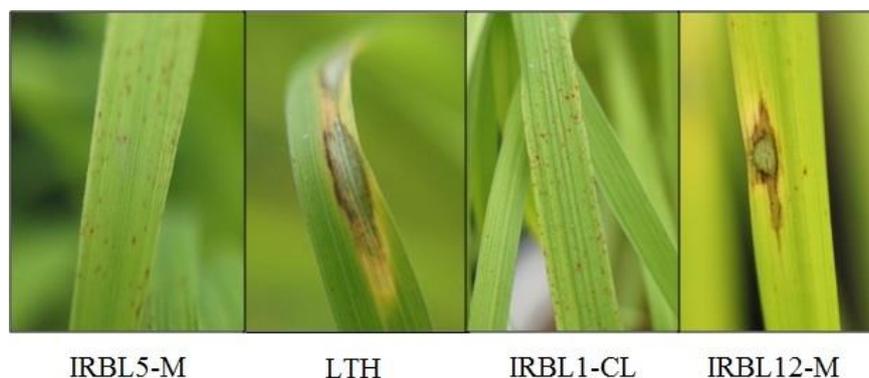


FIGURA 11. Representação fotográfica de sintomas causados pelo isolado 41 da coleção de *M.oryzae* em folhas das isolinhas de *O. sativa* IRBL5-M– *Pi5*, LTH, IRBL1-CL – *Pi1* e IRBL12 –M – *Pi12*.

4.3.2 Avaliações dos eventos microscópicos do processo infeccioso de *M.*

oryzae em *O. sativa*.

Da mesma forma como ocorrido nos mutantes de *A. thaliana*, quanto aos eventos microscópicos, a infecção foi observada tanto diretamente através da epiderme, quanto no limite entre as células e através dos estômatos. A caracterização de cada um dos

eventos analisados nas isolinhas de *O. sativa* está exemplificado na Figura 12. Os parâmetros para diferenciação de cada um dos eventos são os mesmos utilizados nas avaliações de *A. thaliana*, e foram descritos anteriormente.

A partir dos resultados da avaliação dos eventos microscópicos (Figura 13) é possível afirmar que a germinação dos esporos nas quatro isolinhas tende a aumentar ao passar das horas. Em 24 horas após a inoculação as isolinhas IRBL5-M-*Pi5* e IRBL1-CL-*Pi1* atingem 57% de germinação, enquanto que as isolinhas LTH e IRBL5-M-*Pi12* atingem percentual de 100% e 85%, respectivamente.

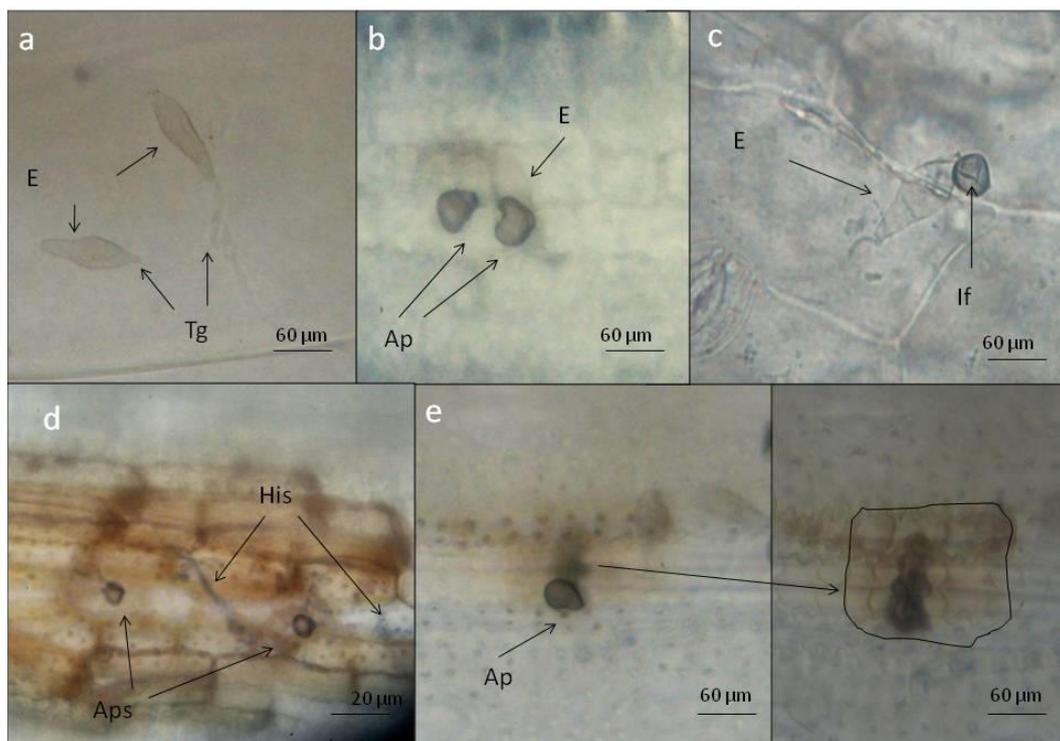


FIGURA 12. Representação dos eventos microscópicos da interação *M. oryzae* x isolinhas de *O. sativa*. (a) Germinação de esporos. (b) Formação de apressório; (c) Início da infecção; (d) Colonização do tecido; (e) Morte de células do mesófilo. E: esporo; Tg: tubo germinativo; Ap: apressório; If: início da infecção; His: hifa infectiva secundária.

Quanto à formação de apressórios, os percentuais tendem a aumentar ao passar do tempo em todas as isolinhas, e os valores mais altos ocorrem em 120hai, exceto na isolinha LTH, cujo percentual de 100% ocorre em 24hai. A formação de apressórios atingiu 53% na isolinha IRBL5-M-*Pi5*, 44% na isolinha IRBL1-CL-*Pi1* e 97% na isolinha IRBL12-M- *Pi12* em 120hai.

Os percentuais de infecção, colonização e morte celular são maiores nas isolinhas LTH e IRBL5-M-*Pi12* em comparação às demais isolinhas. Estes três eventos seguem a mesma tendência de aumento de percentuais em todas as isolinhas, com exceção da isolinha IRBL12-M-*Pi12* que possui a maior frequência de infecção observada em 24hai (71%). A infecção atingiu 44% e 47% nas isolinhas IRBL5-M-*Pi5* e IRBL1-CL-*Pi1*, e 60% na isolinha LTH em 120hai.

Assim como na infecção, o percentual de colonização foi mais alto nas isolinhas LTH e IRBL5-M-*Pi12*, em 24hai já atingiram 38% e 29%, chegando a 52% e 39% a 120hai, respectivamente. Nas isolinhas IRBL5-M-*Pi5* e IRBL1-CL-*Pi1* o máximo percentual em 120hai chegou a 25% e 22% de colonização.

A morte celular foi consideravelmente maior nas isolinhas LTH e IRBL5-M-*Pi12* em todos os tempos, e atingiu 31% e 20% em 24hai e 47% e 34% em 120 hai. Enquanto que as isolinhas IRBL5-M-*Pi5* e IRBL1-CL-*Pi1* apresentaram percentuais de 1% e 2,5% em 24hai e 5% e 7% em 120hai.

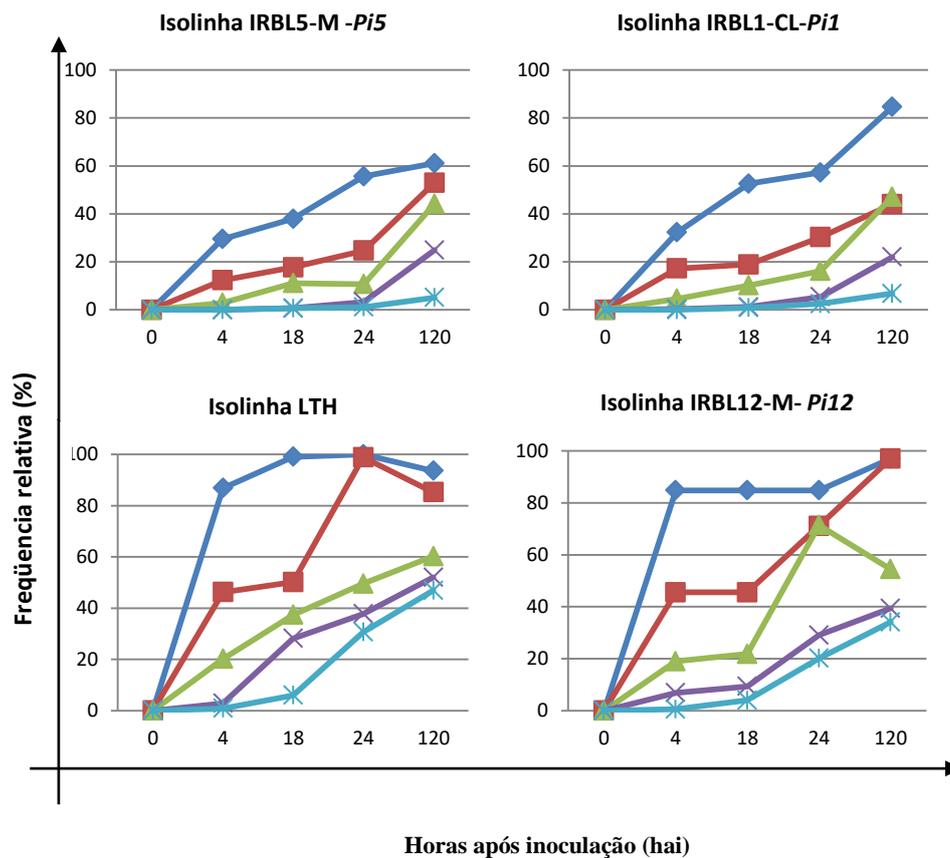


FIGURA 13. Ocorrência de eventos microscópicos na interação entre *M. oryzae* e isolinhas de *O. sativa* IRBL5-M-*Pi5*, IRBL1-CL-*Pi1*, LTH e IRBL12-M-*Pi12*. Legenda: —♦—: germinação do esporo; —■—: formação do apressório; —▲—: infecção da célula; —×—: colonização do tecido; —*—: morte celular.

Em uma análise comparativa, as isolinhas IRBL12-M-*Pi12* e LTH apresentaram resultados similares quanto à avaliação das frequências dos eventos microscópicos, e demonstram ter um perfil de suscetibilidade ao isolado 41 de *M. oryzae*. Já as isolinhas IRBL5-M-*Pi5* e IRBL1-CL-*Pi1* apresentaram um perfil de resistência ao mesmo isolado, com as menores frequências de infecção das células, colonização dos tecidos e morte celular. Em comparação à LTH e IRBL12-M-*Pi12*, os percentuais e a progressão dos eventos ao longo dos tempos de coleta mostraram um perfil mais lento de

desenvolvimento do fungo. Estes resultados reafirmam os resultados obtidos pela avaliação de severidade da doença realizados neste trabalho.

4.4 Quantificação da expressão relativa dos genes candidatos em plantas de *O. sativa*

A fim de realizar a avaliação da expressão relativa dos genes alvos em cada uma das isolinhas, foi realizada a quantificação dessa expressão. Para observar a evolução da expressão foram mensurados os níveis em quatro momentos: antes da inoculação e 4, 18 e 24 horas após a inoculação. Todos os genes demonstraram variações nos seus níveis de expressão durante esta evolução (Figura 14), e apresentaram variação na interação com a ação dos genes de resistência de maior efeito das isolinhas, *Pi5*, *Pi12* e *Pi1*. Os resultados da análise estatística estão demonstrados no Apêndice 3.

Nas avaliações da isolinha LTH, como esperado, todos os genes apresentaram expressão relativa em baixos níveis, dados estes que concordam com as avaliações de severidade e microscopia, e que caracterizam esta isolinha como suscetível. Os resultados obtidos mostraram que para o gene *EDR1* nas isolinhas IRBL5-M-*Pi5*, IRBL1-CL- *Pi1* e LTH não houve diferença significativa entre si quanto à expressão relativa em 24hai. Na isolinha IRBL12-M-*Pi12*, a partir de 18hai o gene aumentou os níveis de expressão e em 24 hai a expressão do gene foi 8 vezes maior se comparada à expressão do gene endógeno. Entre as médias dos níveis de expressão na isolinha IRBL12-M-*Pi12* e as outras isolinhas houve diferença significativa.

Ao comparar estes resultados com os observados na avaliação dos eventos microscópicos e severidade do mutante *edr1*, observou-se uma relação conflitante. Os resultados de expressão relativa apontam para a regulação negativa da resposta de

defesa, enquanto que os resultados de análise microscópica e severidade apontam para regulação positiva, tornando os dados não conclusivos. Segundo os dados de literatura apresentados anteriormente, existe uma variação no comportamento de regulação deste gene, e se relacionados aos presentes resultados pode-se inferir que a cada novo patossistema testado pode ocorrer uma interação diferente a nível molecular das respostas de defesa.

A expressão relativa para os genes *SGT1*, *SPL11* e *OsRac1* não mostrou diferença significativa entre nenhuma das isolinhas. Apesar disso, o nível máximo de expressão foi alcançado em 18 hai por *SPL11* (expressão 5x maior do que o gene endógeno), e em 24 hai por *SGT1* e *OsRac1* (3x e 5x maior do que a expressão do gene endógeno respectivamente) na isolinha IRBL12-M-*Pi12*. Para estes genes, os resultados de análise de severidade dos mutantes e eventos microscópicos mostraram fraca relação com respostas de defesa basal (baixo percentual de severidade, infecção, colonização e morte celular), apesar de apresentarem resultados de regulação positiva em comparação com as plantas controle do ecótipo Columbia (Figura 14), e anteriormente relatados na literatura.

Na análise de expressão dos genes *STP1* e *HSP90* os níveis foram maiores em 24 hai na isolinha IRBL5-M-*Pi5* (4 vezes e 55 vezes, respectivamente), cujos resultados de reações de resistência e avaliação de sintomas caracterizaram a isolinha como uma das mais resistentes à infecção por *M. oryzae*. Porém não mostraram diferença significativa de expressão relativa na isolinha IRBL1-CL-*Pi1*, cujo gene pode estar liderando as respostas de defesa. Como esperado, partindo dos resultados obtidos nas avaliações dos mutantes, o gene *HSP90* confirmou potencial ligação com a resistência basal, visto que mostrou a expressão aumentada justamente na isolinha resistente ao *M. oryzae*, IRBL5-M-*Pi5* em 18 hai, o que mostra uma resposta rápida à tentativa de infecção pelo fungo.

Os resultados da avaliação de expressão relativa para o gene *STP1* concordam com os obtidos nas avaliações dos mutantes, apesar da baixa frequência de colonização e morte celular observada em microscopia. Estes resultados apontam para a relação do aumento da expressão deste gene em momentos específicos da interação, determinando a diminuição da capacidade de colonização do fungo e de causar morte celular.

A expressão relativa do gene *WRKY53* avaliada na isolinha *IRBL1-CL-Pi1* mostrou diferença significativa em relação às demais isolinhas. Os níveis de expressão foram aumentados a partir de 18 hai, e em 24 hai a expressão foi 33 vezes maior em comparação com a expressão do gene endógeno. A isolinha *IRBL1-CL-Pi1*, assim como a isolinha *IRBL5-M-Pi5*, demonstrou resistência em resposta à infecção por *M. oryzae*. Ao comparar os resultados de microscopia dos mutantes de *A. thaliana* com os dados acima obtidos, nota-se que as frequências de colonização e morte celular a partir de 18 hai ocorrem ao mesmo passo que o aumento dos níveis de expressão do gene *WRKY53* na isolinha *IRBL1-CL-Pi1*, caracterizada como resistente. Dessa forma, este gene demonstra potencial ligação com a regulação das respostas anteriores ao estabelecimento de *M. oryzae* dentro do hospedeiro, e em momentos de resposta rápida, relacionados à resistência basal. Segundo Delteil et al. (2012) e Chen & Ronald (2011), o gene *WRKY53* está ligado à defesa de plantas, mas não havia confirmações de que poderia estar atuando já nos primeiros tempos após o início do processo infectivo. Os resultados aqui apresentados mostram evidências de que este gene pode estar ligado à defesa basal.

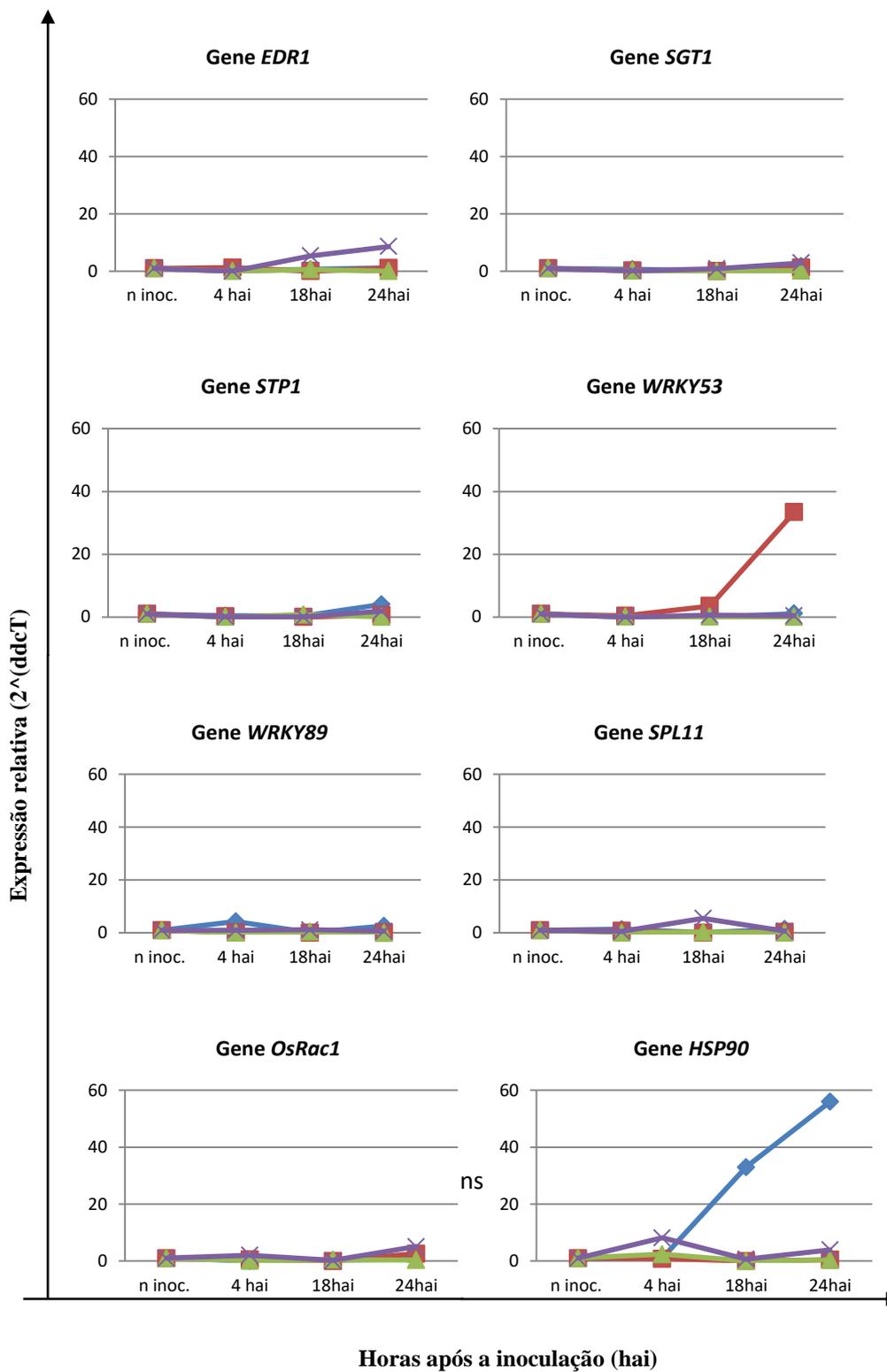


FIGURA 14. Quantificação relativa da expressão dos genes *EDR1*, *SGT1*, *STP1*, *WRKY53*, *WRKY89*, *SPL11*, *OsRac1* e *HSP90* nas isolinhas IRBL5-M-*Pi5* (▲), IRBL1-CL-*Pi1* (■), LTH (★) e IRBL12-M-*Pi2* (×).

Os valores de expressão para o gene *WRKY89* diferiram significativamente entre si quando confrontados entre a isolinha IRBL5-M-*Pi5* e as demais isolinhas. No entanto o gráfico aponta para um aumento do nível de expressão relativa 4hai, sendo 4 vezes maior do que o endógeno. Após 18 hai os níveis de expressão caem a quase 0, e em 24 hai aumentam para 2,5 vezes. Ainda que observada diferença estatística, os níveis de expressão relativa são considerados baixos em relação à expressão do gene endógeno. Embora os dados acima apresentados apontem para baixa relação com respostas de defesa basal, os resultados de avaliação da severidade e de eventos microscópicos nos mutantes de *A. thaliana* mostram que o gene *WRKY89* tem potencial participação nas respostas de defesa basal, e pode estar agindo na repressão do estabelecimento de *M. oryzae* nas células de *O. sativa*.

4.5 Fluxo de ação do genes

A partir dos resultados obtidos neste trabalho um fluxo da ação dos genes que apresentaram resultados relevantes na investigação da resistência basal à *M. oryzae* foi formulado. Este fluxo de ações demonstra exatamente onde cada gene pode estar atuando na interação, em cada um dos momentos do processo infectivo: germinação do esporo, formação do apressório, infecção da célula hospedeira, colonização do tecido e morte celular.

O gene *STP1* mostrou principalmente um potencial para a repressão dos processos de germinação do esporo, formação do apressório e infecção das células. Apesar dos resultados de severidade apontarem para um aumento dos percentuais na ausência do gene, as análises de microscopia indicam aumento na colonização e morte

celular somente a partir de 24hai. O gene *STP1* mostrou respostas independentes ao gene da isolinha IRBL1-CL-*Pi1*.

O gene *WRKY89*, apesar de apresentar-se promissor nas avaliações de severidade dos mutantes de *A. thaliana*, não manteve a mesma linha de resultados nas avaliações de expressão gênica das isolinhas de *O. sativa* pelo baixo nível de expressão. Porém, segundo as avaliações microscópicas do mutante *wky89*, o gene *WRKY89* demonstra regular negativamente a germinação do esporo, formação de apressório, infecção, colonização e morte celular.

O gene *HSP90* e o gene *WRKY53*, nas avaliações dos mutantes, foram o mais promissores quanto à conexão com as respostas de defesa basal, demonstrando reprimir todos os processos de germinação, formação de apressório, infecção, colonização e morte celular (Figura 14). Os genes *HSP90* e *WRKY53* mostraram possuir respostas dependentes ao gene da isolinha IRBL5-M-*Pi5* e IRBL1-CL-*Pi1*, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Na investigação dos mecanismos de resistência basal da interação *M. oryzae* x *O. sativa* foi possível identificar:

- Os genes *STP1*, *WRKY53*, *WRKY89* e *HSP90* estão envolvidos na resistência basal de *M. oryzae*, atuando na paralisação do estágio de infecção do fungo contribuindo para a resistência nas primeiras horas após a inoculação.

- Os genes *WRKY53* e *HSP90* atuam na regulação negativa de todas as etapas da interação, e mostraram ser dependentes do gene de resistência de efeito maior na isolinha IRBL1-CL-*Pi1* e IRBL5-M-*Pi5*, respectivamente.

- O gene *STP1* mostra indícios de estar ligado à repressão da etapa de germinação dos esporos, formação de apressório e infecção, evitando assim o estabelecimento do fungo no hospedeiro. Este gene evidenciou ser dependente do gene de resistência da isolinha IRBL5-M-*Pi5*.

- O gene *WRKY89*, embora tenha apresentado resultados de expressão gênica de valores baixos, segundo os resultados de avaliação da severidade e de eventos microscópicos nos mutantes de *A. thaliana*, mostrou fortes indícios de envolvimento na promoção de respostas de defesa basal, e pode estar agindo na repressão do estabelecimento de *M. oryzae* nas células de *O. sativa*.

- Para todos os genes que apresentaram potencial relação com a regulação da resistência basal são necessários aprofundamentos das avaliações nos primeiros momentos em 4hai, como a observação da formação de papilas e espécies reativas de oxigênio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AN, C.; MOU, Z. Non-Host Defense Response in a Novel Arabidopsis-Xanthomonas citri subsp. citri Pathosystem. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, 2012.
- BARCELLOS, F. G.; PIZZIRANI-KLEINER, A. P. Genetic characterization of somatic recombination in trichoderma pseudokoningii. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 152-156, 2003.
- BENDER,¹ C. M.. et al. Histopathology of Leaf Rust Infection and Development in Wheat Genotypes containing Lr12 and Lr13. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v. 148, p 65–76, 2000.
- BERRI, S. et al. Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and Arabidopsis. **BioMedCentral Plant Biology**, London, v.9, p. 22, 2009.
- BORROMEO, E. S. et al. Genetic differentiation among isolates of Pyricularia infecting rice and weed hosts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 393-399, 1993.
- BUGOS, R.C. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, New York, v. 19, n.5, p. 734-737, 1995.
- BOTËR, M. et al. Structural and Functional Analysis of SGT1 Reveals That Its Interaction with HSP90 Is Required for the Accumulation of Rx, an R Protein Involved in Plant Immunity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 3791-3804, 2007.
- COLL, N.; EPPLD, P.; DANGL, J. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 18, p. 1247–1256, 2011.
- COUCH, B. C. et al. Origins of host-specific populations of the blast pathogen Magnaporthe oryzae in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, Rockville, v. 170, p. 613–630, 2005.
- CHEN, X.; RONALD, C. P. Innate immunity in rice. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 16, p. 451-459, 2011.
- CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of magnaporthe grisea. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 3, p. 136-143, 1990.

CRAWFORD, M. S. et al. Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of magnaporthe grisea. **Genetics**, Rockville, v. 114, p. 1111-1129, 1986.

DEAN, R.A. et al. The genome sequence of the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. **Nature**, London, v. 434, p. 980-986, 2005.

DEISING, H. B.; WERNER, S.; WERNITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 2, p. 1631-1641, 2000.

DELTEIL, A. et al. Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.13, p. 72-82, 2012.

FAN, J.; DOERNER, P. Genetic and molecular basis of nonhost disease resistance: complex, yes.; silver bullet, no. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.15, p.400-406, 2012.

FENG, J. et al. Involvement of OsNPR1/NH1 in rice basal resistance to blast fungus Magnaporthe oryzae. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, p. 221-235, 2011.

FRYE, C. A.; INNES, R. W. An Arabidopsis Mutant with Enhanced Resistance to Powdery Mildew. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, 947-956, 1998.

FRYE, C.A.; TANG.; INNES, R.W. Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK Kinase. **Proceedings National Academy of Science**, Washington, v. 98, p. 373-378, 2001.

HAYASHI, N. et al. Protocols for the sampling of diseased specimens and evaluation of blast disease in rice. **JIRCAS Working Report**, Tsukuba, v .63, p. 17-33, 2009.

HIRUMA, K. et al. Arabidopsis enhanced disease resistance 1 is required for pathogen-induced expression of plant defensins in nonhost resistance, and acts through interference of MYC2-mediated repressor function. **The Plant Journal**, Oxford, v. 67, p. 980-992, 2011.

HIRUMA, K.; TAKANO, Y. Roles of EDR1 in non-host resistance of Arabidopsis. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 6, p. 1831-1833, 2011.

HIUTEMA, E. et al. Active defence responses associated with non-host resistance of Arabidopsis thaliana to the oomycete pathogen Phytophthora infestans. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.4, p. 487-500, 2003.

HOLUB, B. E.; COOPER, A. Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v.9, p.211-214, 2004.

HOWARD, R. J.; VALENT, B. Breaking and entering: Host Penetration by the Fungal Rice Blast Pathogen Magnaporthe grisea. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 50. p. 491-512, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Municipal Anual**. 2011. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 21 nov. 2012.

JACOBSON, E. S. Pathogenic Roles for Fungal Melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, p. 708–717, 2000.

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

PARK, J. et al. Rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) infects arabidopsis via a mechanism distinct from that required for the infection of rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, p. 474–486, 2009.

KANZAKI, H. et al. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 4, p. 383–391, 2003.

KHANG, C. H. et al. Translocation of *Magnaporthe oryzae* Effectors into Rice Cells and Their Subsequent Cell-to-Cell Movement. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 1388–1403, 2010.

KONG, L.A. et al. Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, p. 295-308, 2012.

KOU, S.; WANG, S. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p.81–185,2010.

LARA-ÁLVAREZ, I. et al. Evidence for Rapid Changes in the Population Genetic Structure of *Magnaporthe oryzae* in Southern Spain. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 158, p.785–791, 2010.

LAN, A. et al. A salicylic acid-induced rice (*Oryza sativa* L.) transcription factor OsWRKY77 is involved in disease resistance of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 14, p. 1-9, 2012

LEUNG, H.; BERNARDO, M. A.; NOTTEGHEM, J. L. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1227-1233, 1988.

LIMA, M. I. P. M. Giberela ou Brusone? Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada. Passo Fundo: Embrapa trigo, 2004.

LIPKA, U.; FUCHS, R.; LIPKA, V. *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 404–411, 2008.

LIU, J. et al. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice–*Magnaporthe oryzae* interaction. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 3, p. 419–427, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. **Methods**, Minneapolis, v. 25, p. 402–408, 2001.

MAEDA, A. et al. AGB1 and PMR5 Contribute to PEN2-Mediated Preinvasion Resistance to *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, p. 1331–1340, 2009.

MAEDA, K. et al. Nonhost resistance to *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, p. 755–756, 2010.

NAKAO, M. et al. Non-host resistance to penetration and hyphal growth of *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis*. **Scientific Reports**, London, v. 171, 2011.

NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 6, p. 335–345, 2005.

PARK, J. et al. Rice Blast Fungus (*Magnaporthe oryzae*) Infects *Arabidopsis* via a Mechanism Distinct from That Required for the Infection of Rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, p. 474–486, 2009.

PEART, J. R. et al. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. **Proceedings National Academy of Science**, Washington, v. 99, p. 10865–10869, 2002.

PONTECORVO, G. The parasexual cycle of fungi. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 10, p. 393–400, 1956.

SCHNEIDER, D. J.; COLLMER, A. Studying Plant-Pathogen Interactions in the Genomics Era: Beyond Molecular Koch's Postulates to Systems Biology. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 457–479, 2010.

SILUÉ, D.; NOTTEGHEM, J. L.; THARREAU, D. Evidence of gene-for-gene relationship in the *Oriza sativa*-*Magnaporthe grisea* Pathosystem. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 577–580, 1992.

SINGH, K.; MULTANI, D.S.; KHUSH, G.S. A new spotted leaf mutant in rice. **Rice Genetic Newsletter**, Mishima, v. 12, p. 192–193, 1995.

SHI, Z.; LEUNG, H. Genetic analysis of sporulation in *Magnaporthe grisea* by chemical and insertional mutagenesis. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 8, n° 6, p. 949–959, 1995.

SHIDHAR, R. et al. Usefulness of blast resistance genes and their combinations in different blast-endemic locations in India. **International Rice Research Notes**, Los Baños, v. 24, 1999.

TALBOT, N.J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe oryzae*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 177–202. 2003.

TALBOT, N. J. et al. Karyotypic Variation within Clonal Lineages of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 585–5, 1993.

- TANG, D.; CHRISTIANSEN, K. M.; INNES, R. W. Regulation of Plant Disease Resistance, Stress Responses, Cell Death, and Ethylene Signaling in Arabidopsis by the EDR1 Protein Kinase 1. **Plant Physiology**, Washington, v. 138, p. 1018–1026, 2005.
- TARSE, A. et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. **Oncogene**, London, v. 26, p. 2606–2620, 2003.
- TRANG, D.T.T. et al. Identification of pi-km stable blast resistance gene in some rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Annals of Biological Research**, Payame, v. 3, p.322–329, 2012.
- TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. **Current Opinion of Plant Biology**, London, v. 13, p. 459–465, 2010.
- UMA, T. B.; RANI, S.; PODILE, A. R. Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, p. 2141–2152, 2011.
- UPPALAPATI, S. R. et al. SGT1 contributes to coronatine signaling and *Pseudomonas syringae* pv. tomato disease symptom development in tomato and Arabidopsis. **New Phytologist**, Saint Paul, v. 189, p. 83–93, 2011.
- URASHIMA, A. S.; LEITE, S. F.; GALBIERI, R. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 275–279, 2007.
- VALENT, B. Rice blast as a model system for plant pathology. **Phytopathology**, Saint Paul, v.80, p.33–36. 1990.
- VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v.29, p.443–467. 1991.
- ZENG, L. et al. Spotted leaf11, a Negative Regulator of Plant Cell Death and Defense, Encodes a U-Box/Armadillo Repeat Protein Endowed with E3 Ubiquitin Ligase Activity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2795–2808, 2004.
- ZHU, X. et al. The identification of Pi50(t), a new member of the rice blast resistance Pi2/Pi9 multigene family. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 124, p. 1295–1304, 2012.
- ZEIGLER, R. S. Recombination in *Magnaporthe grisea*. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p.249–75, 1998.
- ZELLERHOFF, N. et al. Nonhost Resistance of Barley to Different Fungal Pathogens Is Associated with Largely Distinct, Quantitative Transcriptional Responses. **Plant Physiology**, Washington, v. 152, p. 2053–2066, 2010.
- WANG, Z. H. Induction and mutation mechanism of plant lesion mimic mutants. **Chinese Journal of Cell Biology**, Shanghai, v. 27, p. 530–534, 2005.

WEI, T. et al. Transcriptional Profiling of Rice Early Response to *Magnaporthe oryzae* Identified OsWRKYs as Important Regulators in Rice Blast Resistance. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, 2013.

WEN, Y. et al. Identification and utilization of a sow thistle powdery mildew as a poorly adapted pathogen to dissect post-invasion non-host resistance mechanisms in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 2117–2129, 2011.

YOKOTANI, N. et al. WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 5085–5097, 2013.

YIN, Z. et al. Characterizing Rice Lesion Mimic Mutants and Identifying a Mutant with Broad-Spectrum Resistance to Rice Blast and Bacterial Blight. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, p. 869–876, 2000.

XU, X. et al. Characterization and mapping of a spotted leaf mutant in rice (*Oryza sativa*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 406-413, 2014.

7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Tabela comparativa dos genes escolhidos para as duas espécies de estudo, *O. sativa* e *A. thaliana*.

GENE	ESPÉCIE	TIPO DE TRANSFORMAÇÃO	%QUER Y	MAX. IDENT.	PRODUTO ou GENE	FUNÇÃO
EDR1	<i>O. sativa</i> Arabidopsis	Inserção de T-DNA	-- 90%	-- 48%	EDR1	regulador negativo de respostas da via do etileno
HSP90	<i>O. sativa</i> Arabidopsis	Inserção de T-DNA	-- 99%	-- 91%	Proteína de choque contra calor 90.2, 81.2	transdução do sinal de imunidade dado por <i>OsRAC1</i>
OsRac1	<i>O. sativa</i> Arabidopsis	Inserção de T-DNA	-- 88%	-- 83%	ARAC7	proteína G sinalizadora da superfície da célula
SGT1	<i>O. sativa</i> Arabidopsis	Inserção de T-DNA	-- 63%	-- 71%	SGT1b,	transdução do sinal de imunidade dado por <i>OsRAC1</i>
SPL11	<i>O. sativa</i> Arabidopsis	Inserção de T-DNA	-- 94%	-- 58%	PUB13	gene mutante que mimetiza lesão
STP1	Arabidopsis <i>O. sativa</i>	Inserção de T-DNA --	-- 92%	-- 69%	-- Transportador de monossacarídeo 3	fatores de transcrição na sinalização de respostas de defesa bióticas e abióticas
WRKY53	<i>O. sativa</i> Arabidopsis	Inserção de T-DNA	-- 88%	-- 46%	Fator de transcrição 33 – WRKY33 --	fatores de transcrição na sinalização de respostas de defesa bióticas e abióticas
WRKY89	<i>O. sativa</i> Arabidopsis	Inserção de T-DNA	-- 69%	-- 32%	Fator de transcrição 46 – WRKY 46 --	fatores de transcrição na sinalização de respostas de defesa bióticas e abióticas

APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

EDR1

Oryza sativa

>gi|32394964|gb|AY167575.1| *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) EDR1 (EDR1) mRNA, complete cds
 GCGGAGACGTGGTTGACGAGATGAAGAATCTGTTCAAGAGTAAGATCAAGTGGCAGCACCGGTGGAAC
 GACCCCGCGTCGTCGAGGGGCAGGGGCAGGGGCTGCCGACGACGCCCGCTGCCATCGCCGGCC
 AGCTCCCCGTCGGGGGGCCGCTGCGCTATCCGTGTCGACGGTATCGTCGTCGTCGCCCTCCGCCGCC
 GCGACGCCGACGGGGGCTGGCTGCGGCGGGGCCGGGAGGTGGGGGTGGGGGAACGGGTGGGGAGGAT
 TACATGTTGTCGGAGGAGGAGTTCCAGATGCAGCTGGCGATGGCACTGTCGGCGTCCAACAGCGAGTG
 CGTGGGCGACCTGGACGGGGAGCAGATCAGGAAGGCCAAGCTGATAAGCCTCGGCAGGGGCAACCGC
 TTCGCCCGCTCCGGGACGACGAGCAAACCGCGGATGCGCTCTCCCGCCGCTACCGGGACTACAACTTT
 CTTGATTACCATGAGAAAAGTTATTGATGGCTTCTATGACATTTTTGGCCCTCTATGGAATCATCAAAGC
 AAGGGAAGATGCCATCACTAGCAGATCTTCAAACGGGCATAGGCGACCTGGGTTTTGAAGTCATCGTA
 ATCAATCGTGCCATTGATACCACCTTACAGGAGATGGAACAAGTTGCACAATGTATCCTGCTTGACTTT
 CCTGTTGCAAATATTGCAGCCTTAGTTCAAAGAATAGCCGAGCTTGTTACAGATCACATGGGTGGACCT
 GTGAAAGATGCAAATGACATGCTCACTAGATGGCTAGAGAAAAGCACTGAGCTAAGAACCTCACTACA
 CACAAGTTTGTTCCTATTGGCTGCATCAAGATAGGTCTGTCTCGTCACCGTGCCCTACTTTTCAAGATT
 CTCGCTGATAGTGTGGCATTCTTGAAGCTTGTCAAAGGGAGTAATTATACTGGTGTATGATGATGAT
 GCTATCAACATAATAAAGATGAATGAAAGGGAGTTTTTGGTTGATCTCATGGCTGCTCCCGTACTCTT
 ATTCCATCAGATGTCTTAAGTTGGAAGGGCAACTCATTAAATCTAATGCAAGACTCACCCAGAATCCA
 TTGGCTGGGTCATCAAGTACAAGTATTCTAATCTCAGTGCCAATGCATTACCACCCGGACATAAAGGT
 GGCCAACTGCCTTTATTTAGCAGTGGCGATTGGATATTGGCCAGTCAATCTGGATATGAAAAAGATGGA
 GCCACCACATCTTACAGGCCTCTTCAAGTGGCACAACATCTGTTGCTGCTGGAAGCGCTTTTGATAGTT
 CTTGGACATTAGTTTCTCATGGACAATCAGATGATCCATCAACCTCTGCTGGTATGTCAGCACAGCAGA
 AAGTTATACTTCCAGGTGGAGAACATCCATGGAATGAGAATATAAATGCGCGAAATGAGAATATAAAA
 CTTGTTTCAGATTTACAAGGGAATTCAGAGTCCATCAACTTATTTGCCGACCTTAATCCTTTTGGGGGTA
 GGGAGCCCAAAGGACTTCAGTGCCATTAATGGGCCAGATAATAGAAATAATGAGTTGCAAAGACGC
 AGAGAGAATGTAGTCCCTAGCACACGAAGACCCAGCAGCGATTAGTTATGAAAACTGGTCTCCTTA
 CAATGATGTTTCCAACAACAAGCAGTACAATTATGTTGAGGATTCATTTGCACGTAGAAATATTGGTGA
 TAATGCTGCATCATCTCAGGTGGCAGGCCATCTGCAAAAAATACTAATCTTAATGTTGGAGTGCG
 CACTGATACACCATACATGGCAGCTCATAATTATGATAATAGTATGGCTGGTTCCTCTGCAATGAAGAT
 GACTTCTACAGCTGGGATTGGGAAGGTTCTGATAAGGTTCTGTACGGTGATTGGACAAGGGCCTTAC
 TAATTCTAGACTGGGGGATCAACCACCGATAGAAAAGACATAAATGGGGCAATTCTGTAGAAGGAAGGA
 TTCCAACAGGCACAGTTCACAATCAAGCAAAAGAACACAAGGAGAACTTCGATGGAAAGCAAGACAA
 TAAGAAGTTACATCCTGATCCAAAGAAATCCCCACTTGACAGATTCATGGACACATCAATGCCATCAAG
 GAACCCTGAATCCGTTTACCATCCTTTGCTAGGTACACAAGCTAGACACCATGTTTCGACGATGTGTC
 TGAATGTGAAATTCATTGGGAAGATCTTGTGATTGGTGAAGGATTGGCTTAGGTTTCATATGGAGAGGT
 GTACCGTGCTGATTGGAATGGAACAGAAGTAGCTGTCAAGAAATCTTGGATCAAGATTTCTATGGTGA
 TGCTTTGGATGAATCCGGAGTGAAGTGGGATTATGCGTGCAGTGCATCCAAATATTGTTCTCTTC
 ATGGGTGCTGTTACTCGTCTCCAACTTATCTATTGTATCTGAGTATCTTCCAAGGGGAAGCTTATATA
 AGATCCTTACCCTCCTAATTGCCAAATTGACGAGAAGCGTAGAATTTAAATGGCCCTTGATGTGGCCA
 AAGGAATGAATTGCCTCCATATTAGTGTACCAACAATTGTTTCATCGGGATCTTAAATCACAACTTGC
 TGTTGACAACAAGTGAAGGTTTGTGATTTTGGACTTTCACGCTTGAAGCACAGTACATTCT
 TATCATCCAAATCCACTGCTGGAAGTCCGGAGTGGATGGCACCTGAGGTCTTGCAGGAATGAACAATCAA
 ATGAAAAGTGTGATGTTTACAGCTTTGGTGTCTCTTGTGGGAATTAGCAACACTTAGGATGCCATGGA
 GTGGAATGAATCCAATGCAAGTTGTTGGGGCAGTCGGCTTCCAGGACAAGCGGCTCGATATTCCCAAG
 GAAATTGATCCTTAGTTGCAAGGATCATATGGGAATGCTGGCAGAAGGATCCAAATTTGCGGCCCTCG
 TTTGCACAGTTAACCAGTGCTTTGAAGACTGTCCAAAGGCTAGTAACCCCTTCTACCAGGAGTCCCAG
 AGCCCTCTGTGCCTCAAGAAATATGGGTGAATTTCCACCCCTTGATGTTGAGGGGCATTCCACTCTC
 AAAATTGTGAGTAATTATTGATGATTGTTGCTGTTAAGTTTGTTCAGTCTGCAAATGTGGGCGCACTGT

Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

AGATTCTAGCGGCCCTAATGGTAGACATCCCTGCTGCCGCGACAAAAGAACCAGCAGTAGAGTATGT
ATAGAGACTATAGTCATCGACAAAACGATGACCCGAAGAAGAAATCCAGTCTGTGGCATCTCATT
CAAAAAA

A. *thaliana*: Acesso AT1G08720

ATGAAGCATATTTTCAAGAAGCTACACAGAGGTGGGAATCAAGAGCAGCAGAATCGAACCAACGATGC
AGCTCCTCCATCGGATCAAAATCGGATTACGTTTCTGCTAATCCTCCTCAAGCAACCCCTTCGTCAGTC
ACTGAGACGCTTCCGGTGGCCGGAGCTACTTCTTCTATGGCCTCTCCTGCTCCAACCGCTGCTTCGAACC
GTGCGGATTACATGTCTTCTGAGGAGGAGTATCAAGTGCAGTTAGCCCTAGCGATCAGTGCTTCGAATT
CGCAGTCCAGTGAGGATCCGGAGAAGCATCAGATCCGAGCGGCGACGCTTCTGAGCTTAGGAAGCCAT
CAACGGATGGATTCAAGGAGGGATTATCGGAGGTGGTAGCCAGAGGTTATCGAGACAGTACTGGGA
ATATGGCGTGCTTGACTATGAGGAGAAAGTTGTCGATAGTTTCTACGACGTATACAGTCTATCCACAGA
CTCCGCAAAGCAGGGAGAAATGCCATCGCTGGAAGATCTTGAAAGCAATCATGGCACACCTGGCTTTG
AAGCTGTAGTTGAAAATCGACCTATTGATTCTCCCTGCATGAGTTGCTAGAAATCGCAGAGTGTATTG
CACTGGGTTGTTCTACTACCAGTGTTAGTGTGTTGGTACAGAGGCTGGCTGAGCTTGTACCGGAGCATA
TGGGTGGATCTGCGGAAGATTCCAGTATAGTATTGGCAAGGTGGACTGAAAAAGCAGCGAGTTCAAG
GCAGCATTGAATACTTGCATATTCCCTATTGGATTTGTAAGATTGGTATCTCAAGGCATCGTGCTCTGC
TTTTCAAGGTTTTGGCAGATAGTGTGAGGTTACCTTGTAGGTTGGTAAAAGGTAGCCACTACACAGGCA
ATGAGGATGATGCTGTGAACACGATAAAGACTGGAAGATGAAAGAGAGTACTTGGTTGATCTTATGACA
GATCCTGGGACGCTTATACCCGCTGATTTTGCAAGTGCTAGTAATAACACCGTTGAGCCATGTAECTCA
AATGAAAACAAATTTCTACAGCTCAGTTTTCAAATGACGTGCCAAAGCTCTCAGAAGGTGAAGGAAG
TAGTCACAGTTCTATGGCCAACTATAGTTCTTCTTTGGATAGAAGGACAGAGGCTGAAAGGACAGATTC
TTCATACCCAAAGGTGGGACCCTTCGGAACATAGACTATAGTTCTCCTTCTAGCGTAACTAGTTCTACT
CAGTTGGAGAACAATTCCTCAACAGCAATTGGAAAAGGGGAGTCGAGGAGCCATAATTGAATGTTCAAG
AACAAACATGAATATAGTTCTTACAATCAGAACAGTGAGGAAGACCCAAAAAACCTTTTCGCAGACC
TTAATCCATTTCAAAAATAAGGGAGCTGACAAGCTGTATATGCCCACTAAATCAGGTTTGAATAACGTTG
ATGATTTTCATCAACAGAAAAATAATCCTCTGGTTGGTAGATCACCTGCGCCAATGATGTGGAAGAATT
ACAGTTGCAATGAAGCCCCAAAGAGAAAGGAGAATAGTTATATAGAAAATCTTCTCCCGAAACTCCAC
CGTGATCCTCGTTATGAAAACACTCAATCCTCATATGCTACCTCAAGCTCCAATGGAGCTATTTCTCTCA
ATGTGCATGGCAGAGACAATGTGACATTTGTGTCACCGGTTGCTGTACCATCATCCTTCACATCCACTG
AAAATCAGTTTAGACCAAGTATAGTGGAGGATATGAACAGAAAACACCAACAATGAACTAGATCTTCAG
CCTCATACTGCTGCTGTGGTACATGGACAACAGAATGATGAATCTCACATCCATGATCACAGAAAGTAC
ACAAGTGATGACATATCCACTGGCTGTGATCCGAGGCTTAAGGATCACGAAAGTACAAGTTCATCTCTT
GATTCTACATCCTACCGAATGATCCTCAAGTTCTTGATGATGCAGATGTTGGTGAATGTGAAATTCCTT
GGAATGATCTCGTTATTGCGGAGAGAATAGGATTAGGTCCTATGGAGAGGTCTATCATGCTGACTGGC
ATGGCACGGAAGTTGCTGTCAAGAAATTTTTGGACCAGGACTTCTCAGGTGCTGCTTTAGCCGAGTTCA
GAAGCGAAGTACGGATTATGCGAAGATTGCGTCATCAAATGTTGTATTCTTCTTGGGGCTGTTACTC
GTCTCCAAATCTTCCATCGTCACAGAGTTTCTGCCTAGAGGAAGCTTGTATCGAATCCTTCATCGGCC
CAAATCTCACATTGACGAGCGGCGCCGATTAAAATGGCCCTTGACGTGGCAATGGGGATGAACTGCT
TACACACCAGTACACCGACAATTGTTTCATCGTGATCTCAAAACACCAAACCTTTTGGTTGATAACA
GGAATGTTAAGGTCGGTGATTTTGGGTTGTCTCGCTTAAAGCACAATACTTTTTATCCTCCAAATCAAC
TGCTGGAACGCCTGAATGGATGGCTCCAGAAGTTCTACGCAATGAGCCCTCAAATGAAAAGTGTGATG
TGTACAGTTTCGGGGTAATACTTTGGGAACTAGCAACATTGAGATTACCATGGAGAGGAATGAACCCA
ATGCAAGTAGTTGGAGCAGTTGGGTTCCAGAATCGGCGGCTTGAAGATCCCCAAGGAACCTGATCCTGTG
GTGGGAAGGATCATCCTGGAATGTTGGCAAACGGATCCGAATCTGCGGCCGTCATTTGCTCAGCTGACG
GAAGTGCTGAAGCCTTTGAACCGGCTTGTACTTCTACACCACAATAG

Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

HSP90

Oryza sativa

>gi|39104467|dbj|AB111810.1| *Oryza sativa* Japonica Group Hsp90 mRNA for heat shock protein 90, complete cds
 TCCATCTCGCGTCTCTCGGAAACCCCTCCAAACCCTAGCCGCCTCTCGTTTCTTCTCCTCCTCCTCCACGC
 CCCCAGATCTCAGGAGCACAGGAGGAGGAAGCCATGGCGTCGGAGACCGAGACGTTCCGCTTCCAGG
 CCGAGATCAACCAGCTGCTGTCCCTCATCATCAACACCTTCTACTCCAACAAGGAGATCTTCCCTCCGCG
 AGCTCATCTCCAACCTCCTCCGATGCATTGGATAAGATTAGGTTTCGAGAGCCTCACGGACAAGAGCAAGC
 TCGATGCGCAGCCGGAGCTGTTTCATCCACATTGTCCCCGACAAGGCTAGCAACACCCTGTCGATCATCG
 ACAGTGGTGTCCGCATGACCAAGTCGGACCTCGTCAACAACCTCGGTACCATCGCCAGGTCGGGGACC
 AAGGAGTTCATGGAGGCGCTCGCTGCTGGTGTGATGTGTCCATGATTGGGCAGTTTGGTGTCCGGTTC
 TACTCCGCCTACCTCGTTGCTGAGAGGGTTGTTGTGACCACCAAGCACAAACGACGACGAGCAGTATGTG
 TGGGAGTCACAGGCCGGTGGGTCCTTACTGTTACACGTGATACCTCTGGTGAGCAGCTTGGACGGGGT
 ACTAAGATCACCTCTACCTCAAGGATGATCAGCTGGAATACCTTGAGGAACGTCGCCTCAAGGATCTG
 GTGAAGAAGCATTCTGAGTTCATCAGCTACCCTATCTCCTTATGGACTGAGAAGACAACCGAGAAGGA
 GATTCTGATGATGAAGACGAGGAAGAGAAGAAGGATGCTGAGGAGGGAAAGGTTGAGGATCTTGAT
 GAGGAGAAGGAAGAGAAAGAGAAGAAAAAGAAGAAGATCAAGGAAGTCTCTCATGAGTGGAACGTG
 ATGAACAAGCAGAAACCTATTTGGTTGAGGAAGCCAGAGGAGATCACCAAGGAAGAGTATGCTGCATT
 CTACAAGAGCTTGACAAACGACTGGGAGGAACATCTGGCTGTCAAGCACTTCTCTGTGGAGGGTCCAGC
 TTGAATTCAGGCCATCCTGTTTGTACCAAAGAGAGCGCCATTTGACCTCTTTGACACCAGGAAGAAGC
 AAAACAACATCAAGCTGTACGTACGCCGGTGTATTATCATGGACAACCTGTGAGGAGTTGATCCCAGAG
 TGGCTCAGCTTTGTCAAGGGCATTGTTGATTCTGAAGACCTTCCCCTCAACATCTCACGTGAGATGTCC
 AGCAGAACAAGATCCTGAAGGTGATCCGCAAGAACCTTGTGAAGAAGTGCCTGGAGCTTCTTTGAG
 ATCGCTGAGAACAAGGAAGACTACAACAAGTTCTACGAGGCCCTTCTCCAAGAATCTCAAGCTTGGCAT
 CCATGAGGACTCCACCAACAGGACCAAGATTGCTGAGCTCCTGAGGTATCACTCCACCAAGAGTGGTG
 ATGAGTTGACCAGCCTCAAGGACTACGTAACCCGGATGAAGGAGGGCCAGAGTGAGATCTATTACATC
 ACTGGTGAGAGCAAGAAGGCTGTTGAGAACTCCCCCTTCCCTTGAGAAGCTGAAGAAGAAGGGTTATGA
 AGTCTGTACATGGTTGATGCCATTGATGAGTACGCTGTTGGTCAGCTTAAGGAGTTTGAAGGCAAGAA
 GCTCGTCTCTGCCACCAAGGAAGGTCTGAAGCTTGATGAGAGTGAGGACGAGAAGAAGCGGCAGGAG
 GAACTCAAGGAGAAGTTCGAGGGTCTGTGCAAGGTGATCAAGGAGGTGCTCGGTGACAAGGTGGAGA
 AGGTTGTTGTCTCTGACCGTGTGGTGGACTCTCCCTGCTGTCTAGTCACTGGGGAGTATGGCTGGACTGC
 TAACATGGAGAGGATCATGAAGGCCAGGCTCTGAGGGACTCCAGCATGGCCGGCTACATGTGCGAGCA
 AGAAGACCATGGAGATCAACCCGGAGAATCCATCATGGACGAGCTCCGCAAGCGTGCCGATGCTGAC
 AAGAACGACAAGTCTGTGAAGGACCTGGTGTGCTCTTCGAGACTGCCCTCCTGACCTCCGGCTTC
 AGCCTTGAGGACCCCAACACCTTCGGCACCAGGATCCACCGGATGCTCAAGCTCGGCCTGAGCATCGA
 CGAGGACGAGTCTGCTGAGGCTGACGCCGACATGCCGCCGCTGGAGGACGACGCCGGCGAGAGCAAG
 ATGGAGGAGGTCGACTAAGCGCCATGGTTGTCATTCGGCCCCATCTCCTGGAGCCCTAGTTCTCTATA
 GCTTTATCTGACTCTGTGCTCTTCGCCATTTTGGCTATGCTGGATGTATCGGTATTGCCGTATCTTAGCGC
 CTGAACATTTCTGTTGTTGCTCAAACAGTTACGTTTTAAATTTAAATATGCTAGTTAATTAATCCAGA
 ATCTGTATTTT

A. thaliana: Acesso AT5G52640

ATGGCGGATGTTTCAGATGGCTGATGCAGAGACTTTTGGCTTTCCAAGCTGAGATTAACCAGCTTCTTAGC
 TTGATCATCAACACGTTCTACAGCAACAAAGAAATCTTCTCCGTGAGCTCATCAGTAACTCTTCTGAT
 GCTCTTGACAAGATCCGATTTGAGAGCTTAACGGATAAGAGCAAGCTCGATGGACAGCCTGAACTCTTC
 ATTAGATTGGTTCTGACAAGTCTAATAAGACGCTCTCAATTATTGACAGTGGTATTGGCATGACCAAA
 GCAGATTTGGTGAACAACCTTGGGAACCATTCGAGGTCTGGAACAAAAGAGTTTATGGAGGCGCTTCA
 AGCTGGAGCTGATGTAAGCATGATAGGACAATTTGGTGTGGTTTCTACTCTGCTTATCTTGTTCGAGAG
 AAGGTTGTTGTCACTACAAAGCACAATGATGATGAACAATACGTTTGGGAGTCTCAAGCTGGTGGTTCC
 TTCCTGTCACTAGGGATGTGGATGGGGAACCACTGGTAGAGGAACTAAGATCACCTCTTCTTAAAG

Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

GACGATCAGCTTGAATACTTGGAGGAGAGGAGACTCAAAGACTTGGTGAAGAAGCACTCTGAGTTCAT
 CAGTTACCCTATCTACCTTTGGACCGAGAAAACCACCGAGAAGGAGATCAGTGACGATGAGGATGAAG
 ATGAACCAAAGAAAAGAAAACGAAGGTGAGGTTGAAGAAGTTGATGAGGAGAAGGAGAAAAGATGGTAA
 AAAGAAGAAGAAAATCAAGGAAGTCTCTCACGAGTGGGAACATCAACAAGCAGAAACCGATCTGG
 TTGAGGAAGCCAGAAGAGATCACTAAGGAAGAGTATGCTGCTTTCTACAAGAGCTTGACCAATGACTG
 GGAAGATCACTTAGCCGTGAAACACTTCTCAGTGGAGGGTCAGCTAGAATTCAAGGCCATTCTCTTTGT
 ACCAAAGAGAGCTCCGTTTGATCTCTTTGACACGAGGAAGAAGTTGAACAACATCAAGCTTTATGTCAG
 GAGGGTGTTCATTATGGACAACACTGTGAAGAGCTAATCCCAGAGTACCTCAGCTTTGTGAAAGGTGTTGT
 TGACTCTGATGACTTGCCACTCAACATCTCTCGTGAGACGCTTCAACAGAACAAGATCCTTAAGGTGAT
 CAGGAAGAATCTAGTGAAGAAGTGCATTGAGATGTTCAACGAGATTGCTGAGAACAAGAGGACTACA
 CCAAATTTCTATGAGGCTTTCTCCAAGAATCTCAAATTTGGGTATCCATGAAGACAGTCAGAACAGGGGA
 AAGATTGCTGATCTTCTACGGTACCACTCCACAAAGAGTGGTATGAAATGACGAGCTTCAAAGATTAC
 GTCACAAGGATGAAGGAAGGTCAAAAGGACATTTTCTACATCACTGGTGAAGCAAAAAGGCGGTGGA
 GAATTTCCCTTCTTGAGAGGGCTGAAGAAGAGAGGATACGAGGTACTTTACATGGTGGATGCGATTG
 ACGAATACGCTGTTGGACAATTGAAGGAGTATGACGGTAAGAACTTGTCTGCGACTAAAGAAGGC
 CTCAAACCTTGAAGATGAGACCGAAGAAGAGAAGAAAAGAGGGAAGAGAAGAAGTCCCTTCGAGA
 ATCTGTGCAAGACGATTAAGGAAATTCGCGGACAAAGTTGAGAAGGTTGTGGTCTCAGACAGGATT
 GTGGACTCTCCCTGCTGTCTAGTAACTGGTGAATATGGATGGACTGCAAATATGGAGAGGATTATGAAG
 GCACAGGCGTTGAGAGATAGCAGCATGAGTGGTTACATGTCGAGCAAGAAAACAATGGAGATCAACCC
 CGACAACGGTATAATGGAGGAGCTCAGGAAGAGAGCTGAAGCAGACAAGAATGACAAGTCTGTAAA
 GATCTTGTGATGTTGCTGTATGAGACAGCTTTGTTGACGCTGATTGATGATGAGGATGAGAACGTTGAGGAA
 GATGGTATATGCCTGAGTTGGAGGAGGACGCTGCTGAAGAGAGCAAGATGGAGGAAGTCGACTAA

OsRAC1

Oryza sativa

>gi|5902925|dbj|AB029508.1| Oryza sativa mRNA for small GTP-binding protein OsRac1, complete cds
 GTGAGAGTGAACAAGAGATAAGCTAAGCTAGTACAGCAACCAGCAAGAACAAGAAGAGTGGCCGGA
 GTGGGCGGGGAGATGAGCTCGGCGGGCGGCGGACGAGGTTTCATCAAGTGCATCACCGTGGGGGAC
 GCGCGGTGGGGAAGACGTGCATGCTCATCTGCTACACCTGCAACAAGTTCCCCACCGATTACATCCCC
 ACCGTGTTGACAACCTCAGCGCCAATGTCTCCGTGGACGGGAGCGTCTCAACCTCGGCCTCTGGGAC
 ACTGCAGGTCAGGAGGATTACAGCAGGTTGAGGCCTCTGAGCTACAGGGGAGCCGATGTGTTTCATCCT
 GTCCTTCTCCCTGATAAGCAGGGCGAGCTATGAGAATGTTTCAGAAGAAGTGGATGCCAGAGCTTCGCC
 GGTTTGCCTGTTGTTCTGTAGTTCTTGTGTTGAACCAAGTTGGATCTCCGTGAAGATAGGGCCTATCT
 TGCTGATCATCCAGCTTCTTCCATAATAACAACGGAGCAGGGAGAAGAACTGAGGAAGCTAATAGGAG
 CGGTCGCCCTACATCGAATGCAGCTCCAAGACACAGAGAAACATTAAGCTGTTTTGACACTGCCATCA
 AAGTGGTGCTTCAACCTCCAAGACATAAGGATGTAACCAGAAAGAACTCCAATCAAGCTCCAATCGG
 CCAGTAAGGCGGTACTTTTGCAGGAGCGCTTGTTCGCGTAGTCAATAACCAAGAAGAAAAAATGTG
 GTTTTTGTTCCATCACCATGATGTTTCAGATGGCCCCATGGATCTACTCAGAATGGGATAGAAGATCATG
 GTTGAATCAACATTGCTTGCAGCTAGGAGGAACTTCTAGTTCTCTTTTTTCTGCAAGTGGAGCTCCTTT
 TGTTTCTCCTTCTCTTTTTTTCTTATGTCGTAAGCTCCAGAAAGTTTACCCTTGGTAATAAGATGT
 GCTCTTCTGGATGGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

A. thaliana: Acesso AT4G28950

ATGAGTGCTTCGAAGTTCATAAAATGTGTTACTGTTGGAGATGGGGCTGTTGGGAAGACATGTATGCTT
 ATCTGTTACTAGCAACAAGTTTCTACTGATTATATACCGACTGTGTTGACAATTTCAAGTCCAATG
 TAGCTGTGGATGGACAAATCGTTAATTTAGGGCTATGGGACACTGCCGGTCAAGAAGATTACAGTAGG
 TTAAGACCATTGAGTTATAGAGGAGCTGATATCTTCGCTTAGCCTTTTCGCTTATTAGCAAGGCGAGTT
 ACGAAAATGTAAGTCAAGAAGTGGATGCCTGAACTTCGTCGGTTTGCGCCAAATGTTCCCATAGTTCTTG
 TTGGTACAAAGCTAGATCTCCGGGATGACAAGGGATACCTCGCGGATCACACCAATGTCATTACCTCTA

Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

CTCAGGGAGAGGAATTGAGGAAGCAAATTGGTGCAGCTGCTTATATTGAGTGTAGTTCCAAGACTCAA
 CAAAATGTGAAAGCAGTGTGATACAGCGATCAAGGTGGTCTTCAGCCTCCAAGGAGGAAAGAGGT
 CCCGAGGAGGAGGAAGAATCATAGAAGATCCGGTTGCTCCATTGCGAGTATTGTCTGTGGAGGTTGCA
 CCGCTGCTTAA

SGT1

Oryza sativa

>gi|6581057|gb|AF192467.1| *Oryza sativa* Sgt1 (Sgt1) mRNA, complete CDs

CCCCACCCGCATCCCCGGCCTCCTACCCGACGCCGAAAAGCCAAGCCGCCATGGCAACCGCCGCC
 GCGTCGGATCTGGAGAGCAAGGCCAAGGCGGCCTTCGTCGACGACGACTTCGAGCTCGCCGCCGAGCT
 CTACACGCAGGCAATCGAGGCCAGCCCCGCCACCGCCGAGCTCTACGCCGACCGCGCCCAGGCCATA
 TCAAGCTAGGCAACTACACTGAGGCTGTAGCTGATGCTAACAAGGCCATTGAACTTGACCCATCAATGC
 ACAAGGCTTATCTTCGTAAAGGCGCTGCATGTATACGACTGGAGGAGTATCAAAGTCAAAAAGCAGCT
 CTTGAATTGGGTTACTCGTTCGCATCTGGTGACTCAAGGTTTACTCGCCTAATGAAGGAGTGTGATGAG
 CGCATTGCTGAGGAGCTTACTGAAGTCCCTGTTAAGAAGGCTGAAGATGGAGCAGCTGCCCCCTCTGTT
 GCTTCTTTTGTGAGGAAAAGGATGATGCTGCAAACATGGATAATACACCACCAATGGTAGAAGTGAA
 GCCAAAATACAGGCACGACTTCTACAACAGTGCTACAGAAGTTGTATTGACAATTTTTGCAAAGGGTGT
 TCCTGCTGAGAATGTTGTTGTTGATTTTTGGTGAACAAATGTTAAGTGTGTCGATTGAAGTCCCTGGAGA
 GGAGCCGTACCATTTTCAGCCTCGTCTGTTTTCTAAGATCATCCCTGAGAAAAGCAGATACCAAGTGCT
 ATCCACGAAGGTTGAAATAAGACTGGCTAAAGCTGAACAGATTACATGGACCTCACTTGATTATGATA
 AAAAACCAAAGGCTGTTCCACAAAAGATAATCCCTCCAGCTGAATCGGCCAGAGGCCATCATATCCTT
 CCTCAAAATCCAAGAAAGACTGGGATAAACTGGAAGCTGAAGTTAAAAGGAGGAGAAGGAGGAGAA
 GCTTGAAGGCGATGCTGCATTGAACAAATTTTTCCGTGACATCTACAGTGATGCTGATGAAGACATGCG
 ACGAGCAATGATGAAATCTTTTGTGAACTAACGGTACTGTTCTGTGCGACCAATTGGAAAGATGTTGG
 CTCGAAGAAGGTAGAGGGAAGCCCACCTGATGGGATGGAGCTTAAGAAATGGGAGTACTAAGATCTCG
 GNTCGTGCCATGCTGTAAATTCGNTATCGGCCTGAGTCATCACTTGGCTGGAGAATTC

A. thaliana: Acesso AT4G11260

ATGGCCAAGGAATTAGCAGAGAAAGCTAAAGAAGCTTTTCTAGATGATGACTTCGATGTTGCTGTTGAC
 TTATACTCCAAAGCCATTGACTTGGATCCCAATTGCGCCGCCTTCTTCGCCGATCGTGCTCAGGCCAACA
 TCAAAAATCGATAAATTCCTGAAAGCTGTTGTAGATGCGAACAAGCCATTGAGTTGGAGCCAACGTTGG
 CAAAAGCCTATCTCAGAAAGGGCACTGCTTGTATGAAGCTAGAAGAATATAGTACTGCTAAAGCAGCC
 CTGGAAAAGGGAGCTTCTGTTGCACCGAATGAACCAAAGTTTAAAGAAGATGATAGATGAATGCGATCT
 TCGTATTGCAGAAGAAGAGAAAGATTTGGTTCAGCCGATGCCACCGAGTTTGCCTTCAAGCTCTACAAC
 ACCACTAGCAACGGAAGCTGATGCTCCTCCTGTTCCAATTCTGCAGCACCTGCCAAACCGATGTTGAG
 GCACGAGTTCTACCAGAAACCAGAAGAAGCGGTGGTGAACAATTTTCGCCAAAAAAGTACCTAAGGAGA
 ACGTAACTGTCGAGTTTGGTGAGCAGATTCTGAGTGTGTCATTGATGTTGCTGGAGAGGAAGCTTATC
 ATCTCCAGCCGAGATTGTTTCGGGAAGATAATACCAGAGAAGTGCAGATTTGAAGTATTGTCGACCAAA
 GTTGAGATCCGCTTTCGCAAAGCAGAGATAATCACCTGGGCCTCCCTTGAATATGGTAAAGGGCAAAG
 TGTTTTGCCCAAACCAATGTCTCATCAGCGCTGTCGAGAGACCAGTGTACCCATCTTCTAAGCCAGC
 AAAAGACTGGGACAAGTTGGAAGCTGAAGTGAAGAAACAGGAGAAGGATGAGAAGCTTGTGAGGAT
 GCAGCTATGAACAAATTTTTTCAGCGACATATACTCGAGTGCAGATGAAGACATGAGGCGGGCAATGAA
 CAAATCATTTGCAGAGTCGAATGGGACGGTACTGTGACAAACTGGAAAGAAGTTGGGACTAAGAAAG
 TGGAGAGCACTCCACCAGATGGCATGGAGCTCAAGAAGTGGGAGTATTGA

Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

SPL11

Oryza sativa

>(gi51038702:<1-336, 2823-2939, 3034-3468, 3564->4760) *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) cell death-related protein SPL11 (Spl11) gene, complete cds mRNA

ATGGCCGGCGACCGAGCGGAGGAGGAGGGGGAGGCGCCGCTCCGGAGGCGCGTGCCGCGGCGG
CGGTGGAGAGGGTGGCGGCGCGGTGGAGGCCGTGGCGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGAGTGA
CCGGAACGCGTACAGGCGGCAGCTGCTCGCGCTGTGCGGCGGATTTCGGCTGCTGGGGCCCTTCGTGG
AGGAGCTCCGGGAGCGGAGGCGGGGGAGGGGGAGGGGGAGGAGGAGGAGCGGGCGCTGGCGCCGC
TCGCCGACGCGCTCGAGGCGGCGCTCGCGCTGCTCCGGCTCGGCCGCGAGGGGAGCAGGATCTCCTTG
GTTCTTGAGAGGGACAGCGTAATGAAAAAGTTTCAGGGAGTAATTTTGCAGCTGGAACAAGCTCTGTG
CGACATTCCTGACAATGAATTGGATATATCAGATGAAGTTAGAGAGCAGGTTGAGTTAGTGCACGCAC
AGCTCAAAGAGCAAAAGAACGGATTGATATGCCTGACGATGAATTCTACAATGATCTACTATCTGTAT
ATGACAAGAAGTATGACCCAAGTGCAGAACTGGCTATTCTTGAAGATTGTCAGAAAAGCTACACTTG
ATGACAATCACCGATCTCACGCAAGAATCACTCGCCTTACATGAGATGGTCGCATCCGGCGGTGGTTCAG
GACCCAGGAGAACACATTGAGAGAATGTCAATGCTACTGAAGAAGATTAAGGATTTTGTGCAAAACACA
GAACCTGACATGGGGCCTCCTATGGCTTCCAGGGTATTGGATTCAAATGGGGATTCAAGGCCTATAAC
CATTCTGACGAGTTCGATGTCCAATTTCTTTGAGCTGATGAAGGATCCTGTTATAGTGTCTACAGGG
CAGACATATGAGCGGGCATGCATTGAGAAATGGATAGCATCAGGCCATCATACCTGCCCAACCACGCA
ACAGAAGATGTCAACCTCAGCATTGACGCCAACTATGTCTTAGAAGTCTCATTTCAGTGGTGTGA
AACCAATGGGATGGAGCCACCAAAGCGCTCAACCCAGCCTAACAAAGCCTACGCCTGCATGCTCTTCGA
GTGAACGTGCTAACATCGATGCTCTGCTATCTAAGTTATGCTCTCCAGACACTGAGGAGCAGAGATCAG
CTGCTGCAGAGCTTCGCCTCCTTGCAAAGCGGAATGCAAACAACCGGATTTGCATTGCTGAGGCAGGTG
CCATTCCCTTGTATTGAGTCTGCTGTCTCATCTGACCTACGACTCAAGAACATGCAGTTACTGCCCT
TCTGAACCTCTCCATACATGAGGACAATAAGGCAAGCATCATATCATCTGGTGTGTCCTCAAGCATAAGT
CCATGTTCTGAAGAATGGCAGCATGGAGGCACGGGAGAATGCTGCGGCCACACTTTTTAGTCTCTCAGT
GATTGATGAATATAAAGTGACAATTGGAGGGATGGGGGCTATCCCTGCGCTTGTAGTGTGTTAGGCGA
GGGTAGCCAGCGGGGAAGAAGGATGCAGCAGCAGCTCTTCAACTTGTGTATATACCAAGGGGAACA
AGGGACGAGCGATTTCGAGCTGGCCTTGTGCCACTCATCATGGGGCTGGTGACCAACCCACAGGAGCG
CTCATGGATGAGGCTATGGCAATACTCTCCATACTATCCAGCCACCTGAGGGCAAGGCAGCGATTGGG
GCGGCAGAGCCTGTCCCTGTGCTTGTGGAGATGATCGGAAGCGGAACCCCGAGAAATCGAGAGAATGC
TGCGGCTGTATGCTACATCTGTGCAAGTGGAGAGCACCATCTTGTGCATTTAGCTCGTGCAGGAGTG
CGGATCATGGTCCCGTTGCGGGAGCTGGCTTTGAACGGCACCGATAGGGGAAGAGGAAGGCTGTGC
AGCTGCTCGAGCGGATGAGCAGATTCTAGTCCAGCAACAAGAGGAACAGGAGTCCCAGTGCAGGCC
TCCGCGCAGGTCCTCCTCAGGCCACCCCTGAGCAGGTCCCGGAAAATGACATCCCTGAACAATTGGAC
AGCCAGCGTCTCAATACCCTATGGTTGTATGA

A. thaliana: Acesso AT3G46510

ATGGAGGAAGAGAAAAGCTTCTGCTGCACAGAGCTTAATCGATGTAGTTAACGAGATTGCTGCGATTTCT
GATTATCGTATAACAGTGAAGAAGCTTTGTTATAATCTAGCGAGGAGATTAAGCTGCTTGTTCCTATG
TTTGAGGAAATTAGAGAAAGTAACGAACCGATCAGCGAAGATACGTTGAAGACTTTGATGAATTTGAA
GGAAGCTATGTGTTTCAGCGAAGGATTATCTCAAATTTGTAGCCAAGGGAGCAAGATTTATCTGGTGTAT
GGAGAGGGAAACAAGTGACAAGTAAATTGATGGAGGTGTCTGTTAAGTTAGAACAATCTTTAAGCCAGA
TTCCATATGAAGAACTCGATATATCGGATGAAGTTAGAGAACAGGTTGAGCTGGTTCTTAGTCAAGTTT
GGCGAGCTAAAGGAAGAGTAGATGTATCAGATGATGAGCTATATGAAGATCTTCAGTCGCTTTGCAAC
AAAAGTAGTGATGTAGATGCTTATCAGCCTGTGCTAGAGCGGGTTGCGAAGAAGTTACATTTGATGGA
GATTCTGACCTAGCTCAAGAATCAGTGGCTCTGCATGAAATGGTTGCTTCAAGCGGTGGAGATGTTGG
TGAAAATATTGAGGAGATGGCAATGGTATTAAGATGATTAAGGATTTTGTGCAGACGGAGGATGATA
ATGGCGAGGAGCAGAAAGTAGGAGTTAACTCTAGAAGCAATGGACAGACTTCTACGGCAGCGAGTTCAG
AAGATACCTGTGATTCCTGATGATTTTCGCTGTCCGATTTCCGCTGGAAATGATGAGAGATCCAGTTATTG

Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

TTTCATCAGGGCAGACATACGAACGCACATGTATTGAGAAATGGATAGAAGGTGGACACTCGACATGT
 CCAAAAACACAGCAGGCGCTAACAAAGCACAACCCTCACACAACTATGTTCTCCGTAGTCTCATAGCT
 CAGTGGTGCGAGGCCAACGATATTGAGCCTCCAAAGCCTCCGAGCAGTTTAAGACCCAGAAAAGTATC
 GTCCTTCTCATCTCCCGCAGAAGCGAACAAGATTGAAGATCTTATGTGGAGACTTGCCTACGGAAACCC
 CGAGGACCAACGATCTGCAGCTGGGGAAATCCGCCTTCTTGCAAACGAAATGCAGACAACCGCGTGG
 CCATAGCCGAAGCTGGAGCCATACCTCTTCTCGTAGGTCTCCTCTCAACTCCTGATTCTCGTATTCAAGA
 ACATTCGGTAACAGCTCTTCTAAACCTCTCCATATGTGAGAACAACAAGGAGCCATTGTTTCAGCTGG
 AGCTATTCTGGTATAGTTCAAGTGCTTAAGAAAGGAAGCATGGAGGCCAGAGAGAATGCGGCGGCTA
 CACTTTTCAGTCTATCAGTGATCGATGAAAATAAAGTGACTATCGGTGCCTTAGGAGCAATTCGCCAC
 TCGTTGTATTACTTAATGAAGGTACACAAAGAGGCAAGAAAGATGCTGCTACTGCACTCTTAAACCTCT
 GTATATACCAAGGAAACAAGGAAAAGCTATACGTGCAGGAGTGATTCCCACGTTGACTAGACTCTTG
 ACAGAGCCCAGGAAAGCGAATGGTCGATGAGGCACTCGCGATTTTGGCGATTCTCTAGCCACCCCGA
 AGGAAAAGCAATCATAGGATCCTCTGATGCAGTCCCAAGTTTGGTTGAGTTTATCAGAACTGGCTCGCC
 TAGAAACAGAGAAAACGCAGCTGCTGTTCTAGTCCACCTCTGTTCTGGAGACCCACAACATCTTGTGCA
 AGCGCAGAACTCGGCCCTTATGGGTCCATTGATAGATTTAGCTGGAAATGGGACGGATAGAGGGAAAC
 GAAAAGCAGCGCAGTTGCTTGAACGCATCAGCCGTCTCGCTGAACAGCAGAAGGAAACGGCTGTGTCA
 CAACCGGAAGAAGAAGCTGAACCAACACATCCAGAATCCACCACAGAAGCTGCAGATACTTAA

STP1

Oryza sativa

>gi|11991113|dbj|AB052885.1| Oryza sativa OsMST3 mRNA for monosaccharide transporter 3, complete cds
 ATGGCCGGCGCGCGGTGGTGAGCACGGGGGACAGGCAAGGACTACCCTGGCAAGCTCACCTCTTCGT
 CTTCTTACATGCGTCGTCGCCGCCACCGTGGTCTCATCTTCGGATATGACATCGGTATATCAGGTGGT
 GTGACGTCCATGGACCCGTTCTGAGGAAGTTCTTCCCGGAGGTGTATCGGAAGAAGCAGATGGCGGA
 CAAGAACAACCAGTACTGCAAGTACGACAACCAGCTGCTGCAGACCTTCACCTCGTCGCTCTACCTCGC
 CGCCCTCGTCTCCTCTTCTTCGCCGCCACCGTACCCGCGTCTCGGCCGCAAGTGGTCCATGTTTCGCC
 GGCGGCCTCACCTTCTCATCGGCGCCGCCCTCAACGGCGCCGCCGAGAACGTCGCCATGCTCATCGTC
 GGTGATCTCTCCTCGGTGTCGGCGTCGGCTTCGCCAATCAGTCCGTGCCGGTGTACTTGTGCGGAGATG
 GCGCCGGCTCGGCTGCGGGGATGCTGAACATCGGGTTCAGCTGATGATCACCATCGGCATCTGGCG
 GCGGAGCTGATAAACTACGGGACGGCGAAGATCAAGGCCGGGTGGGGATGGCGGGTGGCCTGGCGC
 TGGCCGCCGTCCTCCGCCCATCATACCCTCGGCTCCCTCTTCTCCCGACACCCCAACTCGCTCAT
 CGACAGGGGCCACCCGAGGCGGCGGAGCGCATGCTCCGGCGCATCCGCGGCTCCGACGTGGACGTGT
 CGGAGGAGTACGCGGACCTGGTGGCGGCGAGCGAGGAGTCGAAGCTGGTGCAGCACCCGTGGCGCAA
 CATCTCCGCCGCAAGTACCGCGCCAGCTACCATGGCCATCTGCATCCCTTCTTCCAGCAGCTACCC
 GGGATCAACGTCATCATGTTCTACGCCCCGTGCTGTTTCGACACCCTGGGCTTCAAGAGCGACGCGTCG
 CTCATGTCCGCGTATCACGGCCCTCGTCAACGCTCTTCGCCACGCTGGTGTCCATCTTACCCGTGGACC
 GCCTCGGCCGCCAAGCTGTTCTGACGGGCGGGGCGCAGATGGTGGTGTGCCAGGTGGTGGTGGGG
 ACGCTGATCGCCGTCAGTTCCGGGACGAGCGGCATCGGCGACATCCCAAGGGGTACGCGGCGGTGGT
 GGTGCTCTTTCATCTGCATGTACGTGGCAGGGTTCGCGTGGTCTGGGGCCACTGGGGTGGCTCGTCCC
 CAGCGAGATCTTCCCGCTGGAGATCCGGCCGGCGGGCAGAGCATCAACGTGTCGGTGAACATGCTCT
 TCACCTTCGTCATCGCGCAGGCCTTCTCACCATGCTCTGCCACATGAAGTTCCGGCTCTTCTACTTCTT
 CGCCGGATGGGTGCTCATCATGACCGTCTTTCATCGCCCTTCTCTCCCGAGACCAAGAAGCTCCCAT
 CGAGGAGATGGTGTCTGTTGAAGTCCCACTGGTCTTGGCGCCGATTTCATCGGAGACCACGACGTCCA
 CGTCGGCGCAACCACGTCTCCAACAATAAGCTCCAACCATAA

A. thaliana: Acesso AT1G11260

ATGCCTGCCGGTGGATTTCGTGCTCGGGGATGGCCAAAAGGCTTATCCCGGCAAACTCACTCCCTTGT
 CTCTTCACTTGCCTTGTGCTGCCATGGGCGTCTCATCTTCGGATACGATATCGGAATCTCCGGTGGT
 TGACGTCTATGCCGCTTCTCTCAAGCGATTCTTCCCGTCGGTGTATCGGAAACAACAAGAGGACGCGT

Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

CAACGAACCAGTACTGTACAGTACGATAGCCCCGACGCTAACGATGTTACATCGTCTCTATATCTAGCGG
CGCTAATTTTCGTCGCTGGTGGCTTCCACCGTGACAAGAAAGTTCGGACGGCGGCTCTCGATGCTCTTCG
GCGGCATACTCTTCTCGCCGGAGCTCTCATCAATGGTTTCGCCAAACATGTTTGGATGCTCATCGTCGG
TCGTATCTTGCTTGGTTTCGGTATCGGTTTCGCTAATCAGGCTGTGCCACTGTACCTCTCTGAGATGGCT
CCATACAAATACAGAGGAGCTTTAAACATTGGTTTCCAGCTCTCAATTACAATCGGAATCCTCGTCGCC
GAAGTGCTAAACTACTTCTTCGCCAAGATCAAAGGCGGTTGGGGATGGCGGCTCAGTCTCGGAGGCGC
GGTGGTTTCTGCCTTGATCATAACCATCGGCTCCCTCGTCTCCCTGACACTCCCAATTCAATGATCGAG
CGTGGCCAACACGAAGAAGCCAAAACCAAGCTCAGACGAATCCGTGGTGTGATGACGTAGCCAAGA
GTTTACGATTTGGTTCGCCGCTAGTAAAGAGTGCAGTCGATAGAGCACCCGTGGAGAAACCTCCTCCG
CCGCAAGTACCGACCACATCTACAATGGCCGTTATGATTCCGTTCTTTCAACAGCTAACCAGGAATCAA
TGTGATTATGTTTTACGCTCCGTTTTGTTCAACACCATTGGTTTACGACCGATGCTTCTCTCATGTCCG
CTGTGGTCACTGGCTCGGTTAACGTGGCCGCTACGCTTGTCTTCTATCTACGGTGTGACAGATGGGGAC
GTCGGTTTTCTTTCTTGAAGGTGGTACACAAATGCTTATATGCCAGGCTGTGGTTGACAGTTGCATAGG
GGCCAAGTTTGGGGTAGACGGGACCCCTGGTGGAGCTACCAAAGTGGTATGCTATAGTGGTTGTAACGTT
CATTTGCATCTATGTGGCGGGTTTTGCGTGGTTCGTTGGGGCCACTAGGGTGGTTAGTACCGAGTGAAAT
CTTCCCCTGGAGATAAGGTCCGGCGGCGCAGAGTATACCCTGTCCGTGAACATGATCTTCACGTTTCAT
TATCGCGCAAATCTTCTTGACGATGCTTTGTCATTTGAAGTTTGGGTTATTCCTTGTTTTTCGCTTTTTCG
TGGTGGTGTATGTCGATCTTTGTATACATTTCTTCCGGAGACGAAAGGGATTCCGATAGAGGAGATGG
GTCAAGTGTGGAGGTCACACTGGTATTGGTCAAGGTTTGTGGAGGATGGTGTGATGGAATGCGCTTG
AGATGGGCAAGAACAGTAACCAAGCTGGAACGAAGCATGTTTGA

WRKY 53

Oryza sativa

>Os05g0343400 class=Sequence position=[chr05:16150266..16152633 \(+ strand\)](#)

ACTCCCGTCTCGTCTCGTCTCGTCTCCGATCACTCTCCTCATCTTCGTCACGGTCTCCTCGCTT
CGCTAGCTCGCTTGCCTGCTGGCTGAGCTGTGGTACGCTCGCCATGGCGTCTCGACGGGGGGGTTGGA
CCACGGGTTACGTTACGCGCCGCCGTTTACATACGTCGTTACCGAGCTGCTGTCGGGGGGCGGTGG
GGACCTGCTCGGCGCCGGCGGTGAGGAGCGCTCGCCGAGGGGGTTTCCAGAGGCGGAGCGAGGGTGG
GCGGCGGGGTGCCAAGTTCAAGTCCGCGCAGCCGCCGAGCCTGCCGCTCTCGCCGCCCGCGTGTGCG
CGTCTCCTACTTTCGCCATCCCCGCCGGGGCTCAGCCCCACCGAGCTGCTCGACTCCCCCGTCTCCTCAG
CTCCTCCCATGTGCGTTCGCGTGACACACCTTCATCTTCTTCTTCTACCTTTAGTGCGAATTGCTGTGT
AGTGTGGTGTGATGATCCATGGCGTTTGTGCGTGTGGTGTGCTTTTCAGATCTTGGCGTCCCCGACC
ACCGTGGAGCTCCCGGCTCAGAGGTACGACTGGAAGGCCAGCGCCGATCTCATCGCTTCTCAGCAAGA
TGACAGCCGCGGCGACTTCTCCTTCCACACCAACTCCGACGCCATGGCCGCGCAACCGGCTCTTTCCC
TTCTTCAAGGTACGTACAAATGCTTACGCTCATCTAGCTCAACCCAAGCTGAATAAACTGTTGACAGT
CTAGCTCACCTTGGTTCATGTACGCTTGTGCTGGAGCAGGAGCAAGAGCAGCAAGTG GTCGAGTCGA
GCAAGAACGG CGCCGCCGCC GCGTCGAGCA ACAAGAGCGG
CGGCGGCGGGAACAACAAGCTGGAGGACGGGTACAACCTGGAGGAAGTACG GGCAGAAGCA
GGTGAAGGGGAGCGAGAACCAGGAGCTACTACAAGTGCACCTACAACGGCTGCTCCATGAAGAA
AAGGTGGAGCGCTCGCTCGCCGACGGCCGCATCACCCAGATCGTCTACAAGGGCGCACACAACCC
CAAGCCGCTCTCCACCCGCCGCAACGCCTCCTCCTGCGCCACCGCCGCCGCTGCGCCGACGACCTCGC
GGCGCCCGGCGGGCGCGGACCAGTACTCCGCCGCGACGCCGAG AACTCCTCCG
TCACGTTCCGCGACGACGAG GCCGACAACG CATCGCACCG CAGCGAGGGC GACGAGCCCG
AAGCCAAGCG CTGGTAAGCC TCACATCATCACTCAAATCA GCAATCGAAG CGTAATATCT
CCATGCGTGT GCGTGTGTTC TTCTTGGGTC TCATGGATGT
CATGGTTTTCAGGAAGGAGGATGCTGACAA CGAGGGCAGC TCCGGCGGCA TGGGCGGCGG
CGCCGCGGCAAGCCGGTGC GCGAGCCGAGGCTTGTGGTG CAGACGCTGA GCGACATCGA
CATCCTCGAC GACGGCTTCC GGTGGAGGAA GTACGGCCAG AAGGTCGTCAAAGGCAACCC
CAACCCAAGG TAATCAATCA ATCAAGCTGA TCAAAATCCG TCGATTAGTC GATTAATCAT
ATCTGTCTTTCGCTCTCTAA TAATCAAATC TGTTCTTGAA TCGCAGGAGC TACTACAAGT
GCACGACGGTGGGCTGCCCC GTGCGGAAGCACGTGGAGCG GCGTTCGCAC GACACGCGCG
CCGTGATCAC CACCTACGAG GGCAAGCACA ACCACGACGT CCCGGTCCGGCCGGCGGGCG
GCGGCGGACGCGCCCCGGCGCCGGCGCCG CGACGTCGGG GCGGATCCGG CCGTCCGCGG
TCGCGCCGCCCAGAGGGG CCCTACACCC TCGAGATGCT CCCAACCCC GCCGGCTCT
ACGGCGGCTACGGCGCCGGC GCCGGCGGCGCCGCTTCCC GCGCACCAAG GACGAGCGGC
GGGACGACCT GTTCGTCGAG TCGCTCCTCT GCTAGTCGAG CCGAGCCGAGCCGAGCTGAG
CTGGGCCCA CATCCCCCTG CTCGCCACGT GCGTATTTT CGCCTCGCCG TATACGTACG
CCGTATAGCGTACGTATAC ACGCTCGCAC GCCCTGCCA ACACGGCAAT ACACACATA

Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

ATACTCTCGT ACACACGTAG TAGCATACATATACAGTATA GTAGGTGGTA GTGGTAGCTA
GCTAGGGAGT GAGATCCAAT TTGTTGATTG GTTGCAGGCC ACTGCCACGTGGGCCACACC
GGAAACAGTACACGCGTATA CACCACACTT GGGATACGCG TACGTACGCA CATGTACACG
TAGTTTTGTGCTTTGTAAC TGCTGAGAGA CAGGTCAAAT AAGACTGATG AATTTTTTC

A. thaliana: Sequência equivalente: >gi|21105638|gb|AF509499.1| Arabidopsis thaliana WRKY transcription factor 33 (WRKY33) mRNA, complete cds

ATGGACAATAGCAGAACCAGACAAAACATGAATGGTTCTGCTAATTGGTCACAACAATCCGGAAGAAC
ATCTACTTCTCTTTGGAAGATCTTGAGATACCAAAGTTCAGATCTTTTGTCTCTTCTCAATCTCTATCT
CTCTTCTCTTGTCTCTCCTTCCACTTGTTTCAGTCCCTCTCTTTTCTCGATTCCCCTGCTTTTGTCTCCTC
CTCTGCTAACGTTCTAGCTTCTCCAACCACAGGAGCTTAAATCACAACGTAACCTAACCAGAAAGGTAT
AAATGAAGGAGACAAGAGCAACAACAACAACCTTAACTTATTCTGATTTCTCATTCCACACACAATCATC
AGGAGTTTCTGCTCCGACCACAACCTACAACCTACAACCTACAACAACAACAACAGTTCTATCTT
TCAATCTCAGGAACAACAGAAGAAGAACAGTCAAGAACATGGAGCCAAACCGAGACTCGTCCAAAC
AATCAAGCTGTATCTTACAATGGAAGAGAGCAAAGGAAAGGAGAGGATGGTTACAATTGGAGAAAAGT
ACGGACAAAAACAGGTGAAAGGAAGTGAGAATCCTCGGAGTTACTATAAGTGTACTTTCCCTAATTGT
CCAACGAAGAAGAAAGTGGAGAGATCTTTGGAAGGTCAGATCACAGAGATTGTGTATAAAGGAAGCC
ACAACCATCCTAAACCTCAGTCTACTAGAAGATCTTCTTCGTTCTTTCGACTTTTTCATTTCAGCTGTGA
CAATGCCAGTTTGGATCATAATCGTCAAGCTTCTTCTGATCAGCCTAATTCCAATAATAGCTTTTCATCAG
TCTGATTCCTTTGGGATGCAACAAGAGGATAATACTACTTCTGATTCTGTTGGTGACGATGAGTTCGAA
CAAGGCTCATCGATTGTCAGCAGAGACGAAGAAGATTGTGGGAGTGAACCTGAAGCAAAGAGATGGA
AAGGGGACAATGAAACAAATGGTGGGAATGGTGGTGGAAGCAAGACAGTGAGAGAGCCGAGAATCGT
AGTGCAGACAACGAGTGAT
ATTGACATTCTTGACGACGGTTACAGATGGAGAAAATACGGCCAGAAAAGTCGTTAAGGGAAACCCAAA
TCCAAGAAGCTACTACAAGTGCACAACCATCGGTTGTCCAGTGAGGAAACATGTGGAGAGAGCATCAC
ACGACATGAGAGCAGTAATCAACCTACGAAGGGAAAACAACAACACGATGTTCTGCAGCTCGTGGT
AGCGGTTACGCCACAACAGAGCACCACAGGATTCGTCTTCAGTCCCGATTAGACCAGCTGCTATTGCT
GGTCACTCCAACCTACTACTTCTTCTCAAGCACCATATACACTTCAGATGCTGCACAACAACAACACT
AATACCGGGCCCTTTTGGTTACGCCATGAACAACAATAACAACAACAGCAACCTTCAAACGCAACAAAA
CTTTGTTGGTGGTGGATTCTCTAGAGCAAAGGAAGAACCAAACGAGGAGACCTCATTTTTCGATTTCGT
TATGCCCTGA

WRKY 89

Oryza sativa

>gi|55139439|gb|AY781112.1| Oryza sativa (indica cultivar-group) WRKY DNA-binding protein (WRKY89) mRNA, complete cds

TAGTGACTGTCAAGTAGTGATCAACATGATAGAGACCAAAAAGGCTCTCATGGTGGAGCTGCGTGGCATGGCCATGC
CATTACTTCCGAGCGACAATGAACAAGCCAAGCTTGTCTTCAACTCTTGGGAGATATATTGAGTTGCTCAGATAAGG
CTATCTCCATGCTAGAACTTGGTGGAGACATAAAAAGCTGACCAATCTTGTGGAGGTAAGAGAAAAGGTGACAAG
CATAGCATGGACAACCACAACCTGGAGGAGGAAGCTAAAGAAAGTGTAGCAAGAGAAGAAAAGAAATGCAGAACAC
ACAGGTTCAACTGTGGCTAAGCACCTCACAATGATGGACATCAATGGAGGAAGTATGGTCAGAAATGGATCTCTAG
AGCAAAAACATCCAGGAGTACTATAGGTGTGCCAATAGTAAAGTGAAGGCTGCTCTGCTACAAAAGACAGTGAAC
AAATGGATTCCAGTGGAAATGGAACATCAAAGTTGTTCAACGTTGACTACTATGACCAACACACATGCAGGGGAGAT
GGCATAGCCGATCCATATGTTGTCGACACAGCCATCACAGTATGGAACCTATCAATCAAAAACGAATGCAATAGCCC
TACACTTGAACACGAAGCCATGAAGTTCAAGATGAAAGATTTGAAAACCTTGTGTATGGTACAAAATATGCCAGAGT
ATTTGATAGATTTTGAATTGGAGAGAGCCTTCGAGTTTATTGTGAACCTACCATTGGGTTCTGAGCATTGGACGTTTCG
ATGATTCAAATAAGATGTGAGCACAGTCCAATATGCATATGGGGATGA

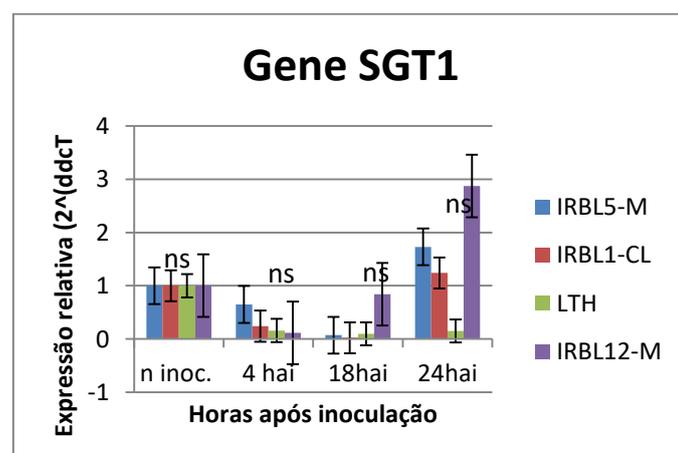
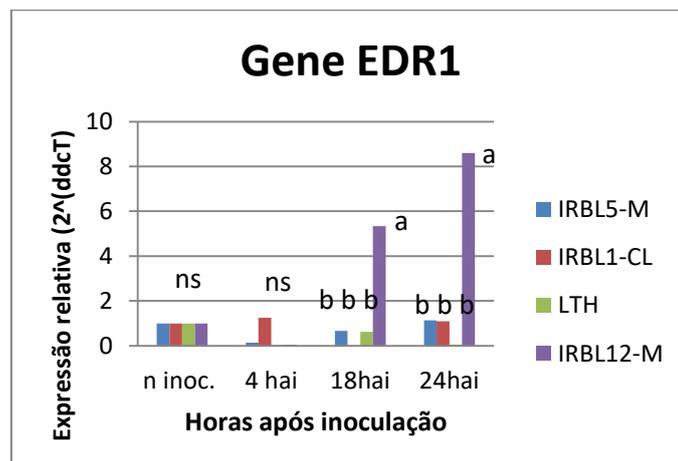
A. thaliana. Sequência equivalente: WRKY46| AT2G46400

ATGATGATGGAAGAGAAAACCTTGTGATCAACGAATTGGAACCTAGGGAAAGAGCTTGCTAACCGATTGATGAACAATCT
CAAACACACTTCTTCTGTCGATTCCAACAAAACCTTGATCTCTGATATCCTCCGATTTACCAGAATGCCATTTTCATG
TTGAGCTTCAACCAAGACAAGAATCCTTAAAGCGAAGCCTTGAGATCGATGGAAAAGATTCTAAAAACGTTCTCAA
AAAGAGGAAAGTATCGGAGAAGAACACAGAGAAAGTTAAGGTTTTTGTGCAACAGAACAAGAAAATGGCTCTATT
GATGATGGTCACTGCTGGAGAAAATATGGGCAAAAAGAGATTCATGGATCCAAAAATCCTAGAGCATATTACAGATG

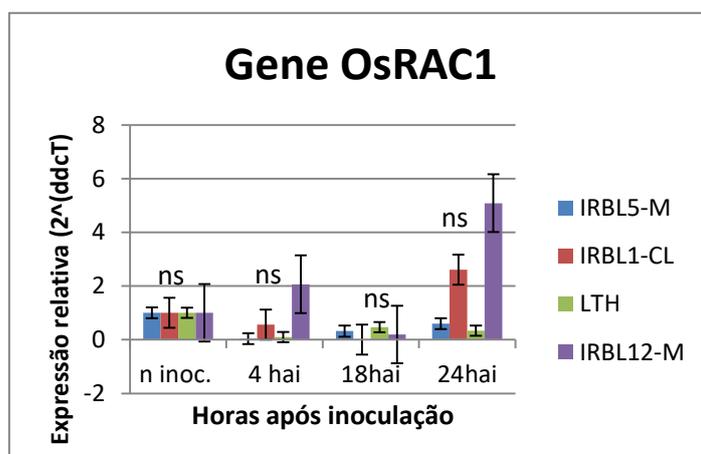
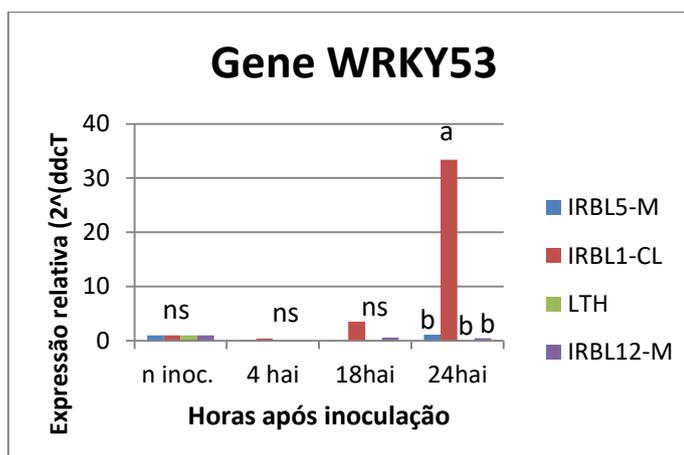
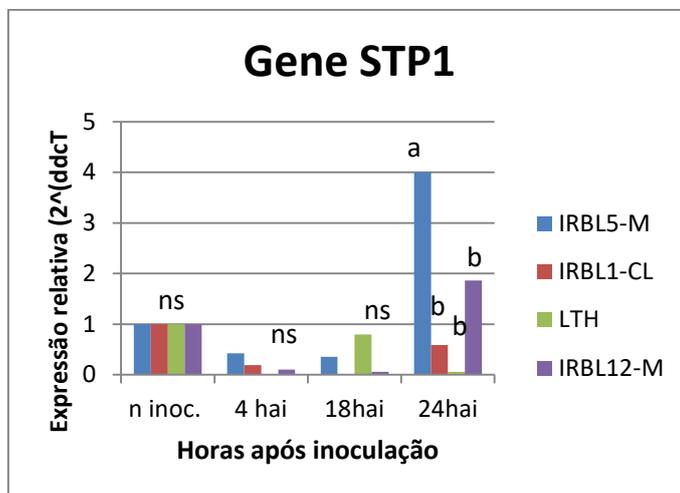
Continuação APÊNDICE 2. Sequências FASTA de mRNA de *Oryza sativa* e *A. thaliana* dos genes EDR1, HSP90, OsRAC1, SGT1, SPL11, STP1, WRKY 89 e WRKY53.

```
ACGCATCGATTACACAAGACTGTTTAGCAGTGAAGCAAGTTTCAGAAATCAGACACAGATCCTTCCCTTTTCGAAGT
GAAGTATCTCGGAAACCACACTTGTAAACAACATCACATCCCCGAAGACGACGACGAACTTCTCTGTTTCATTGACGA
ACACGAACATCTTTGAAGGAAACAGAGTACATGTTACAGAGCAATCGGAAGACATGAAACCGACCAAGTCCGAAGA
AGTGATGATAAGCCTTGAAGATCTGGAGAACAAGAAGAACATTTTCAGAACGTTTTCTTCTCTAACCATGAGATTGA
GAACGGTGTGTGGAAAAGTAACCTTTTCTTGGGAAATTTCTGTGGAAGATCTTCTCCTGCAACATCAGGGTCTGCAAT
TACCAGCGAGGTTTTATCTGCACCTGCTGCTGTTGAGAATTCCGAAACTGCAGATTTCGTATTTCTCGTCTTTGGACAAT
ATTATCGATTTCGGACAGGATTGGTTGTGGTCGTAG
```

APÊNDICE 3. Análise estatística da expressão relativa dos genes *EDR1*, *OsRac1*, *SGT1*, *HSP90*, *STP1*, *WRKY89*, *WRKY 53* e *Spl11*. Letras diferentes acima das barras têm diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância; ns: não significativo.



Continuação APÊNDICE 3. Análise estatística da expressão relativa dos genes *EDR1*, *OsRac1*, *SGT1*, *HSP90*, *STP1*, *WRKY89*, *WRKY 53* e *Spl11*. Letras diferentes acima das barras têm diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância; ns: não significativo.



Continuação APÊNDICE 3. Análise estatística da expressão relativa dos genes *EDR1*, *OsRac1*, *SGT1*, *HSP90*, *STP1*, *WRKY89*, *WRKY 53* e *Spl11*. Letras diferentes acima das barras têm diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância; ns: não significativo.

