



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**Resistência induzida por agentes bióticos e abióticos na
interação *Oryza sativa*-*Magnaporthe oryzae***

Eugenio Miranda Sperandio

Brasília – DF

2016

Eugenio Miranda Sperandio

**RESISTÊNCIA INDUZIDA POR AGENTES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA
INTERAÇÃO *ORYZA SATIVA-MAGNAPORTHE ORYZAE***

Tese apresentada à
Universidade de Brasília
como requisito parcial para
a obtenção do título de
Doutor em Fitopatologia
pelo Programa de Pós-
graduação em Fitopatologia.

Orientador

Professor Dr. Helson Mário Martins do Vale

Co-orientador

Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi

Brasília - Distrito Federal

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

SPERANDIO, Eugenio Miranda.

Resistência induzida por agentes bióticos e abióticos na interação *Oryza sativa-Magnaporthe oryzae*.

Brasília, 2016.

Número de páginas p.: 204

Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília, Brasília.

1. Indução de resistência - crosstalk

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Resistência induzida por agentes bióticos e abióticos na interação *Oryza sativa-Magnaporthe oryzae*.

Aos meus pais e à minha família.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus companheiros dos dois lados da vida que me ajudaram muito nessa etapa de minha vida.

Aos meus Pais, Ademir Sperandio e Olenice Dias de Miranda, meu amado porto seguro. Aos meus amados irmãos, Ademir Sperandio Júnior, Kellen Miranda, Gizeli Miranda de Oliveira, Luciane Sperandio, Lizandra Dias de Miranda e Luziano Batista de Miranda. À minha querida família que tanto amo. Aos companheiros da Comunidade Espírita Irmão José Martins pelos bons momentos de aprendizado e convívio antes, durante e após essa jornada. Aos queridos amigos e companheiros do Mocizade.

À minha namorada Leilane pelo apoio e compreensão.

Aos meus amigos que me toleraram esse tempo todo, sempre escutando minhas desculpas de "não posso, tenho experimento pra fazer".

À Cristina pelos ensinamentos e atenção a mim ministrados durante todo esse tempo.

Ao orientador e amigo Helson pela orientação e paciência nesse tempo todo de mestrado e doutorado. Foram muitos os momentos de aprendizado.

Aos amigos William Soares, Sandro Coelho e Alaerson Geraldine e aos demais colegas de doutorado e do Departamento de Fitopatologia - UnB.

Aos amigos da Embrapa, Fábio José Gonçalves, Stella Cristina, Maythsulene, Amanda, Thatiane, Bruna Alícia, Mythali, Rejanne e Wendell. Ao pessoal da Embrapa, Lívia, Elder, Mônica, Dra Valácia, Dra Anna Cristina, em especial pelo apoio do Márcio Vinícius. Ao pessoal do apoio técnico.

Aos *brothers* Fabyano Lopes e Andrei Steindorff pela ajuda que me deram nos momentos cruciais da reta final do meu doutorado. Ao amigo Gabriel Alves, muito obrigado pela ajuda, paciência e ensinamentos que me passou. Sua colaboração foi imprescindível para o sucesso de minha tese. Ao Professor Robert por abrir as portas do seu laboratório a mim.

À Professora Letícia e à Elienai.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de estudo. À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF pelo financiamento do projeto (nº: 0193.000926/2015).

A todos que contribuíram com esse trabalho, por mais singelo que tenha sido a ajuda, muito obrigado!

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Helson Mário Martins do Vale, com apoio da EMBRAPA Arroz e Feijão, FAPDF e CNPq.

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDOS NA
INTERAÇÃO *ORYZA SATIVA*-*MAGNAPORTHE ORYZAE*.**

EUGENIO MIRANDA SPERANDIO

TESE APROVADA EM __/__/____ por:

Dra. Gisele Pereira Domiciano
Examinador externo

Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha - CEL - IB – UnB
Examinador externo

Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller - CEL - IB – UnB
Examinador interno

Profa. Dra. Marisa Alvares S. V. Ferreira - FIT - IB- UnB
Examinador interno

Profa. Dr. Helson Mário Martins do Vale - FIT - IB- UnB
Orientador

BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL
BRASIL

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO GERAL.....	xvii
GENERAL ABSTRACT.....	xix
INTRODUÇÃO GERAL.....	20
OBJETIVO GERAL.....	22
OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	22
REVISÃO DE LITERATURA.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 1: Artigo: Evaluation of rhizobacteria in upland rice in Brazil: growth promotion and induced defense responses interaction against leaf blast (<i>Magnaporthe oryzae</i>).....	43
ABSTRACT.....	45
1. INTRODUCTION.....	45
2. MATERIAL AND METHODS.....	47
2.1. Growth promotion.....	47
2.2. Leaf blast suppression.....	49
2.3. Statistical analysis.....	52
3. RESULTS.....	52
4. DISCUSSION.....	58
5. CONCLUSIONS.....	61
6. REFERENCES.....	61
CAPÍTULO 2: Indução de resistência à brusone foliar em arroz por isolados avirulentos de <i>Magnaporthe oryzae</i>	69
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1. Desenho experimental.....	74
2.2. Plantio cultivar BRS Primavera.....	74
2.3. Seleção de isolados de <i>Magnaporthe oryzae</i>	75
2.4. Indução de resistência usando isolado avirulento de <i>M. oryzae</i>	75
2.5. Desafio com <i>M. oryzae</i>	75
2.6. Determinação da atividade das enzimas β -1,3 glucanase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase, quantificação de compostos fenólicos e teor de ácido salicílico em plantas de arroz.....	76
2.7. Microscopia das folhas de arroz tratadas com isolado avirulento de <i>M. oryzae</i>	78
2.8. Análise estatística.....	79
3. RESULTADOS.....	80
4. DISCUSSÃO.....	96
5. CONCLUSÃO.....	100
6. LITERATURA CITADA.....	101
CAPÍTULO 3: Indução de resistência em arroz por meio de indutores abióticos para controle de <i>Magnaporthe oryzae</i>	106
RESUMO.....	107
ABSTRACT.....	108
1. INTRODUÇÃO.....	109

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	111
2.1. Desenho experimental.....	111
2.2. Plantio cultivar BRS Primavera.....	111
2.3. Aplicação das moléculas químicas de ASM e JA em plantas de arroz para controle de brusone.....	111
2.4. Desafio com <i>M. oryzae</i>	111
2.5. Determinação da atividade das enzimas β -1,3 glucanase, lipoxigenase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase, quantificação de compostos fenólicos e teor de ácido salicílico em plantas de arroz.....	112
2.6. Análise estatística.....	114
3. RESULTADOS.....	115
4. DISCUSSÃO.....	124
5. CONCLUSÃO.....	129
6. LITERATURA CITADA.....	130
CAPÍTULO 4: Comparação do transcriptoma de arroz de terras altas induzidos com rizobactéria promotora de crescimento <i>Serratia</i> sp. e isolados avirulento e virulento de <i>Magnaporthe oryzae</i>.....	136
RESUMO.....	137
ABSTRACT.....	138
1. INTRODUÇÃO.....	139
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	141
2.1. Produção de suspensão da PGPR BRM 32114.....	141
2.2. Produção de inóculo do isolado avirulento de <i>M. oryzae</i>	141
2.3. Desafio das plantas de arroz com isolado virulento de <i>M. oryzae</i>	141
2.4. Extração de RNA.....	142
2.5. Sequenciamento de RNA e análise de bioinformática.....	142
2.6. Validação de RNAseq pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa.....	143
3. RESULTADOS.....	145
4. DISCUSSÃO.....	167
5. CONCLUSÃO.....	179
6. LITERATURA CITADA.....	180
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	187
ANEXOS.....	189

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1: Evaluation of rhizobacteria in upland rice in Brazil: growth promotion and induced defense responses interaction against leaf blast (*Magnaporthe oryzae*)....41

Tabela 1. Length and biomass of roots and shoots, leaf area and Nitrate Reductase activity in leaves of rice plants treated with rhizobacteria BRM 32110 and BRM 32114.....52

Tabela 2. Table 2. proteins related to pathogenesis activity of β -1,3-glucanase (Glu), lipoxygenase (LOX), phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POX) and salicylic acid contents (SA), in upland rice plants treated with the rhizobacteria followed, or not, by challenge inoculation with *M. oryzae*.....54

Tabela 3. Correlation matrix of variables related to induced resistance in rice to control rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by BRM 32114 and BRM 32110 isolates and dimensions of principal component analysis with significance of $p < 0.05$56

CAPÍTULO 2: Indução de resistência à brusone foliar em arroz por isolados avirulentos de *Magnaporthe oryzae*.....68

Tabela 1. Atividade das proteínas relacionadas à patogênese β -1,3 glucanase (GLU), fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX), compostos fenólicos (CF), teor de ácido salicílico (SA) e severidade de brusone foliar em plantas de arroz de terras altas tratadas com as isolado avirulento seguidas ou não de inoculação desafiante com isolado virulento de *M. oryzae* PY10900.....81

Tabela 2. Matriz de correlação das variáveis relacionadas a indução de resistência em arroz para controle da brusone foliar (*Magnaporthe oryzae*) por JA, ASM e JA+ASM e dimensões da análise de componentes principais com significância de $p < 0.05$86

CAPÍTULO 3: Indução de resistência à brusone foliar em arroz por meio de indutores abióticos para controle de *Magnaporthe oryzae*.....104

Tabela 1. Atividade das proteínas relacionadas à patogênese β -1,3 glucanase (GLU), fenilalanina amônia-liase (PAL), lipoxigenase (LOX), peroxidase (POX), compostos fenólicos (CF), teor de ácido salicílico (SA) e severidade de brusone foliar (SBF) em plantas de arroz de terras altas tratadas com as rizobactérias seguidas ou não de inoculação desafiante com *M. oryzae*.....116

	Página
Tabela 2. Matriz de correlação das variáveis relacionadas a indução de resistência em arroz para controle da brusone foliar (<i>Magnaporthe oryzae</i>) por JA, ASM e JA+ASM e dimensões da análise de componentes principais com significância de $p < 0.05$	121
CAPÍTULO 4: Comparação do transcrito de arroz de terras altas induzidos com rizobactéria promotora de crescimento <i>Serratia</i> sp., <i>M. oryzae</i> avirulento e <i>M. oryzae</i> virulento.....	134
Tabela 1. Descrição das bibliotecas sequenciadas (RNA-seq) de plantas de arroz.....	148
ANEXOS.....	182
Tabela 1. Oligos utilizados na validação dos dados de RNAseq via qRT-PCR.....	183
Tabela 2. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com ácido salicílico (SA).....	184
Tabela 3. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com ácido jasmônico (JA).....	185
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com Etileno (ET).....	187
Tabela 5. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados proteínas relacionadas à patogênese (PRP).....	188
Tabela 6. Genes diferencialmente expressos (DEG) da família de fatores de transcrição WRKY.....	191
Tabela 6. Genes diferencialmente expressos (DEG) da família proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, MAPKK e MAPKKK).....	192
Tabela 7. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com genes de resistência (R).....	193
Tabela 8. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com síntese de fitoalexinas.....	194
Tabela 9. Genes diferencialmente expressos (DEG) do citocromo P450.....	195
Tabela 10. Genes diferencialmente expressos (DEG) de genes envolvidos no <i>crosstalk</i> das vias hormonais.....	197

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1: Evaluation of rhizobacteria in upland rice in Brazil: growth promotion and induced defense responses interaction against leaf blast (*Magnaporthe oryzae*)....41

Figura 1. Root growth of rice seedling 10 days after planting. Seeds were microbiolized with water (A and D), with isolate BRM 32110 (B and E) and BRM 32114 (C and F) and transferred to test tubes containing water-agar medium (0.8% w/v) (bar = 5 mm).....66

Figura 2. Area under the disease progress curve (AUDPC) of three different treatments: control (diamond): seeds microbiolized and plants drenched with water only and sprayed inoculated with *M. oryzae* conidial suspension; BRM32110 (square): seeds microbiolized and plants drenched with BRM 32110 suspension and sprayed inoculated with *M. oryzae* conidial suspension; BRM32114 (triangle): seeds microbiolized and plants drenched with BRM 32114 suspension and sprayed inoculated with *M. oryzae* conidial suspension. The bars above and below show maximum and minimum values of disease severity, respectively. Curves followed by the same letter are not statistically different by Tukey ($p=0,05$) test.....66

Figura 3. Principal Component Analyses plot with induced resistance variables investigated for control of rice blast (*M. oryzae*) by plant growth-promoting rhizobacteria.....67

CAPÍTULO 2: Indução de resistência à brusone foliar em arroz por isolados avirulentos de *Magnaporthe oryzae*.....68

Figura 1. Severidade de brusone foliar em folhas de arroz. Plantas controle (A), induzidas com PY10749 (B), induzidas com PY10749 e desafiadas com PY10900 (C) e testemunha PY10900 (D).....79

Figura 2. PCA biplot com variáveis de investigadas na indução de resistência de plantas de arroz com isolado avirulento de *M. oryzae* de acordo com os dois primeiros componentes. A-correlação entre as variáveis; B-distribuição dos dados.....85

Figura 3. Observação de microscopia eletrônica de varredura. Folha de arroz inoculada com isolado virulento de *M. oryzae* PY10900 24h após o desafio (3DPI). A: apressório; GT: tubo germinativo; C: conídio.....87

Figura 4. Observação de microscopia eletrônica de varredura. Folha de arroz induzida com isolado avirulento PY10749 e inoculada com <i>M. oryzae</i> virulento 48h após o desafio (4DPI). A: apressório; GT: tubo germinativo.....	88
Figura 5. Observação de microscopia eletrônica de varredura de folha de arroz tratadas com H ₂ O (controle). E: estômato.....	89
Figura 6. Microscopia óptica de luz em plantas de arroz. Corte transversal de folhas de plantas induzidas com <i>M. oryzae</i> avirulento (PY10749) e desafiada com <i>M. oryzae</i> virulento (PY10900). BC: células buliformes; UE: epiderme superior; LE: epiderme inferior; PC: parênquima clorofiliano; V: vesículas com conteúdo citoplasmático; HR: reação de hipersensibilidade - células mortas.....	90
Figura 7. Microscopia óptica de luz em plantas de arroz. Corte transversal de folhas de plantas induzidas com <i>M. oryzae</i> avirulento (PY10749). AP: parênquima aquífero; BC: células buliformes; CP: parênquima clorofiliano; CT: células propriamente ditas; F: fibras; V: vesículas com conteúdo citoplasmático; P: floema; X: xilema.....	91
Figura 8. Microscopia óptica de luz em plantas de arroz. Corte transversal em folhas de plantas desafiadas com PY10900 (testemunha). BC: células buliformes; PC: célula plasmolizada; NT: tecido necrosado.....	92
Figura 9. Observação de microscopia óptica de epifluorescência. A e B: plantas de arroz induzidas com isolado PY10749 e desafiados com PY10900 mostrando células epidérmicas com fluorescência indicando deposição de calose (CD) ao redor de áreas lesionadas (L); C: plantas tratadas com PY10900 (E=estômatos); D: plantas controle (H ₂ O) com tricomas (T).....	93
CAPÍTULO 3: Indução de resistência à brusone foliar em arroz por meio de indutores abióticos para controle de <i>Magnaporthe oryzae</i>	104
Figura 1. Severidade de brusone foliar em folhas de arroz. Tratamento controle (H ₂ O) (A). B-E: plantas induzidas com ASM (B), induzidas com JA+ASM (C), induzidas com JA (D) e testemunha (PY10900) (E).....	114
Figura 2. PCA biplot com variáveis de investigadas na indução de resistência de plantas de arroz com JA, ASM e JA+ASM desafiadas com <i>M. oryzae</i> de acordo com os dois primeiros componentes. A-correlação entre as variáveis; B-distribuição dos dados.....	120

CAPÍTULO 4: Comparação do transcrito de arroz de terras altas induzidos com rizobactéria promotora de crescimento *Serratia* sp., *M. oryzae* avirulento e *M. oryzae* virulento.....134

Figura 1. Gráfico de média de expressão *versus* \log^2 fold change (MA-plots). Mudanças transcricionais estão presentes nas plantas de arroz após a indução. Valores de média de expressão normalizadas são plotadas contra \log_2 fold changes. Genes com um FDR < 0.05 são plotados em vermelho.....144

Figura 2. Diagrama de DEGs modulados pelos respectivos agentes indutores. Os DEGs encontrados 24hs após a indução.....145

Figura 3. Mudanças no perfil de DEGs entre as três amostras.....145

Figura 4. Diagrama de Venn ilustrando a relação entre os genes modulados nas condições PGPR, AVR e VIR.....146

Figura 5. Clusterização e *heat map* da expressão de genes da biossíntese de SA e genes responsivo a SA modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote *heatmap.2*. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....147

Figura 6. Clusterização e *heat map* da expressão de genes da biossíntese do JA e genes reponsivos a JA modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote *heatmap.2*. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....150

Figura 7. Clusterização e *heat map* da expressão de genes da biossíntese de etileno (ET) e de genes responsivos ao ET modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote *heatmap.2*. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....151

Figura 8. Clusterização e *heat map* da expressão de genes de proteínas relacionadas a patogênese (PRP) modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa

R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....153

Figura 9. Clusterização e *heat map* da expressão de genes fatores de transcrição WRKY modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....155

Figura 10. Clusterização e *heat map* da expressão de genes MAP quinases modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....156

Figura 11. Clusterização e *heat map* da expressão de genes da biossíntese de fitoalexinas modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....157

Figura 12. Clusterização e *heat map* da expressão de genes do citocromo P450 modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....159

Figura 13. Clusterização e *heat map* da expressão de genes relacionados com resistência (R) modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....160

Figura 14. Clusterização e *heat map* da expressão de genes envolvidos na interação de hormônios de defesa e modulados segundo os diferentes

tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.....161

Figura 15. Validação via qRT-PCR dos dados da expressão relativa do genes obtidos via RNA-seq. Níveis de expressão dos transcritos selecionados estão na barra preta (qRT-PCR) e na linha (RNA-seq). Dois genes, um de actina e outro de ubiquitina foram utilizados para normalização dos dados de qRT-PCR. As barras de erro indicam o desvio padrão para ensaios feitos com duplicata técnica.....162

RESUMO GERAL

SPERANDIO, Eugenio Miranda. Resistência induzida por agentes bióticos e abióticos na interação *Oryza sativa*-*Magnaporthe oryzae*. 204p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das culturas mais importantes do mundo, sendo base para alimentação de metade da população global. O vigor inicial de cultivares de terras altas e a brusone (*Magnaporthe oryzae*) são os principais desafios enfrentados por essa cultura. O controle dessa doença é feito principalmente pelo uso de fungicidas e de cultivares resistentes. A alta variabilidade adaptativa do patógeno permite o aparecimento de indivíduos resistentes aos princípios ativos e o surgimento de novas raças capazes de suplantar os genes de resistência das cultivares de arroz. Isso torna necessário a constante busca por meios para contornar esses problemas visando conciliar o controle com preservação ambiental e saúde humana. Plantas possuem mecanismos de defesa que permanecem latentes e podem ser ativados. A indução de resistência (IR) possui potencial para ser aplicada no controle de doença de plantas. Os agentes indutores podem ser rizobactérias promotoras de crescimento e patógenos avirulentos, bem como hormônios vegetais. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de *Serratia* sp. na promoção de crescimento e determinar e comparar a expressão gênica, aspectos bioquímicos e fenotípicos durante a ativação e interação de respostas de defesa em plantas de arroz desencadeadas por rizobactéria (*Serratia* sp.), *M. oryzae* avirulento (AVR) e Acibenzolar-S-metil (ASM) em resposta ao desafio com *M. oryzae*. *Serratia* sp BRM32114 promoveu o crescimento, reduziu o progresso da doença e induziu resistência, ativou respostas de defesa inicialmente regulados pelo ácido salicílico. A infecção não se estabeleceu em plantas tratadas com *M. oryzae* avirulento onde houve uma rápida ativação de β -1,3-glucanase (GLU) e peroxidase (POX), reação de hipersensibilidade (RH) e modificações histológicas nas plantas de arroz. Acibenzolar-S-metil (ASM), análogo do SA, induziu resistência sistêmica nas plantas com aparição de sintomas de RH e a aplicação de JA seguida do desafio com *M. oryzae* aumentou a suscetibilidade de arroz à brusone; o antagonismo entre JA e ASM foi confirmado pela inoculação do patógeno após a indução da planta com a aplicação em conjunto de ambos agentes indutores. A análise do transcrito de plantas induzidas indicou que há semelhanças e algumas diferenças entre as respostas de defesa ativadas ISR e SAR, desencadeadas por *Serratia* sp. e *M. oryzae* AVR, respectivamente. *Serratia* sp. modula diferencialmente genes relacionados com biossíntese de SA e também

alguns envolvidos no *cross-talk* entre os hormônios de defesa. *M. oryzae* avirulento superexpressa enzimas que degradam parede celular fúngica como GLU e quitinases, bem como enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Já o isolado de *M. oryzae* virulento modula a seu favor genes que antagonizam respostas governadas por SA, superexpressando genes envolvidos na síntese de JA e aqueles envolvidos na degradação de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chaves: Imunidade das plantas, MAMP, patógeno-hospedeiro, *priming* de defesa, PTI, transcritoma.

Orientador - Prof. Dr. Helson Mário Martins do Vale - Universidade de Brasília, Brasília-DF; Co-orientador - Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi - EMBRAPA Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO.

GENERAL ABSTRACT

SPERANDIO, Eugenio Miranda. Resistance induced by biotic and abiotic agents in the interaction *Oryza sativa*-*Magnaporthe oryzae*. 204p. Thesis (PhD in Phytopathology) - University of Brasília, Brasília, DF.

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important crops in the world wide, being the basis for feeding half the global population. The initial vigor of upland cultivars and blast (*Magnaporthe oryzae*) are the main challenges faced by this crop. Today control of this disease is mainly achieved by the use of fungicides and resistant cultivars. The high adaptive variability of the pathogen allows the appearance of individuals resistant to the active principles and the emergence of new breeds capable of supplanting the resistance genes of the rice cultivars. This makes it necessary to constantly search for means to overcome these problems in order to reconcile control with environmental preservation and human health. Plants have defense mechanisms that remain latent and can be activated. Induced resistance (IR) has potential to be applied to plant disease control. The inducing agents may be plant growth-promoting rhizobacteria and avirulent pathogens, as well as plant hormones. The objective of this work was to verify the effect of *Serratia* sp. In the promotion of growth and to determine and compare gene expression, biochemical and phenotypic aspects during the activation and interaction of defense responses in rice plants triggered by rhizobacteria (*Serratia* sp.), *M. oryzae* avirulent (AVR) and Acibenzolar-S- Methyl (ASM) in response to challenge with *M. oryzae*. *Serratia* sp. BRM32114 promoted growth, reduced disease progression and induced resistance, activated defense responses initially regulated by salicylic acid. The infection was not established in plants treated with avirulent *M. oryzae* where there was a rapid activation of β -1,3-glucanase (GLU) and peroxidase (POX), hypersensitivity reaction (RH) and histological modifications in rice plants. Acibenzolar-S-methyl (ASM), an analogue of SA, induced systemic resistance in plants with the appearance of HR symptoms and the application of JA followed by challenge with *M. oryzae* increased rice susceptibility to blast; The antagonism between JA and ASM was confirmed by inoculation of the pathogen after induction of the plant with the application together of both inducing agents. Induced plant transcriptase analysis indicated that there are similarities and some differences between the ISR and SAR activated defense responses, triggered by *Serratia* sp. and *M. oryzae* AVR, respectively. *Serratia* sp. Differentially modulates genes related to SA biosynthesis and also some involved in the cross-talk between defense hormones. *M. oryzae* avirulent overexpresses

enzymes that degrade fungal cell wall like GLU and chitinases, as well as enzymes involved in oxidative stress. In contrast, the virulent *M. oryzae* isolate modulates genes that antagonize SA-governed responses, overexpressing genes involved in the synthesis of JA, and those involved in the degradation of reactive oxygen species.

Keywords: Defense priming, host-pathogen, MAMP, plant immunity, PTI, transcriptome.

Advisory Committee: Prof. Dr. Helson Mário Martins do Vale - Universidade de Brasília, Brasília-DF (Advisor); Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi - EMBRAPA Rice and Beans, Santo Antônio de Goiás-GO (Co-advisor).

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz e o maior produtor fora do continente asiático produzindo mais de 11 milhões de toneladas no último ano, valor correspondente a 1,6% da produção mundial. Segundo a FAO, há uma necessidade de incremento na produção de 3% ao ano, entretanto, a projeção de crescimento é de apenas 38% até 2030 (FAO, 2013). Sua produção é destinada ao consumo interno, que atinge 75 Kg/habitante/ano e constitui-se no principal produto da cesta básica, correspondendo 22% do orçamento em alimentação (EMBRAPA, 2005). De acordo com IBGE (2013), no estado de Goiás a área destinada ao plantio do arroz para a safra 2012/2013 foi 48,9% menor do que a safra 2011/2012, totalizando cerca de 29.790 ha a menos e estima-se uma redução na produção de 65,9%, o que corresponde a 61.953 t a menos. Entre os entraves para o aumento da produtividade destacam-se os estresses bióticos, como a incidência das doenças fúngicas, causada pelos patógenos *Magnaporthe oryzae*, *Monographella albescens*, *Bipolaris oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *Sarocladium oryzae*, que podem diminuir em até 100% o potencial produtivo das cultivares geneticamente melhorada (Prabhu *et al.*, 2002; Prabhu *et al.*, 2009).

Atualmente, o controle das doenças vem sendo feito com o manejo que integra a resistência genética da cultivar e práticas fitotécnicas, incluindo controle químico. A intensificação de cultivo de arroz, altamente mecanizado em áreas extensas e contínuas, proporciona um rápido desenvolvimento das doenças. Este cenário cria um desafio para adoção do manejo integrado de doenças, que, atualmente, requer a inserção de métodos alternativos, viáveis e apropriados, considerando aspecto sócio econômico, conservação de ambiente e a complexa biologia do patógeno *M. oryzae*. As investigações sobre controle biológico de brusone se faz necessário, considerando as demandas por tecnologias sustentáveis, como a redução de danos ambientais com o uso intensivo de produtos químicos. Dentro deste enfoque, a indução de resistência constitui-se em uma opção para fortalecer a adoção do manejo integrado (Prabhu *et al.*, 2002; Filippi & Prabhu, 2006; Filippi *et al.*, 2011).

Para defenderem-se contra os patógenos, as plantas possuem mecanismos de defesa constitutivos e induzíveis (Verhagen *et al.*, 2006). Mesmo quando suscetíveis, há mecanismos nas plantas que são capazes de retardar ou até mesmo impedir que uma infecção se estabeleça. Essas defesas estão diretamente reguladas ao nível de hormônios, tais como ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e ácido salicílico (SA). A

indução de resistência é classificada como induzida (ISR – “Induced Systemic Resistance”) ou adquirida (SAR – “Systemic Acquired Resistance”). SAR e ISR são fenotipicamente semelhantes, embora sejam reguladas por diferentes vias de sinalização (Van der Ent *et al.*, 2009). Ambas desencadeiam respostas de defesa como acúmulo de hormônios vegetais como ácido salicílico e ácido jasmônico, aumento de proteínas relacionadas à patogênese tais como β -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, reforço das paredes celulares pela deposição de lignina e ativação da expressão de genes de defesa. A SAR pode ser desencadeada por um agente patogênico ou pela aplicação de moléculas químicas anteriores ao momento da infecção, podendo apresentar reações de hipersensibilidade (RH). ISR é induzida por outros microrganismos não-fitopatogênicos como fungos e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, PGPF e PGPR, respectivamente (Raj *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013).

As respostas de resistência sistêmica, tanto SAR quanto ISR, são iniciadas a partir do momento em que os elicitores são reconhecidos (Van der Ent *et al.*, 2009). Isso se dá principalmente por meio de componentes da superfície celular, como polissacarídeos (quitina e glucana) e flagelos. Os receptores das plantas responsáveis pelo reconhecimento desses elicitores se localizam principalmente na membrana plasmática (Faulkner & Robatzek, 2012). Esses componentes microbianos são conhecidos como padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) e/ou a patógenos (PAMPs) (Schwessinger & Zipfel, 2008; Boller & Felix, 2009; Pieterse *et al.*, 2014).

No presente trabalho, os agentes elicitores *Serratia* sp. BRM32114, *M. oryzae* avirulento e virulento, previamente identificados, foram utilizados para estudos comparativos bioquímicos, genéticos e histológicos entre as rotas metabólicas envolvidos na indução de resistência em arroz contra *M. oryzae*. Além da compreensão mais ampla sobre indução de resistência em arroz, este trabalho poderá fornecer respostas aplicáveis para contornar os desafios do aumento produtividade de arroz de terras altas e controle de doença pelas rizobactérias bem como genes de defesa por meio da indução desencadeada por isolados de *M. oryzae* avirulentos.

OBJETIVO GERAL

Determinar e comparar a expressão gênica e aspectos fenotípicos durante a indução de SAR e ISR em plantas de arroz desafiadas com *Magnaporthe oryzae*.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar variáveis de promoção de crescimento (atividade de nitrato redutase e tamanho e peso de plantas) induzidas com rizobactérias *Bacillus* sp. (BRM32110) e *Serratia* sp. (BRM32114).
- 2) Quantificar as enzimas quitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase, lipoxigenase, quantificar compostos fenólicos e ácido salicílico durante a defesa da planta induzida com *Serratia* sp. BRM32114 e *M. oryzae* avirulento contra brusone do arroz.
- 3) Verificar modificações estruturais por microscopia de luz *in situ* em folhas de arroz induzidas com *M. oryzae* avirulento.
- 4) Verificar o antagonismo entre as respostas de defesa desencadeadas por ASM e JA, como os mecanismos de defesa interagem e seus efeitos no controle de *M. oryzae*.
- 5) Comparar o perfil dos transcriptomas de plantas de arroz induzidas com *Serratia* sp., *M. oryzae* avirulento e *M. oryzae* virulento observando os genes diferencialmente expressos em cada um desses tratamentos.

REVISÃO DE LITERATURA

A cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa*) é a fonte de 20% de calorias e 13% das proteínas consumidas no mundo para cerca de três bilhões de pessoas da população mundial, sendo a base da alimentação de metade da população mundial, sendo, portanto, uma cultura com grande importância na manutenção da segurança alimentar a nível mundial (FAO, 2013). O consumo do arroz cereal tende a aumentar à medida que a população cresce, porém a sua produção não sobe na mesma proporção e em alguns locais decresce, principalmente devido à redução da área plantada e a queda na produtividade. Uma das causas é a ocorrência de doenças. Há estimativas de que a produção deve ser dobrada até 2050 para atender a demanda populacional por este alimento (Khush, 2005).

A cadeia orizícola de produção movimenta anualmente cerca de R\$ 4 bilhões ao ano no Brasil, representando 11% do total da produção agrícola brasileira. A produtividade média do arroz no país é aproximadamente 7 ton/ha (IBGE, 2012) e espera-se um crescimento de 7,2% da produção nos próximos dez anos (MAPA, 2015). O cultivo do arroz no Brasil é feito sob dois sistemas: arroz irrigado e arroz de terras altas. O primeiro é cultivado principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Maranhão e Tocantins, sendo o irrigado o sistema com a maior produção e produtividade; o segundo é cultivado majoritariamente na região centro-norte (CONAB, 2015). O sistema de produção de arroz de terras altas vem aumentando sua porcentagem na produção orizícola nacional, espalhando e aumentando sua área de cultivo no centro-oeste, norte e nordeste do Brasil (Crusciol *et al.*, 2005). Menores custos de produção, gasto de eletricidade e consumo de água são algumas vantagens que este sistema possui sobre o cultivo irrigado, porém, o arroz de terras altas possui uma baixa resposta a adubação. Isso é devido a problemas de desenvolvimento inicial e crescimento da planta, principalmente em áreas de cultivos sucessivos, além da alta ocorrência de doenças, resultando numa baixa produtividade quando comparado ao arroz irrigado (Filippi *et al.*, 2012).

Brusone

Entre as doenças do arroz, a brusone, cujo agente etiológico é o fungo *Magnaporthe oryzae*, é um dos principais fatores limitantes dessa cultura. Essa doença é comum a todas as regiões produtoras do mundo, e em anos de epidemias severas, as perdas podem chegar a 100%. A brusone ocorre em todos os estádios fenológicos da

planta de arroz. Os sintomas nas folhas iniciam-se com o aparecimento de lesões necróticas elípticas, geralmente com o centro cinza, onde ocorre a esporulação do fungo, e borda marrom, podendo coalescer à medida que crescem, levando à morte as folhas infectadas. Os sintomas são encontrados também em outras partes das plantas, como os nós, entrenós e panículas, potencializando as perdas (Prabhu *et al.*, 2002; 2009).

M. oryzae é um patógeno hemibiotrófico pertencente ao Filo Ascomycota. Tem como anamorfo o hifomiceto moniliáceo *Pyricularia oryzae*. Suas hospedeiras são majoritariamente da família Poaceae. *M. oryzae* é utilizado como organismo modelo para investigação de interação planta-fungo. Isso ocorre devido à sua importância econômica, pelo fato de seu genoma bem como do arroz terem sido sequenciados e pelas características biológicas do próprio patógeno (Richard *et al.*, 2009). O fungo pode atacar a planta de arroz em todos os seus estágios de desenvolvimento, podendo infectar folhas, caules, nós e panículas. O conídio do fungo se adere a superfície da planta por meio de uma mucilagem no ápice do conídio, prendendo-o na hospedeira e emitindo um tubo germinativo. Esse tubo dilata-se na ponta, forma uma parede celular mais espessa e então diferencia-se num apressório. O apressório começa a acumular melanina, cria a pressão de turgor, aumenta a pressão sob a superfície foliar, e emite uma hifa de penetração (peg), que perfura a cutícula permitindo a entrada do fungo na epiderme foliar. A colonização inicia-se com as hifas invasivas que produzem haustórios que invaginam na membrana plasmática das células da hospedeira. O movimento célula-à-célula. pode iniciar-se por meio dos plasmodesmos. As lesões tornam-se visíveis entre 72 e 96 horas após a penetração e a esporulação ocorre principalmente em condições altas de umidade. O seu desenvolvimento na planta inicia-se por meio de uma colonização intercelular, com a formação de haustórios nas células das hospedeiras. Com a morte das células colonizadas, o fungo passa a nutrir-se de células mortas, iniciando-se a fase necrotrófica da colonização (Wilson & Talbot, 2009; Dean *et al.*, 2012).

Atualmente, o controle da brusone é baseado no manejo que integra o controle químico, a resistência genética e os tratos culturais. No Brasil, 41 produtos estão registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os principais grupos químicos são os triazol, estrobirulina e benzotiazol (AGROFIT, 2016). O uso de defensivos requer uma aplicação constante e o melhoramento genético necessita da disponibilidade de genes e ambos os métodos de controle são limitados a

um ou poucos patógenos. A resistência genética visa minimizar as perdas causadas pela brusone. É uma estratégia considerada social, econômica e ecologicamente correta e ao longo dos anos tem-se obtido cultivares resistentes por meio de técnicas de melhoramento convencional. Entretanto, cultivares de arroz geneticamente melhoradas para resistência a brusone, não apresentam resistência estável, quando plantada em larga escala, causando decréscimos na produtividade (Ou *et al.*, 1980). A duração da resistência de um determinado cultivar dependerá da velocidade e facilidade que o fitopatógeno seja capaz de produzir novos patótipos (Parleviet & Zadoks, 1977), o que acontece de forma muito rápida quando se trata de *M. oryzae*, quando comparados com outros patógenos. O seu teleomorfo encontrado na natureza somente no centro de origem do arroz no sudeste da Ásia, porém, mutações e recombinações gênicas parassexuais são os principais eventos responsáveis pela alta variabilidade deste fitopatógeno (Dean *et al.*, 2012).

Mais de 90 genes de resistência (R) para *M. oryzae* já foram identificados (Monaco *et al.*, 2013), entretanto, embora esforços tenham sido feitos para o desenvolvimento constante de novas cultivares resistentes, utilizando vários alelos de resistência como fonte para o melhoramento, o desafio do controle ainda permanece. Os conhecimentos sobre a interação patógeno-hospedeiro constituem-se num recurso eficiente no estudo do processo infeccioso ajudando a esclarecer os acontecimentos do ciclo patogênico, antes, durante e após o estabelecimento da infecção, elucidando os eventos morfológicos e fisiológicos da patogênese. Isso possibilita um aumento na eficiência dos métodos de controle (Richard *et al.*, 2009). A genômica permitiu obter-se um conhecimento mais amplo em relação aos genes envolvidos na resistência a brusone. Esta ferramenta possibilita explorar mais detalhadamente a complexidade dos mecanismos de defesa da planta, gerando perspectivas de novas estratégias de manejo (Monaco *et al.*, 2013).

Neste contexto, a indução de resistência, que é a ativação de mecanismos de defesa da própria planta, surge como uma alternativa no controle desta doença, entretanto, para fazer uso dessa ferramenta, é necessário que se conheça os mecanismos envolvidos na interação entre patógeno e hospedeira (Van der Ent *et al.*, 2009). Do ponto de vista ambiental, induzir a defesa de plantas é uma forma mais atrativa e inteligente quando comparada com controle químico, deixando que o hospedeiro se proteja através de seus próprios mecanismos contra uma ampla gama de fitopatógenos, de forma duradoura. O uso de defensivos ainda é, contudo, uma alternativa usada no

controle da brusone (Schwan-Estrada *et al.*, 2008; Raj *et al.*, 2012). É provável que a resistência induzida contra doenças através de ativadores químicos ou por outros meios se torne um componente importante dos programas de manejo de doenças, particularmente nos casos onde os métodos atuais de controle mostram-se pouco efetivos, bem como no controle de doenças de pós-colheita envolvendo sementes, grãos, frutas e vegetais. Obviamente, um dos resultados dessa nova tecnologia deverá ser a diminuição no uso dos agrotóxicos tradicionais, o que vem de encontro com a preocupação mundial no tocante à preservação do meio ambiente e a redução da poluição, tornando-se uma importante ferramenta para uma agricultura sustentável (Van der Ent *et al.*, 2009; Walters *et al.*, 2013).

Indução de resistência

Plantas possuem mecanismos eficientes de defesa que permanecem latentes e são ativados por agentes indutores, tais mecanismos são conhecidos como pós-formados. A deposição de materiais que reforçam as barreiras físicas celulares como lignina e calose, o acúmulo de fitoalexinas e aumento da produção de proteínas relacionadas a patogênese são considerados mecanismos pós-formados de defesa. Mesmo quando suscetíveis, esses mecanismos são capazes de retardar ou até mesmo impedir que a infecção se estabeleça. Compostos antimicrobianos desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa da planta. Indução de defesa envolve a ativação de mecanismos múltiplos que incluem o aumento da atividade de proteínas relacionada à patogênese (PRP) e um aumento no nível de hormônios de defesa como ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA). O aumento do nível de tais hormônios é frequentemente relacionado com um ataque por patógenos. Esses aumentos dependem do fitopatógeno, visto que cada hormônio age na resistência contra uma dada gama patógenos e os papéis de diferentes hormônios variam de acordo com a interação planta-patógeno (Verhagen *et al.*, 2006; Mengiste, 2012; Walters *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014).

Quando atacadas, plantas são capazes de aumentar sua resistência e essa condição é referida como resistência adquirida ou induzida (Verhagen *et al.*, 2006). A indução de resistência em plantas é organizada em dois tipos: resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) (Figura 1). SAR pode ser desencadeada após uma infecção local ou em diferentes pontos, estendendo-se para partes da planta distante do local de infecção, podendo ser induzida por patógenos e por

moléculas químicas (Zhu *et al.*, 2003; Vlot *et al.*, 2009; Walters *et al.*, 2013). A indução da SAR é acompanhada pela produção e acúmulo local e/ou sistêmico do ácido salicílico (SA) e que ativam genes relacionados à patogênese (PR-genes) que por sua vez, se expressam através da síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PRP) (Van Loon & Van Strien, 1999; Vlot *et al.*, 2009). Plantas possuem um mecanismo rápido e efetivo contra patógenos biotróficos, que previne a disseminação da infecção causada por fitopatógenos; este mecanismo é conhecido como reação de hipersensibilidade (HR). A HR é um processo que culmina numa morte rápida e programada das células que circundam os sítios de infecção, restringe a colonização pelo patógeno dos tecidos sítio de infecção e vizinhas a ele e impede o estabelecimento da doença. Esta reação se dá por meio da expressão de genes de defesa, produção de moléculas antimicrobianas, síntese de lignina e principalmente pela explosão oxidativa, que é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Camejo *et al.*, 2016), sendo este mecanismo, que pode ser observado em plantas induzidas, um indicador clássico de indução de resistência (Kunstler *et al.*, 2016).

Microrganismos benéficos do solo podem induzir uma imunidade sistêmica similar a SAR. Este fenômeno é chamado de indução de resistência sistêmica (ISR). Em contraste com SAR, ISR pode ser ativado por microrganismos não-fitopatogênicos como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) (Raj *et al.*, 2012) e fungos (PGPF) (Campos-Soriano *et al.*, 2012) e é regulada por vias de sinalização dependentes de jasmonatos e etileno (Pieterse *et al.*, 2014). Lipopolissacarídeos são exemplos de elicitores de PGPRs que podem desencadear respostas de defesa em plantas. Xilanases, celulases e outras proteínas enzimáticas, bem como o pepitídeo Sml produzido por *Trichoderma virens* são exemplos de elicitores produzidos por PGPF (Pieterse *et al.*, 2014). Estes microrganismos induzem a resistência e protegem não só as raízes como também órgãos distantes por ela colonizados e podem exibir mecanismos antagônicos contra fitopatógenos, como competição por nicho e nutrientes, além de promover o crescimento (Babalola, 2010; Matilla *et al.*, 2010). A promoção de crescimento pode ser atribuído a produção de hormônios de crescimento bem como um aumento da disponibilidade de nutrientes limitados no solo como P, Fe e N, com o metabolismo do N possuindo papel de destaque no crescimento e em infecções (Bolton & Thomma, 2008). Além da resistência basal que age nos sítios de infecção, as hospedeiras aumentam níveis de hormônios sinalizadores e aumentam também a expressão de genes de defesa em locais distantes dos sítios de infecção. Fortificação e

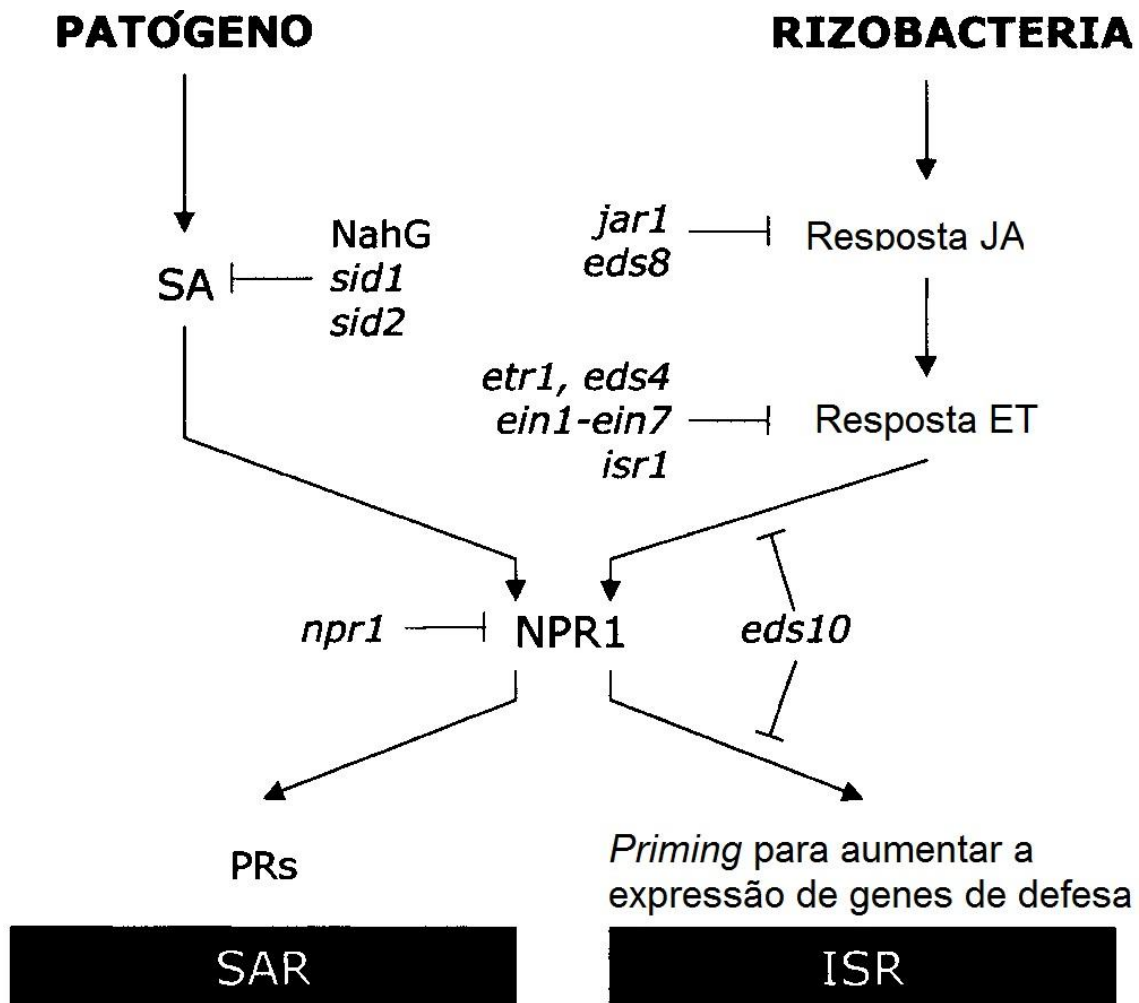
espessamento da parede celular, formação de papilas, produção de compostos fenólicos e de espécies reativas de oxigênio (EROs) são algumas das mudanças observadas em plantas que estão no estado de ISR (Raj *et al.*, 2012), onde hormônios vegetais como ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e ácido abscísico estão envolvidos (Pieterse *et al.*, 1998; Mengiste, 2012; Pieterse *et al.*, 2014).

Apesar de SAR e ISR serem fenotipicamente semelhantes, conferindo às plantas uma proteção sistêmica contra uma gama de patógenos, elas são reguladas por diferentes tipos de vias de sinalização. Embora SAR e ISR forneçam às plantas uma proteção contra diferentes tipos de patógenos, o seu alcance pode ser diferente dependendo do tipo de colonização do patógeno (Van der Ent *et al.*, 2009). Sinalização feita por SA ativa resistência contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos. Já a combinação JA-ET ativa a defesa contra patógenos com estilo de nutrição necrotrófico (Glasebook, 2005). Essas vias de sinalização são antagônicas. Resistência contra patógenos biotróficos/hemibiotróficos são frequentemente relacionados com um aumento na suscetibilidade a patógenos necrotróficos e níveis elevados de resistência a patógenos necrotróficos estão associados com uma maior suscetibilidade das hospedeiras ao ataque de patógenos biotróficos e/ou hemibiotróficos (Van der Ert *et al.*, 2008; Segarra *et al.*, 2009; Shetty *et al.*, 2012). A contribuição desses hormônios na relação patógeno-hospedeiro é crucial para uma possível patogênese (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos de indução com microrganismos benéficos são associados com JA/ET (Van Lon & Bakker, 2006), entretanto, vários trabalhos apontam o envolvimento de não-fitopatógenos induzindo resistência utilizando SA como via de sinalização (Conn *et al.*, 2008; Rudrappa *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2014). Sabe-se que o ácido salicílico está associado à SAR, entretanto, há evidências que há outros hormônios envolvidos nesta via de sinalização. Verbene *et al.* (2003) demonstraram que para o começo da SAR em tabaco, o etileno é requerido para desencadear o processo de indução via SA contra infecção por *Tobacco Mosaic Virus*. Trabalhos feito por Truman *et al.* (2007) mostraram que mutantes de *Arabidopsis thaliana* nos genes (*sgt1b*, *opr3* e *jin1*) envolvidos na via de sinalização de jasmonatos foram incapazes de manifestar SAR quando inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* avirulentas. Por outro lado, mutantes dos genes *jar1*, *eds8* e *coil*, todos envolvidos com a síntese de JA, submetidos ao mesmo tratamento, foram capazes de desencadear SAR (Pieterse *et al.*,

1998; Attaran *et al.*, 2009). Isso sugere que JA está envolvido no desenvolvimento de SAR, mas seu papel exato em SAR ainda não foi elucidado (Van der Ent *et al.*, 2009).

A proteína NPR1 (*Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes1*) é citada como crucial na indução de resistência, tendo um papel chave nas respostas de SAR (Delaney *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2009; Sugano *et al.*, 2010) e ISR (Pieterse *et al.*, 2000; Mengiste, 2012) (Figura 1). Plantas demonstraram ser mais suscetíveis ao ataque de patógenos quando a expressão do gene *NPR1* (também conhecido como NIM1 ou SAI1) se mostrava reprimida (Delaney *et al.*, 1995). Por outro lado, a superexpressão do NPR1 ou de genes análogos aumentou a resistência ao ataque de patógenos (Sugano *et al.*, 2010). A ativação da NPR1 ocorre através da redução de uma forma oligomérica citoplasmática em uma forma monomérica. A forma monomérica é então transferida para o núcleo para a ativação dos PR-genes (Mou *et al.*, 2003). Estudos revelaram que essa proteína regulatória desempenha papéis diferentes na regulação da indução de resistência mediada por SA ou JA/ET (Leon-Reyes *et al.*, 2009). Mutantes do gene *npr1* em *Arabidopsis* foram incapazes de ativar a ISR quando inoculadas com a PGPR *Pseudomonas putida* LSW17S (Ahn *et al.*, 2007). A expressão de PR-genes dependentes de SA é atribuído ao gene *NPR1* que regula positivamente a SAR (Sugano *et al.*, 2010) entretanto, na ISR os genes PR ativados não são os mesmos que são diferencialmente expressos na SAR (Mengiste, 2012; Pieterse *et al.*, 2014).



Pieterse *et al.*, 2002.

Figura 1. Vias de transdução de sinais relacionados com SAR e ISR.

O genoma do arroz possui mais de 100 genes *WRKY*, genes envolvidos na regulação de genes associados à resistência do arroz a *M. oryzae* e/ou *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, genes estes ativados via SA e regulados por NPR1 (Berry *et al.*, 2009; Abbruscato *et al.*, 2012) e também estão envolvidos no equilíbrio entre as respostas de defesa dependentes de JA e SA. A aplicação de *Glomus intraradices*, um fungo formador de micorriza arbuscular em plantas de arroz, ativaram sistemicamente os genes OsNPR1, dependente de SA, e OsJAmyb e OsMPK7, estes últimos dependentes de JA (Campos-Soriano *et al.*, 2012). O gene NPR1 quando ativado via SA, inibe as respostas gênicas desencadeadas via MeJA (metil-jasmonato), interferindo nos octadecanóides, moléculas envolvidas em ISR via JA (Mao *et al.*, 2007). Trabalhos mostram que (ET) media o efeito-cruzado entre MeJA-AS, através de uma interação com NPR1 de uma maneira que varia dependendo da sua concentração (Leon-Reyes *et al.*, 2009). O aumento do ET causado por herbivoria tem sido observado com uma produção simultânea de JA resultando numa elicitação de genes ativados por JA (Diezel

et al., 2009). O contrário disso tem sido proposto: quando patógenos ou herbívoros não induzem um aumento de ET, o ácido salicílico atua inibindo a expressão de genes ativados por JA por mecanismos independentes de NPR1. Mecanismos dependentes ou não de NPR1 que atuam suprimindo as expressões de genes mediados por JA, podem deixar a planta numa condição de suscetibilidade em relação à herbivoria e ao ataque de patógenos necrotróficos (Leon-Reyes *et al.*, 2009). NPR1 são também reguladores, em várias espécies de plantas, dos fatores de transcrição WRKY que estão envolvidos na ativação de SAR via SA. Plantas de arroz geneticamente modificadas que superexpressaram WRKY45 foram resistentes a *X. oryzae* pv. *oryzae* e a *M. oryzae*, patógenos biotróficos e hemibiotróficos respectivamente, entretanto, essas mesmas plantas se mostraram suscetíveis quando inoculadas com o patógeno necrotrófico *Rhizoctonia solani* (Shimono *et al.*, 2012).

Todo mecanismo de resistência que a planta emprega contra um determinado patógeno ou estresse abiótico, é controlado pelo material genético tanto da planta hospedeira quanto do patógeno. O reconhecimento é realizado por produtos dos genes de resistência da planta. A resposta de resistência sistêmica é iniciada quando ocorre o reconhecimento dos indutores químicos e/ou dos microrganismos, patogênicos ou não (Van der Ent *et al.*, 2009). Estes microrganismos são reconhecidos pela planta, majoritariamente, através de componentes da superfície microbiana de suas células, tais como β -1,3-glucana, flagelinas (proteína constituinte de flagelos) e Lipopolissacarídeos (LPS). As plantas possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) desses sinais na sua membrana plasmática que reconhecem essas estruturas microbianas (Faulkner & Robatzek, 2012). Coletivamente, estes componentes reconhecidos pelas plantas são chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a microrganismos (MAMPs) (Schwessinger & Zipfel, 2008; Kishi-Kaboshi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). Quitina (Miya *et al.*, 2007), peptídeo glicano (Wilmann *et al.*, 2011) e fatores de alongação bacterianos (Zipfel *et al.*, 2006) são os padrões moleculares. Os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como peptídeos de plantas ou fragmentos da parede celular produzidos durante ataques de patógenos, são fatores também reconhecidos pelos PRRs (Monaghan & Zipfel, 2012). PAMP são reconhecidas por PRRs em plantas, que por sua vez, engatilham mudanças fisiológicas nas plantas em resposta a este estímulo, resultando numa imunidade ativada por PAMP (PTI – PAMP-triggered immunity). São exemplos de uma resposta PTI o aumento no nível de cálcio e de EROs, bem como a ativação de quinases dependentes de cálcio e proteínas ativadas

por mitógeno (CDPKs e MAPKs, respectivamente), levando a uma reprogramação massiva na transcrição de genes (Boller & Felix, 2009). Essa interação molecular não raro ocorre de uma maneira específica entre cultivar da planta e estirpe do patógeno e é descrita como fator de avirulência (avr) do patógeno que por sua vez é reconhecido por genes de resistência das hospedeiras. A supressão da PTI juntamente com a produção de efetores do patógeno ativa outros mecanismos de defesa da planta. Este fenômeno é conhecido por imunidade ativada por efetores (ETI) (Figura 2). Quando há este reconhecimento, um processo de HR pode ser iniciado (Coll *et al.*, 2010). Vários MAMPs produzidos por microrganismos benéficos como PGPRs têm sido identificados, estando envolvidos no começo de ISR. Quando este estado de indução das plantas é desencadeado por microrganismos, ele recebe o nome de imunidade ativada por MAMP (MTI) (Bakker *et al.*, 2007; Kishi-Kaboshi *et al.*, 2010; Pieterse *et al.*, 2014).

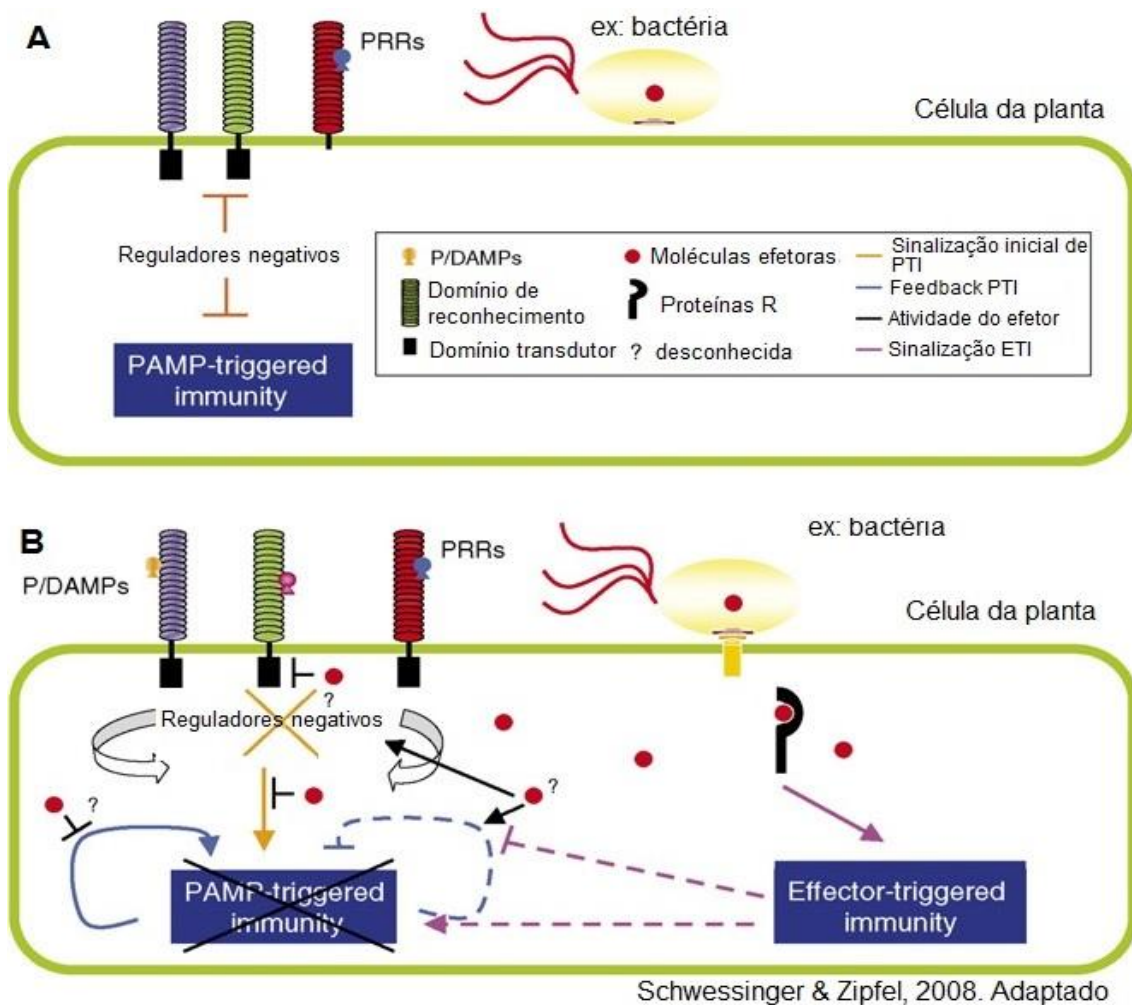


Figura 2. Esquema da ativação da defesa por patógenos - PTI (A) e por efetores - ETI (B).

Trabalhos utilizando mutantes com os sinais de transdução e resposta de defesa defeituosa tem fornecido dados relacionados com a regulação da resistência de várias plantas a diferentes patógenos (Berrocal-Lobo & Molina, 2008). Assim como em outros patossistemas, sabe-se pouco sobre a dinâmica do transcriptoma de defesa da planta de arroz quando induzida. Nos anos 90 e início do século XXI, utilizava-se a tecnologia de *microarray* para análise de expressão gênica via hibridização, identificando simultaneamente vários transcritos e genes diferencialmente expressos, entretanto, é necessário um conhecimento prévio destes genes (Zhu *et al.*, 2013). A tecnologia de *Next-Generation Sequencing* (NGS) fornece uma estratégia eficiente para análise de transcriptomas. O sequenciamento do RNA é uma ferramenta de sequenciamento em larga escala para análises de transcriptomas e, diferente do método de *microarray* que hibridiza os transcritos de interesse, sequencia diretamente os transcritos presentes no material em estudo, sendo essa tecnologia bastante sensível e pode detectar transcritos pouco expressos. Solexa-Illumina[®] e SOLiD-Applied Biosystems são exemplos de plataformas utilizadas em estudos com a tecnologia NGS. A escolha da plataforma NGS depende, por exemplo, da natureza do experimento e do tamanho das sequências a serem sequenciadas (Zhu *et al.*, 2013b; Zhu *et al.*, 2013).

É necessário um melhor conhecimento do papel que os hormônios de defesa SA, JA e ET e outros componentes das vias de defesa desempenham no patossistema *O. sativa-M. oryzae* entendendo o envolvimento destas vias de sinalização a fim de melhor explorar a indução de resistência, aplicando estes conhecimentos em condições de cultivo no campo para o controle sustentável da brusone do arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRUSCATO, P.; NEPUSZ, T.; MIZZI, L.; DEL CORVO, M.; MORANDINI, P.; FUMASONI, I.; MICHEL, C.; PACCANARO, A.; GUIDERDONI, E.; SCHAFFRATH, U.; MOREL, JB.; PIFFANELLI, P. & FAIVRE-RAMPANT, O. 2012. OsWRKY22, a monocot WRKY gene, plays a role in the resistance response to blast. *Molecular Plant Pathology* 13:828-841.
- AGROFIT 2016. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 11 de dez. de 2016.
- ATTARAN, E.; ZEIER, T.E.; GRIEBEL, T. & ZEIER, J. 2009. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* is independent of methyl salicylate production and jasmonate signaling. *Plant Cell*, 21: 954–971.
- BABALOLA, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnological Letters*, 32: 1559–1570.
- BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. & LOON, L.C.V. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97:239–243
- BERRI, S.; ABBRUSCATO, P.; FAIVRE-RAMPANT, O.; BRASILEIRO, A.C.M.; FUMASONI, I.; SATOH, K.; KIKUCHI, S.; MIZZI, L.; MORANDINI, P.; PÈ, M.E. & PIFFANELLI, P. 2009. Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 9:120.
- BERROCAL-LOBO, M. & MOLINA, A. 2008. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science*, 13:145–150.
- BOLLER, T. & FELIX, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60:379-406.

- BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J. 2008. The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72: 104-110.
- CAMEJO, D.; GUZMÁN-CEDEÑO, A. & MORENO, A. 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103:10-23.
- CAMPOS-SORIANO, L.C.; GARCIA-MARTINEZ, J. & SEGUNDO, B.S. 2012. The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular Plant Pathology*, 13: 579-592.
- COLL, N.S.; VERCAMMEN, D.; SMIDLER, A.; CLOVER, C.; VAN BREUSEGEM, F.; DANGL, J.L. & EPPLE, P. 2010. Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science*, 330: 1393-1397.
- CONAB 2015. 2º Levantamento de grãos-Safra 2015/16. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_11_16_15_18_26_safras_nov_2015.pdf. Acesso em: 03 de dezembro de 2015.
- CRUSCIOL, C.A.C.; MAUAD, M.; ALVAREZ, R.C.F.; LIMA, E.V. & TIRITAN, C.S. 2005. Doses de fósforo e crescimento radicular de cultivares de arroz de terras altas. *Bragantia*, 64: 643-649.
- DEAN, R.; VAN KAN, JAL.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M; KAHMANN, R.; ELLIS, J. FOSTER, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414-430.
- DELANEY, T.P.; FRIEDRICH, L. & RYALS, J.A. 1995. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92:6602–6606.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Clima Temperado
Sistemas de Produção, 3 ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica Nov./2005.
Disponível em:
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap11_01>. Acesso em: 07 set. 2013.

FAO 2013. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. Acesso em: 07 de set. de 2013.

FAULKNER, C. & ROBATZEK, S. 2012. Plants and Pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology*, 15: 699-707.

FILIPPI, M.C. & PRABHU, A.S. 2006. Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas. Embrapa. Embrapa Arroz e Feijão (CNPAF), Santo Antônio de Goiás.

FILIPPI, M.C.C., SILVA, G.B., SILVA-LOBO, V.L., CÔRTEZ, M.V.C.B., MORAES, A.J.G., PRABHU, A.S., 2011. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, 58:160-166.

FILIPPI, M.C.C.; SILVA, G.B.; CORTES, M.V.B.; SILVA-LOBO, V.L. & PRABHU, AS. 2012. Indução de resistência e promoção de crescimento em arroz por agentes biológicos. In: RODRIGUES, F.A.; FORTUNATO, A.A. & RESENDE, R.S. (Ed.). Indução de resistência a patógenos: VI Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos na Universidade Federal de Viçosa. Suprema Gráfica e Editora Ltda. Viçosa. p.51-78.

GLAZEBROOK, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43:205–27

IBGE, 2012. Anual Estatístico do Brasil.

- MAPA, 2015. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do agronegócio.
- KHUSH, G.S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* 59:1–6.
- KISHI-KABOSHI, M.; OKADA, K.; KURIMOTO, L.; MURAKAMI, S.; UMEZAWA, T.; SHIBUYA, N.; YAMANE, H.; MIYAO, A.; TAKATSUJI, H.; TAKAHASHI, A. & HIROCHIKA, H. 2010. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *The Plant Journal* 63:599-612.
- KUNSTLER, A.; BACSO, R.; GULLNER, G.; HAFEZ, Y.M. & KIRALY, L. 2016. Staying alive - is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 93:75-84.
- LEON-REYES, A.; SPOEL, S.H., DE LANGE, E.S.; ABE, H.; KOBAYASHI, M.; TSUDA, S.; MILLENAAR, F.F.; WELSCHEN, R.A.; RITSEMA, T. & PIETERSE, C.M. 2009. Ethylene modulates the role of Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiology*. 149: 1797–1809.
- MATILLA, M.A.; RAMOS, J.L.; BAKKER, P.A.H.M.; DOORNBOS, R.; BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. & RAMOS-GONZALES, M.I. 2010. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in Arabidopsis root exudation. *Environmental Microbiology Reports*. 2: 381-388.
- MENGISTE, T. 2012. Plant Immunity to necrotrophs. *Annual Reviews of Phytopathology* 50:267-294.
- MIYA, A.; ALBERT, P.; SHINYA, T.; DESAKI, Y.; ICHIMURA, K.; SHIRASU, K.; NARUSAKA, Y.; KAWAKAMI, N.; KAKU, H. & SHIBUYA, N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in

Arabidopsis. *Proceeds of the National Academy of Science USA*, 104:19613-19618.

MONACO, M.K.; STEIN, J.; NAITHANI, S.; WEI, S.; DHARMAWARDHANA, P.; KUMARI, S.; AMARASINGHE, V.; YOUENS-CLARK, K.; THOMASON, J.; PREECE, J.; PASTERNAK, S.; OLSON, A.; JIAO, Y.; LU, Z.; BOLSER, D.; KERHORNOU, A.; STAINES, D.; BRANDON, W.; WU, G.; D'EUSTACHIO, P.; HAW, R.; CROFT, D.; KERSEY, P.J.; STEIN, L.; JAISWAL, P. & WARE, D. 2013. Gramene 2013: comparative plant genomics resources. *Nucleic Acids Research* 42: 1193–1199.

MONAGHAN, J. & ZIPFEL, C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, 15: 349-357.

MOU, Z.; FAN, W. & DONG, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935–944

OU, S.H. 1980. A look at worldwide rice blast disease control. *Plant Disease*. 64, 439–445.

PARLEVIET, J.E. & ZADOKS, J.C. 1977. The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica*, 26: 5-21.

PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R. & GERRITS, H. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 10: 1571–1580.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; TON, J.; PARCHMANN, S.; MUELLER, M.J.; BUCHALA, A.J.; MÉTRAUX, J.P. & VAN LOON, L.C. 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 123-134.

- PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VAN PELT, J.A; Van LOON, L.C. 2002. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 4:535-544.
- PIETERSE, C.M.J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R.L.; WELLER, D.M.; Van WEES, S.C.M. & BAKKER, P.A.H.M. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52:347-375.
- PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C. & ARAUJO, L.G. 2002. Pathotype diversity of *Pyricularia grisea* from improved upland rice cultivars in experimental plots. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 468-473.
- PRABHU, A.S., FILIPPI, M.C., SILVA, G.B., LOBO, V.L.S., MORAES, O.P., 2009. An unprecedented outbreak of rice blast on a newly released cultivar BRS Colosso in Brazil. In: Wang, G.L., Valente, B. (Eds.), *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer, New York, pp. 257–266.
- RAJ, S.N.; LAVANYA, S.N.; AMRUTHESH, K.N.; NIRANJANA, S.R.; REDDY, M.S. & SHETTY, H.S. 2012. Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Biological Control*, 60:90-102.
- RICHARD, A. & TALBOT, N.J. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology* 7:185-195.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M. & JONES, J.D.G. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49:317-343.
- RUDRAPPA, T.; CZYMMEK, K.J.; PARE, P.W. & BAIS, H.P. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 148:1547–1556.

- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. & PASCHOLATI, S.F. 2008. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P (Eds). Interação planta-patógeno – fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Fealq. Piracicaba. p.227-248.
- SCHWESSINGER, B. & ZIPFEL, C. 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:389–395.
- SHIMONO, M.; KOGA, H.; AKAGI, A.; HYASHI, N.; GOTO, S.; SAWADA, M.; KURIHARA, T.; MATSUSHITA, A.; SUGANO, S.; JIANG, C.J.; KAKU, H.; INOUE, H. & TAKATSUJI, H. 2012. Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Molecular Plant Pathology*, 13:83-94.
- SUGANO, S.; JIANG, C.J.; MIYAZAWA, S.I.; MASUMOTO, C.; YAZAWA, K.; HAYASHI, N.; SHIMONO, M.; NAKAYAMA, A.; MIYAO, M. & TAKATSUJI, H. 2010. Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genome-wide expression analysis. *Plant Molecular Biology* 74:549-562.
- TRUMAN, W.; BENNETT, M.H.; KUBIGSTELTIG, I.; TURNBULL, C. & GRANT, M. 2007. Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104:1075–1080.
- VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S.C.M. & PIETERSE, C.M.J. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, 70:1581-1588.
- VAN LOON, L.C. & VAN STRIEN, E.A. 1999. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiology Molecular Plant Pathology*. 55:85–97.

- VAN LOON, L.C. & BAKKER, P.A.H.M. 2006. Root-associated bacteria inducing systemic resistance. *In: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Plant-Associated Bacteria.* Springer, Dordrecht, p.269–316.
- VERBERNE, M.C.; HOEKSTRA, J.; BOL, J.F. & LINTHORST, H.J.M. 2003. Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant Journal*, 35:27–32.
- VERHAGEN, B.A.S.W.M.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, M.J. 2006. Induced Disease Resistance Signaling in Plants. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 3:334-343.
- WALTERS, D.R.; RATSEP, J.; HAVIS, N.D. 2013. Crontrolling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*. 1-18.
- WILLMANN, R.; LAJUNEN, H.M.; ERBS, G.; NEWMAN, M-A.; KOLB, D.; TSUDA, K.; KATAGIRI, F.; FLIEGMANN, J.; BONO, J-J. & CULLIMORE, J.V. 2011. Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceed of the National Academy of Science USA*, 108:19824-19829.
- WILSON, R.A.; TALBOT, N.J. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews of Microbiology*, 7, 185–195.
- YANG, Z.; MA, H.; HONG, H.; YAO, W.; XIE, W.; XIAO, J.; LI, X. & WANG, S. 2015. Transcriptome-based analysis of mitogen-actived protein kinase cascades in the rice response to *Xanthomonas oryzae* infection. *Rice* 8:4.
- ZHU, Q.H.; STEPHEN, S.; KAZAN, K.; JIN, G.; FAN, L.; TAYLOR, J.; DENNIS, E.S.; HELLIWELL, C.A. & WANG, M.B. 2013. Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in Arabidopsis using RNA-seq. *Gene*, 512:259-266.

ZHU, S.; DAI, Y.M.; ZHANG, X.Y.; YE, J.R.; WANG, M.X. & HUANG, M.R. 2013b. Untangling the transcriptome from fungus-infected plant tissues. *Gene* 519:238-244.

ZHU, Y.J.; QIU, X.; MOORE, P.H.; BORTH, W.; HU, J.; FERREIRA, S. & ALBERT, H.H. 2003. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63:237-248.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J.D.G.; BOLLER, T.; FELIX, G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125: 749-760.

CAPÍTULO 1

Evaluation of rhizobacteria in upland rice in Brazil: growth promotion and induced defense responses interaction against leaf blast (*Magnaporthe oryzae*)

1 **Title:** Evaluation of rhizobacteria in upland rice in Brazil: growth promotion
2 and induced defense responses interaction against leaf blast (*Magnaporthe*
3 *oryzae*)
4

5 **Authors:** Eugenio Miranda Sperandio^a, Helson Mario Martins do Vale^a,
6 Marta Cristina Corsi de Filippi^b, Marcello de Souza Reis^b, Marcio Vinícius de
7 Carvalho Barros Cortes^b, Anna Cristina Lanna^b.
8

9 **Author's affiliation:** ^aDepartamento de Fitopatologia/Instituto de Ciências
10 Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil -
11 70910-900. ^bEmbrapa Rice and Beans, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil -
12 75375-000.
13

14 **Author's emails:** Eugenio Miranda Sperandio
15 (eugeniosperandio@gmail.com), Helson Mario Martins do Vale
16 (helson@unb.br), Marta Cristina Corsi de Filippi
17 (cristina.filippi@embrapa.br), Marcello de Souza Reis
18 (marcellouc@hotmail.com), Marcio Vinícius de Carvalho Barros Cortes
19 (marcio.cortes@embrapa.br), Anna Cristina Lanna (anna.lanna@embrapa.br)
20

21 **To whom correspondence should be addressed:**

22 Helson Mario Martins do Vale
23 Departamento de Fitopatologia/Instituto de Ciências Biológicas
24 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte,
25 Brasília, Distrito Federal, Brasil - 70910-900
26 Email: helson@unb.br
27 Phone: +55(61)31073060
28 Fax: +55(61)31072931
29
30

31 **Abstract**

32 Blast and initial vigor of upland rice plants are the main challenges this crop
33 faces in Brazilian no-tillage systems. The aim was to evaluate the growth
34 promotion and defense responses against *Magnaporthe oryzae* in rice plants
35 treated with rhizobacteria *Bacillus* sp. (BRM 32110) and *Serratia* sp. (BRM
36 32114) and to identify the causes of variance related to induced resistance
37 effectiveness. Seeds of rice were microbiolized, and 14 days after emergence
38 the soil was drenched with rhizobacteria suspensions. Growth promotion was
39 evaluated by root and shoot biomass, root and shoot length, foliar area and
40 nitrate reductase (NR) activity. The defense response was evaluated by
41 quantification of rice blast severity (RBS), disease progress, pathogenesis-
42 related proteins (PRP) activity, and contents of salicylic acid (SA). Length
43 and biomass of roots and shoots and foliar area of plants treated with BRM
44 32114 isolate increased, however, the NR activity was 43% lower, compared
45 to control. Both isolates reduced severity and disease progress. Principal
46 component analyses showed that RBS, β -1,3-glucanase (GLU), Peroxidase
47 (POX) and Phenylalanine ammonia lyase (PAL) were the main sources of the
48 first components of variance, while lipoxygenase (LOX) and SA were the
49 main sources of the second components and were negatively correlated.
50 *Serratia* sp. isolate BRM 32114 can be used as a growth-promoting agent and
51 has potential to induce resistance in rice plants. Results suggest that the
52 interaction among levels and timing of activity of PRPs and the levels of SA
53 play an important role in the defense responses against *M. oryzae*.

54

55 **Keywords:** rice blast, growth-promotion, induced resistance, pathogenesis-
56 related proteins, hormonal cross-talk.

57

58 **1. Introduction**

59

60 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) are beneficial
61 microorganisms that inhabit the soil and actively participate in the nutritional
62 dynamics of the soil. They influence the quality of ecosystems, making them
63 important allies of sustainable agricultural production (Spaepen et al., 2009;
64 Bhattacharya and Jha, 2012). PGPR increases the availability of nutrient

65 synthesizing siderophores, stimulate the growth of roots and shoots
66 (Nascimento et al., 2014) through the production of plant hormones such as
67 auxin, cytokinins and gibberellins (Spaepen et al., 2009), and protect the
68 plants against pathogen attack (Anith et al., 2004; Baysal et al., 2008; Mirik et
69 al., 2008; Filippi et al., 2011).

70 Rhizobacteria act against pathogens through the production of
71 antimicrobial compounds (Bhattacharya and Jha, 2012), competition for
72 space and nutrients, and resistance induction (IR) (Lugtenberg and Kamilova,
73 2009). Contact between the plant and rhizobacteria activates the defense of
74 the plant, which is called induced systemic resistance (ISR) (Kuc, 1982). In
75 ISR, the plant shows increased production of reactive oxygen species (ROS),
76 activity of proteins related to pathogenesis (PRP) and accumulation of
77 phytoalexins as well as callose and lignin deposition in the plant cell wall.
78 Many of these responses are regulated by cross-communication between plant
79 hormones, such as salicylic (SA), jasmonic (JA) acid and their derivatives,
80 and the central roles they play in defense responses (De Vleeschauwer et al.,
81 2013).

82 Rice is one of the most important crops in the world and is a staple
83 food for over half the world's population (Zeigler and Barclay, 2008). The
84 cultivation of upland rice, or aerobic rice, has expanded in Brazil and is
85 growing in global importance due to reduced availability of water resources
86 and increases in industrial and human consumption (Nascente et al., 2011).
87 However, two challenges facing increased upland rice yields are the low
88 response of cultivars to nitrogen fertilization (Nascente et al., 2011; Lanna
89 and Carvalho, 2013) and the high incidence of diseases (Ou, 1987). Rice blast
90 caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* is the major disease affecting this
91 crop and is a huge threat to food security worldwide (Wilson and Talbot,
92 2009; Fisher et al., 2012).

93 A susceptible rice crop may be infected by *M. oryzae* in the vegetative
94 and reproductive phases. In the vegetative stage, the lesions increase in size
95 and number, reducing the photosynthetic area of the plant. The panicles may
96 also be infected, preventing grain filling and causing serious consequences for
97 production (Jeon et al., 2007; Talbot, 2003). When weather conditions are

98 favorable for disease development, losses caused by the blast can reach 100%
99 of the crop, even in cultivars with resistance genes (Prabhu et al., 2009).

100 Although genetic resistance of the host is the most viable and
101 economically practical, it may no longer be effective after a few crop cycles,
102 rapidly being overtaken due to the emergence of new races of pathogens. In a
103 sustainable scenario for agriculture, control of rice blast requires integrated
104 methods for effective and environmentally friendly control by reducing the
105 use of pesticides (Ou, 1980). In this sense, beneficial rhizobacteria emerge as
106 an alternative to agricultural inputs like fertilizers and pesticides for growing
107 rice and allow for a reduction of environmental and health risks (Ahemad and
108 Kibret, 2014).

109 This study aimed to investigate the effect of the PGPRs, BRM 32110
110 and BRM 32114 in growth promotion and leaf blast suppression, to analyze
111 the interactions among relevant variables, and to understand the network of
112 defenses of upland rice plants.

113

114 **2. Material and Methods**

115

116 Two experiments were conducted in order to evaluate growth
117 promotion: one in laboratory and one in greenhouse. The third was conducted
118 in greenhouse and quantified the suppression of leaf blast as a result of
119 increases in the activity of enzymes and hormone levels related to plant
120 defense.

121

122 **2.1. Growth promotion**

123

124 Shoot and root length data were obtained 10 days after sowing, and
125 root and shoot biomass and nitrate reductase activity (NR) were recorded 24
126 days after emergence (DAE). The experimental units were outlined in a
127 randomized complete block design with ten repetitions per treatment. Ten
128 plants per treatment were evaluated.

129

130 **2.1.1. Rhizobacteria BRM 32110 and BRM 32114 suspension**

131

132 Rhizobacteria used in this study were isolated from rhizosphere of rice
133 fields of cultivar BRS Primavera in Paragominas City, PA, Brazil in the first
134 year of planting. These rhizobacteria isolates belonged to the Multifunctional
135 Microorganisms Embrapa Rice and Beans Collection and were labeled as
136 BRM 32110 (*Bacillus* sp.) and BRM 32114 (*Serratia* sp.), GenBank
137 accession numbers KX378746 and KX378747, respectively. An aliquot of 30
138 μL of each PGPR isolate was spread utilizing a Drigalsky handle in Petri
139 dishes containing 523 culture medium (Kado and Heskett, 1970) and
140 incubated at 28°C for 24 h. The bacterial suspension was scratched from
141 plates, suspended in distilled water and adjusted to 600 nm ($A_{600} = 0.1$,
142 corresponding to 10^8 CFU per mL) absorbance.

143 Seeds of upland rice cultivar BRS Primavera were sequentially
144 sterilized with 70% ethanol (for three min) and 2% hypochlorite (for one
145 min), rinsed with sterile and distilled water, dried, microbiolized (dipped in
146 bacterial suspension and shaken - 150 rpm for 24 h) and dried at room
147 temperature prior to planting.

148 The treatments to evaluate growth promotion consisted of seeds
149 microbiolized with BRM 32110 and BRM 32114 plus a negative control
150 (seeds microbiolized with distilled water).

151

152 2.1.2. Length of rice plants

153

154 Rice seeds were sown into 9 ml test tubes containing water-agar (0.8%
155 w/v). Tubes were placed in germination chambers at 28°C and 12-hour
156 photoperiod. The root and shoot length were measured utilizing a caliper ruler
157 ten days after sowing. Ten tubes of each treatment were measured. Each
158 assay tube contained a seed and constituted an experimental unit.

159

160 2.1.3. Root and shoot biomass, foliar area and nitrate reductase activity

161

162 Seeds were sown in plastic trays (15 x 30 x 10 cm) containing 3 kg of
163 fertilized soil (5 g of 5-30-15 NPK mix + 1 g of Zn and 1 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).
164 Three trays were used per treatment. Each tray was composed of eight lines
165 and each line consisted of 10 plants, totaling 80 plants per tray. They were

166 kept under greenhouse conditions (28°C, 60% relative humidity and 12-hour
167 photoperiod).

168 Twenty one days after sowing, ten plant of each treatment were
169 collected. Shoots and roots were removed and washed in running water,
170 separated, placed in envelopes and dried in an oven at 70 °C. After 72 h,
171 samples were weighed, and biomass was quantified. The foliar area was
172 estimated using a digital scanner and performed immediately after collecting
173 the leaves.

174 The determination of NR activity was performed according to
175 Jaworski (1971) methodology with modifications. Fragments of rice leaves of
176 approximately 0.5 cm² were prepared for *in vivo* testing of NR activity. The
177 cut tissue was weighed (50 mg), transferred to microcentrifuge tubes and then
178 added to 750 µL of incubation solution (phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹, pH 7.5,
179 2-propanol (2%, v / v) and potassium nitrate 0.02 mol.L⁻¹). After 35 min of
180 incubation, the samples were taken to a water bath (100 ° C for 5 min) and
181 then cooled. Five hundred microliters of sulfanilamide (1%) and 500 µL of n-
182 naphthyl-ethylenediamine (0.02%) were then added, and the samples were
183 incubated for 20 min. The color intensity of the solution (formation of a pink-
184 colored complex) was measured at 540 nm in a spectrophotometer.
185 Calibration curves were obtained from a standard stock solution (100 µmol.L⁻¹
186 ¹ of NaNO₂). The nitrite (NO₂⁻) content of the leaves was calculated with
187 reference to the calibration graph and plotted from the results obtained with
188 diluted standard solutions containing 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and
189 100 µmol L⁻¹ of NO₂⁻. All treatments were performed in triplicate, and the
190 NR activity was expressed as µmol NO₂ h⁻¹ g⁻¹ FW (fresh weight).

191

192 **2.2. Leaf blast suppression**

193

194 Suspensions of rhizobacteria BRM 32110 and BRM 32114 were
195 obtained according to item 2.1.1. Rice plants were drenched with 100 mL of
196 bacterial suspension 10 DAE. Besides the treatments mentioned in item 2.1.1,
197 new treatments were added: BRM 32110 + *M. oryzae*, BRM 32114 + *M.*
198 *oryzae* and *M. oryzae* (positive control). The experiment was run in a

199 complete randomized block design with ten replicates and the preparation of
200 trays and planting was performed as described in item 2.1.3.

201

202 2.2.1. Challenge inoculation with *Magnaporthe oryzae*, rice blast severity
203 (RBS) assesment and area under the disease progress curve (AUDPC)

204

205 The compatible *M. oryzae* isolate (labeled as 10900) to the cultivar
206 Primavera was obtained from the Microorganism Multifunction Collection of
207 Embrapa Rice and Beans. The fungus was pre-multiplied in PDA (potato-
208 dextrose-agar) and then transferred into petri dishes containing oat medium
209 (oat meal 2%, dextrose 1.5%, agar 1.5% w/v), and incubated under
210 continuous light at 28°C for colony growth. After 10 days of incubation, the
211 mycelium of the grown colony was removed utilizing a sterilized glass rod
212 (Filippi and Prabhu 2001). Next, the plates were maintained in a growth
213 chamber at 28°C and 99% of humidity for 48 hours. The conidia were
214 collected with a paint brush and sterilized water and adjusted to a
215 concentration of 3×10^5 conidia.mL⁻¹ using a hemacytometer (Filippi and
216 Prabhu 2001). Rice plants were challenged in V3 phenological stage (17
217 DAE) by spraying 20 mL of conidial suspension.

218 Thirty six plants of each treatment were previously marked to
219 determine AUDPC. The percentage of leaf area affected by the blast was
220 assessed using a rating scale from 0 to 82% of the leaf area affected
221 (Notteghem (1981). The plants were evaluated at 1, 2, 3, 5 and 7 days post-
222 inoculation (DPI) of *M. oryzae* under controlled greenhouse conditions. The
223 AUDPC was calculated based on the leaf blast severity using the trapezoid
224 formula of disease progress curve with the following equation:

225

$$\sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i-1})/2](t_i - t_{i-1})$$

226

227 where x_i and x_{i-1} are the means of disease severity at time t_i , corresponding to
228 days post-inoculation; t_i and t_{i-1} are consecutive evaluation dates, and $t_i - t_{i-1}$

229 is equal to 1. The total AUDPC represents the sum of AUDPC for all plants
230 evaluated for each treatment.

231

232 2.2.2. Determination of the activity of pathogenesis-related proteins and
233 content of salicylic acid

234

235 The collected of shoots were done at 1, 2 and 3 DPI. Ten shoots per
236 treatment were collected at random to assay the enzymatic activity of
237 pathogenesis-related proteins. They were immediately frozen using liquid
238 nitrogen for subsequent use.

239 Samples were macerated in liquid nitrogen, and the buffer solution
240 (Trish 10 *mM*; NaCl [150 *mM*]; EDTA [2 *mM*]; DTT [2 *mM*]; PMFS [1 *mM*];
241 Leptin [10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]; Aprotinin [10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]) was added to the samples. The
242 content of total soluble proteins in the crude extract was measured according
243 to the methodology of Bradford (1976) with bovine serum albumin (BSA) as
244 the standard.

245 β -1,3-Glucanase activity was measured according to methodology of
246 Pan et al. (1991) by measuring the rate of reducing sugar production using
247 laminarin as the substrate. Dinitrosalicylic acid (DNA) was used as the
248 calorimetric agent. Activity of GLU was expressed in units per milligram of
249 protein ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). One unit of enzymatic activity was defined as the enzyme
250 activity catalyzing the formation of reducing sugar that increases the
251 absorbency of 1 unit of abs per hour.

252 Lipoxygenase activity was determined according to Axelrod et al.
253 (1981) using linolenic acid as substrate. 50 μl of rice shoot extracts were
254 added in 2 mL of linoleic acid solution (10 *mM*) in phosphate buffer (50 *mM*,
255 pH 6.0) (0,1% v/v), at room temperature. The LOX activity was quantified in
256 a spectrophotometer ($\lambda=234$ nm).

257 The activity of phenylalanine ammonia-lyase was measured by adding
258 50 μl of rice shoot extracts from different treatments in 2 mL of
259 phenylalanine solution (10 *mM*) in borate buffer (100 *mM*, pH 9.0). The
260 mixture was homogenized and quantified in a spectrophotometer ($\lambda=290$ nm)
261 (Côrtes et al., 2008).

262 Peroxidase activity was assayed by measuring the rate of 2,2'-azino-
263 bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation, using its own
264 calorimetric property. One unit was defined as the enzyme activity catalyzing
265 the formation of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) that
266 increases the absorbency of 1 unit of abs per hour (Keeseey, 1987).

267 For SA quantification in rice plants, 200 mg of shoots from each
268 treatment were macerated and transferred to microcentrifuge tubes (2 mL).
269 One milliliter of methanol (90%) was added to each well followed by stirring
270 for 1 minute. The samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes and
271 transferred to a 15 ml Falcon tube. One milliliter of methanol, 2 mL of
272 trichloroacetic acid (5%) and 2 mL of ethyl acetate, cyclopentane and
273 isopropanol (50:50:1) were added to each tube. The samples were shaken for
274 1 minute, and the supernatant was transferred to another tube for
275 lyophilization. To each tube was added 200 μ L of methanol (23%) in acetate
276 buffer (pH 5.0, 20 mM), which was filtered using a Millipore minifilter (0.45
277 μ m). The quantification of SA was carried out using HPLC (High
278 Performance Liquid Chromatography) with a 4.8 minute retention time
279 (Saikia et al., 2006; Meher et al., 2012.)

280

281 2.3. Statistical analysis

282

283 Statistical analysis was carried out with software SPSS (version 16.0),
284 and the means were compared with Tukey's test ($p=0.05$).

285 Principal components analysis (PCA) was performed to assess the
286 multivariate effect of each variable related to plant defense responses and
287 disease severity. The PCA tested induced resistance variables (PAL, LOX,
288 GLU, POX, SA) with RBS and DPI. The PCA was performed using Rcmdr
289 and FactormineR packages from 'R' software 2.15 (R Development Core
290 Team, Vienna, Austria).

291

292 3. Results

293

294 3.1. Growth promotion

295

296 Plants treated with *Serratia* sp. isolate BRM 32114 were superior to
297 other treatments in all evaluated parameters. There were increases of 41.9%
298 and 43.4% in root (Fig. 1c) and shoot lengths, respectively, and increases of
299 46.5% in root biomass and 70% in shoot biomass (Table 1) when compared
300 to control treatments. The foliar area was 23.64% greater in rice plants treated
301 with the same isolate. Both PGPR isolates used in this study had no negative
302 effects on seed germination (data not shown). The NR activity on plants
303 treated with the isolates BRM 32114 and BRM 32110 were 43% and 62%,
304 lower than the control, respectively.

305

306 FIG. 1

307 Fig1. Root growth of rice seedling 10 days after planting. Seeds were microbiolized
308 with water (A and D), with isolate BRM 32110 (B and E) and BRM 32114 (C and F)
309 and transferred to test tubes containing water-agar medium (0.8% w/v) (bar = 5 mm).
310

311 3.1. Leaf blast suppression

312

313 The positive control treatment presented 35% of the leaf area affected
314 by blast, which was significantly higher than other treatments (Fig. 2) at 7
315 days after challenge inoculation (Figure 2). The treatment with *Bacillus* sp.
316 isolate BRM 32110 and *Serratia* sp. isolate BRM 32114 reduced the RBS by
317 40% and 35%, respectively, compared to the control (*M. oryzae*).

318

319 FIG. 2

320 **Fig. 2** Area under the disease progress curve (AUDPC) of three different treatments:
321 control (diamond): seeds microbiolized and plants drenched with water only and
322 sprayed inoculated with *M. oryzae* conidial suspension; BRM 32110 (square): seeds
323 microbiolized and plants drenched with BRM 32110 suspension and sprayed
324 inoculated with *M. oryzae* conidial suspension; BRM 32114 (triangle): seeds
325 microbiolized and plants drenched with BRM 32114 suspension and sprayed
326 inoculated with *M. oryzae* conidial suspension. The bars above and below show
327 maximum and minimum values of disease severity, respectively. Curves followed by
328 the same letter are not statistically different by Tukey ($p=0,05$) test.

329

330 3.3. PRPs activity and salicylic acid content in rice plants

331

332 3.3.1. In the absence of *Magnaporthe oryzae*

333

334 There was an increase of GLU activity at 1 and 3 DPI in plants treated
335 with the isolate BRM 32114 and at 2 DPI in plants treated with BRM 32110
336 compared to controls (H₂O). There was no difference in LOX activity among
337 the treatments (Table 2). On the other hand, PAL activity was higher in plants
338 treated with BRM 32110 at 1 DPI. POX activity at 1 DPI was higher in the
339 controls. However, at 2 and 3 DPI, the highest POX activities were observed
340 in BRM32110 and BRM 32114 treated plants, respectively.

341 SA levels were higher in plants treated with BRM 32114 at 1 and 2
342 DPI. The contents of SA were higher in plants treated with BRM 32110 at 3
343 DPI.

344

345 3.3.2. In the presence of *M. oryzae*

346

347 Plants that were induced and challenged with the pathogen (BRM
348 32114 + *M. oryzae* and BRM 32110 + *M. oryzae*), presented higher GLU
349 activity that was significantly different from controls, which were only
350 challenged with *M. oryzae*, on the third day ($p = 0.05$). The LOX activity was
351 higher in plants only challenged with *M. oryzae* in every analysis. However,
352 plants induced with isolate BRM 32114 and challenged by the pathogen
353 showed an increase in LOX activity from the first to the third rated day ($p =$
354 0.05). The control treatment (*M. oryzae*) showed the highest PAL activity in 1
355 DPI. In 2 DPI, the greatest activity was observed in treatment BRM 32110 +
356 *M. oryzae*, while in the 3 DPI, the highest activity was observed in 32114
357 BRM + *M. oryzae* treatment. From 1 to 2 DPI, PAL activity increased
358 significantly in induced and challenged plants (Table 2) as well as in control
359 plants (H₂O). The POX activity was higher in the *M. oryzae* treatment at all
360 times analyzed except in 2 DPI, in which plants that were induced and
361 challenged presented the same level of POX activity than plants that were
362 only challenged. Salicylic acid levels in induced plants were higher than in
363 control plants (H₂O) in each of the three analyses. At 1 DPI, the plants
364 treated with BRM 32110 + *M. oryzae* presented the highest levels of SA.
365 However, over the next days, the plants induced by BRM 32114 and
366 challenged by *M. oryzae* also showed the highest levels of SA.

367 **Table 1.** Length and biomass of roots and shoots, leaf area and Nitrate Reductase activity in leaves of rice plants treated with rhizobacteria BRM 32110 and BRM 32114.

Treatment	Root length ^a	Shoot length ^a	Root biomass ^b	Shoot biomass ^b	Foliar area ^c	Nitrate reductase activity ^d
BRM 32110	70.18 a	43.85 a	33.22 a	92.3 a	11.74 a	0.43 b
BRM 32114	101.23 b	60.8 b	49 b	136.7 b	16.84 c	0.65 b
H ₂ O	71.34 a	42.4 a	33.44 a	80.4 a	13.62 b	1.14 a

368 Mean values (n = 10). Means followed by the same letter are statistically similar, according to Tukey test (p=0,05).

369 ^amm;

370 ^bmg of dry weight;

371 ^ccm²;

372 ^dμmol NaNO₂.h⁻¹.g⁻¹ FW.

373

374 **Table 2.** proteins related to pathogenesis activity of β-1,3-glucanase (Glu), lipoxigenase (LOX), phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POX) and salicylic acid
375 contents (SA), in upland rice plants treated with the rhizobacteria followed, or not, by challenge inoculation with *M. oryzae*

Variables	DPI ^a	Treatments					
		BRM 32114	BRM 32110	H ₂ O	BRM 32114 + <i>M. oryzae</i>	BRM 32110 + <i>M. oryzae</i>	<i>M. oryzae</i>
GLU ^b	1	12.74 bC	9.60 aAB	9.92 bAB	10.41 bB	8.85 bA	9.59 bAB
	2	8.93 aAB	32.57 bC	9.62 aAB	9.00 aAB	7.59 aA	11.71 cB
	3	19.13 cC	7.57 aA	10.15 cB	10.05 bB	8.91 bAB	7.78 aA
LOX ^b	1	13.1x10 ⁻⁵ aAB	10.3x10 ⁻⁵ aAB	22.7x10 ⁻⁵ aB	7.1x10 ⁻⁵ aA	10x10 ⁻⁵ aA	110x10 ⁻⁵ cC
	2	46.5x10 ⁻⁵ cD	12.9x10 ⁻⁵ aBC	48.2x10 ⁻⁵ bD	14.3x10 ⁻⁵ bA	29x10 ⁻⁵ bB	37x10 ⁻⁵ aC
	3	29.3x10 ⁻⁵ bA	60.9x10 ⁻⁵ bBC	58.6x10 ⁻⁵ bB	58.7x10 ⁻⁵ cBC	25x10 ⁻⁵ abA	69x10 ⁻⁵ bC
PAL ^b	1	12x10 ⁻⁵ bB	20.6x10 ⁻⁵ cE	17.2x10 ⁻⁵ aD	10x10 ⁻⁵ aB	5x10 ⁻⁵ aA	13x10 ⁻⁵ bC
	2	23x10 ⁻⁵ cD	5.6x10 ⁻⁵ aA	30.1x10 ⁻⁵ bE	14.4x10 ⁻⁵ bC	25x10 ⁻⁵ cD	9.1x10 ⁻⁵ aB
	3	10.4x10 ⁻⁵ aA	11.6x10 ⁻⁵ bA	40x10 ⁻⁵ cB	12x10 ⁻⁵ aA	11x10 ⁻⁵ bA	12x10 ⁻⁵ bA
POX ^b	1	11.96x10 ⁻² aB	11x22.10 ⁻² aAB	15.23x10 ⁻² bC	12.48x10 ⁻² bB	9.97x10 ⁻² aA	20.91x10 ⁻² cD
	2	12.02x10 ⁻² aB	30.23x10 ⁻² bE	20.52x10 ⁻² cD	10.46x10 ⁻² aA	14x40.10 ⁻² bC	14.65x10 ⁻² aC
	3	26.02x10 ⁻² bD	11.28x10 ⁻² aA	13.11x10 ⁻² aB	13.73x10 ⁻² bB	10.48x10 ⁻² aA	16.73x10 ⁻² bC
SA ^c	1	975.00 cD	881.67 bB	809.33 aA	1040.67 cE	1050.33 cF	906.00 cC
	2	950.00 bD	692.33 aA	938.33 bD	1002.67 bE	846.67 aC	805.67 aB
	3	864.67 aB	897.67 cC	809.33 aA	924.00 aD	867.00 bB	806.00 bA
RBS ^a	-	-	-	-	23 A	21 A	35 B

376 Means followed by the same lowercase letters (column) are statistically similar according to Tukey's test (p = 0.05)

377 .Means followed by the same capital letters (rows) are statistically similar according to the Tukey test (p = 0.05)

378 ^aDPI= days post inoculation.

379 ^b Leaf blast severity was measured according to a rating scale ranging from 0.5 to 82% of the affected. leaf area.
380 ^c U.mg⁻¹, ^c ng.g⁻¹.

381 3.4. Principal component analysis

382

383 The principal component analysis showed that the first two components were
 384 responsible for 47.63% (PCA 1) and 23.65% (PCA 2) of the observed variance, making
 385 a total of 71.28% (Fig. 3). We believe that the first and second components provide
 386 sufficient information to support most of the results obtained. The protein variables
 387 related to the pathogenesis, salicylic acid content and leaf blast severity were
 388 responsible for most of the data variance.

389 The PAL activity was negatively correlated with GLU and POX activity, SA
 390 contents, rice blast severity and days post-inoculation. Much of this variance is
 391 explained by PCA 1. Such correlations indicate that PAL plays a key role in the
 392 metabolic pathways of these defense proteins (GLU and POX) as well as salicylic acid
 393 by getting involved in the early stages of hormone synthesis and in the cascade of
 394 events related to these enzymes. LOX was negatively correlated with SA, indicating that
 395 LOX and SA have antagonistically reciprocal effects upon each other, playing a key
 396 role in the regulation of one another. Both showed a clear influence upon the variance,
 397 and together with the SA, LOX showed a strong association with the second main
 398 component (Table 3).

399

400 FIG. 3

401 **Fig. 3** Principal Component Analyses plot with induced resistance variables investigated for
 402 control of rice blast (*M. oryzae*) by plant growth-promoting rhizobacteria.
 403

404 **Table 3.** Correlation matrix of variables related to induced resistance in rice to control rice blast
 405 (*Magnaporthe oryzae*) by BRM 32114 and BRM 32110 isolates and dimensions of principal
 406 component analysis with significance of $p < 0.05$.

Variables	PCA1	PCA2
Rice blast severity	0,86	NS
Days post inoculation	0,858	NS
B-1,3 Glucanase	0,829	NS
Peroxidase	0,691	NS
Phenylalanine ammonia-lyase	-0,802	NS
Lipoxygenase	NS	0,766
Salicylic acid	NS	-0,875
Explained Variance	47,63%	23,65%
Cumulative Variance	47,63%	71,28%

407 NS = not significant at $p < 0,05$.

408

409 4. Discussion

410

411 The results suggested that the isolate BRM 32114 stimulated the growth of
412 upland rice plants because the length and dry weight of roots and shoots of plants
413 treated with BRM 32114 were higher than in plants treated with BRM 32110 and
414 control conditions (water) (Table 1). The gain in size and plant biomass can be
415 explained due to the characteristics of the isolate 32114 BRM, which synthesizes
416 indoleacetic acid and solubilizes phosphate (Martins, 2015). Some rhizobacteria have
417 the ability to produce a variety of biologically active compounds (enzymes, vitamins,
418 amino acids and plant hormones) that have active stimulating effect on plant growth and
419 development (Larsen et al., 2009; Filippi et al., 2011; Bhattacharya et al., 2012;
420 Dawwam et al., 2013). These results are relevant for agriculture and especially for rice
421 grown in uplands under no-tillage systems with a lower performance and productivity
422 when compared to flooded rice (Nascente et al., 2011). Statistically, there were no
423 significant differences between the NR activities among treatments with rhizobacteria;
424 however, the NR activities were lower than in control plants (Table 1). The NR enzyme
425 catalyzes nitrate reduction to nitrite and represents the first step in the nitrogen
426 assimilation pathway in the form of nitrate ions (NO_3^-) of organic components such as
427 glutamate (Konishi and Yanagisawa 2011; Nemie-Feyissa et al., 2013). The low levels
428 of NR activity in microbiolized and watered plants, especially on the treated plants with
429 BRM 32114, may be attributed to the fact that the presence of rhizobacteria on the
430 medium promoted N supply in the form of ammonium ions (NH_4^+), which would
431 prevent the upland rice plants from expending energy to reduce nitrate. This can be
432 confirmed with growth data because the plants with the lowest NR values were the ones
433 that showed the highest values in the analyzed growth promotion parameters (Table 1).

434 In addition to promoting the growth of plants, PGPRs can help in reducing
435 disease severity because they produce antimicrobial compounds and/or induce
436 resistance mechanisms (Son et al., 2014; Qin et al., 2015). In this study, the
437 development of leaf blast was reduced on the plants treated with rhizobacteria. The
438 disease progression indicates that treatment of the plants with inducer microorganisms
439 enable the plant to react against pathogen invasion by activating defense mechanisms
440 against *M. oryzae* more efficiently than untreated plants. Similar results were also
441 reported in rice plants (Filippi et al., 2011), peppers (Son et al., 2014), chickpeas

442 (Verma et al., 2014) and several other crops (Zaidi et al., 2015), suggesting an inducer
443 role of PGPR in plant defense mechanisms against various diseases.

444 The treatment of plants with rhizobacteria resulted in differences in the levels of
445 PRPs activity and SA content compared to plants that were only challenged with *M.*
446 *oryzae*. The activity of β -1,3-glucanase was higher in plants treated with PGPR and not
447 challenged with the pathogen. This enzyme belongs to the PR2 class from the PRP
448 family and is known to inhibit the mycelial growth of a broad range of fungi (Nishizawa
449 et al., 2003); it also plays a key role in cell division during the passage of cellular
450 materials by plasmodesmata and during flower formation (Balasubramanian et al.,
451 2012). Despite the fact that treatments receiving only rhizobacteria had shown an
452 increase of lytic enzyme activity, in the presence of pathogens, these plants maintained
453 constant GLU activity levels, with a small change occurring during the evaluation
454 period. The activity was not significantly different from the positive control (*M. oryzae*)
455 except at 3 DPI (BRM 32114 + *M. oryzae*).

456 The highest LOX activity was observed at 1 DPI in plants that were only
457 challenged with the pathogen. In the treatment that presented the lowest rates of RBS
458 (BRM 32114 + *M. oryzae*), the increase of LOX activity was gradual and continuous
459 during the measured periods, with the highest level of activity occurring in the last day
460 analyzed (Table 2). Similar results were obtained by Hao et al., (2009) when analyzing
461 defense responses in the same pathosystem. LOX are isoenzymes that catalyze the
462 oxidation of polyunsaturated fatty acids and are the first enzymes activated in the
463 metabolic pathway of the defense hormone jasmonic acid (Wang et al., 2008). This
464 hormone has a key role in plant defense responses against *M. oryzae*, especially in
465 necrotrophic phase of colonization, which happens after penetration and initial phase of
466 colonization (biotrophic) (Dean et al., 2012; De Vleeschauwer et al., 2013).

467 The PAL activity began to increase in the first 48 hours after challenge
468 inoculation at 2 DPI. This is important in defense responses because PAL is the first
469 enzyme of the phenyl-propanoid pathway and has important functions in plants exposed
470 to environmental stresses and pathogen attacks. It is also involved in the synthesis of
471 salicylic acid, phenolics and phytoalexins (Minami et al., 1989).

472 After induction, increases in POX activity were greater in non-challenged plants
473 than in challenged ones. Only at 1 DPI were POX levels higher in the challenged plants
474 (Table 2). The activity of enzymes related to oxidative stress may be modified by the
475 use of rhizobacteria (García-Cristobal et al., 2015), and these differences may be

476 attributed to the interaction between rhizobacteria and upland rice plants (Bais et al.,
477 2006).

478 The leaf blast suppression was observed in rice plants treated with the
479 rhizobacteria, in the form of low disease rates and higher levels of salicylic acid. It is
480 well established that SA plays a key role in signaling of defense mechanisms, in rice
481 and other plants, leading to the increased PRPs activities as well as other biochemical
482 defense responses, such as the accumulation of phenolic compounds and phytoalexins
483 (De Vleeschauwer et al., 2013). In this work, the plants with higher salicylic acid
484 content were not necessarily the plants that presented the higher defense protein
485 activities; however, they had the lowest disease rates.

486 Multivariate analysis showed how induced mechanisms involved in defense
487 responses may contribute to a more effective response against pathogen attacks and thus
488 prevent or lessen the severity of the disease. Isolates of PGPR with the potential for the
489 promotion and induction of resistance of rice against *M. oryzae* have been characterized
490 as inducing pathogenesis-related protein activities (Filippi et al., 2011) and increasing
491 defense hormone levels; however, this analysis becomes more complex because other
492 PRPs are being quantified.

493 PCA analyses allowed for an exploratory interpretation of many variables
494 together as only two components summarized 71.28 % of all data variance. The variable
495 DPI is strongly correlated with increasing disease severity as expected, and with the
496 increase in POX and GLU activities, which may be attributed to the presence of the
497 pathogen and the continued progress of the disease (Figure 2). The PAL activity
498 decreased as the activity of other PRPs in the PCA1 increased. Unlike the PRPs from
499 PCA1, PAL is not an enzyme that acts directly on the pathogen, but rather is a key
500 signal in a number of other metabolic pathways and compounds related to plant defense.

501 Salicylic acid was negatively correlated with LOX (Table 3). This enzyme is the
502 precursor in the jasmonic acid pathway and is one of the most studied examples of
503 cross-talk signals between SA and JA (De Vleeschauwer et al., 2013) pathways where
504 the main interaction between them is antagonistic (Thaler et al., 2012). In rice, SA is
505 predominantly associated with resistance to biotrophic pathogens, while JA is
506 associated with defense responses against necrotrophic pathogens (Pieterse et al., 2009;
507 Robert- Seilaniantz et al., 2011). *M. oryzae* presents two types of colonization and,
508 therefore, is a hemibiotrophic fungus (De Vleeschauwer et al., 2013). The colonization
509 of the plant begins with appressoria formation followed by intercellular colonization in

510 host cells. With the death of the colonized cells, the fungus begins to nourish itself with
511 dead cells, starting the necrotrophic phase of infection (Dean et al., 2012).

512 In the present study, SA levels were higher in plants treated with rhizobacteria
513 and challenged with *M. oryzae* in the first 24 hours and decreased over time, especially
514 for the treatment BRM 32114 + *M. oryzae*. This treatment showed a significant increase
515 in LOX activity on the last evaluation day (3 DPI), suggesting that an increase of JA
516 content occurs when the content of SA diminishes; an alternative is that JA levels might
517 trigger the decrease in SA. This demonstrates how essential SA is in the early hours
518 after onset of infection in this pathosystem and also suggests that other metabolic
519 pathways such as the jasmonates may be associated with defense responses in this
520 pathosystem. These results illustrate the complexity of plant defense responses against
521 pathogen attack and that numerous mechanisms that may be activated in different
522 periods of infection. Identifying joint actions and their interactions may be the best key
523 to understanding the defense mechanisms induced by PGPRs.

524

525 **5. Conclusions**

526

527 Isolate BRM 32114 showed beneficial effects by increasing root and shoot
528 biomass, lengths and foliar area in the upland rice cultivar BRS Primavera. Both PGPR
529 isolates enhanced GLU activity in rice plants. Plants treated with BRM 32114 and
530 challenged with *M. oryzae* presented the highest levels of salicylic acid, indicating that
531 this phytohormone may be used as a biochemical marker to select further resistance
532 inducers in rice.

533 The principal component analysis offered an appropriate approach for indicating
534 the importance of each of the evaluated variables and for establishing the correlation
535 among them during resistance induction.

536

537 **Acknowledgements**

538

539 The authors would like to thank the National Council for Scientific and
540 Technological Development (CNPq) and the Foundation for Research Support of
541 Federal District (FAP-DF) for financial support.

542

543 **References**

- 545 Ahemad, M., Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting
546 rhizobacteria: Current perspective. J. King Saud. Univ. Sci. 26, 1-20.
- 547
- 548 Anith, K.N., Momol, M.T., Kloepper, J.W., Marois, J.J., Olson, S.M., Jones, J.B., 2004.
549 Efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl, and soil
550 amendment for integrated management of bacterial wilt on tomato. Plant. Dis. 86,156–
551 161.
- 552
- 553 Axelrod, B.C., Cheesbrough, T.M., Laasko, S.L., 1981. Lipoxygenase from soybean.
554 Method. Enzymol. 71, 441- 451.
- 555
- 556 Bais, H.P., Weir, L.T., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root
557 exudates in rhizosphere interaction with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant
558 Biol. 57, 233–266.
- 559
- 560 Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., Sakthivel, N., 2012. Plant β -1,3-
561 glucanases: their biological functions and transgenic expression against
562 phytopathogenic fungi. Biotchnol. Lett. 34, 1983-1990.
- 563
- 564 Baysal, Ö., Caliskan, M., Yesilova, Ö., 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus*
565 *subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Physiol.
566 and Mol. Plant Path. 73, 25–32.
- 567
- 568 Bhattacharya, P.N., Jha, D.K., 2012. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR):
569 emergence in agriculture. World J. Microb. Biot. 28, 1327–1350.
- 570
- 571 Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram
572 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72,
573 248–254.
- 574
- 575 Côrtes, M.V.C.B., Viana, H.F., Silva, F.R., Silva-Lobo, V.L., Silva, G.B., Prabhu, A.S.,
576 Filippi, M.C.C., 2008. Quantificação da atividade enzimáticas de proteínas relacionadas
577 à patogênese no patossistema *Oryza sativa/Magnaporthe oryzae*. Embrapa Arroz e
578 Feijão, Santo Antônio de Goiás.
- 579
- 580 Dean, R., Van, Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A.,
581 Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J, Foster, G.D., 2012. The
582 Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant. Pathol. 13, 414-430.
- 583
- 584 Dawwam, G.E., Elbeltagy-Emara A.H.M., Abbas, I.H., Hassan, M.M., 2013. Beneficial
585 effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. Ann.
586 Agri. Sci. 58, 195–201.
- 587
- 588 Filippi, M.C., Prabhu, A.S., 2001. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea*
589 isolates from Brazilian upland rice cultivars. Pesq. Agropec. Bras. 36, 27–35.
- 590
- 591 Filippi, M.C.C., da Silva, G.B., Silva-Lobo, V.L., Côrtes, M.V.C.B., Moraes, A.J.G.,
592 Prabhu, A.S., 2011. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth
593 promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. Biol. Control 58, 160-166.

594
595 Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L.,
596 Gurr, S.J., 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*
597 484, 186–194.
598
599 García-Cristobal, J., García-Villaraco, A., Ramos, B., Gutierrez-Mañero, J., Lucas, J.A.,
600 2015. Priming of pathogenesis related-proteins and enzymes related to oxidative stress
601 by plant growth promoting rhizobacteria on rice plants upon abiotic and biotic stress
602 challenge. *J. Plant Physiol*, 188, 72-79.
603
604 Hao, Z.N., Wang, L.P., Tao, R.X., 2009. Expression patterns of defense genes and
605 antioxidant defence responses in a rice variety that is resistant to leaf blast but
606 susceptible to neck blast. *Physiol. Mol. Plant P.* 74, 167-174.
607
608 Jaworski, E.G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Bioph.*
609 *Res.* 43, 1274-1279.
610
611 Jeon, J., Park, S-Y., Chi, M-H., Choi, J., Park, J., Rho, H-S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S.,
612 Choi, J., Park, J-Y., Yi, M., Yang, S., Kwon, M-J., Han, S-S., Kim, B.R., Khang, C.H.,
613 Park, B., Lim, S-E., Jung, K., Kong, S., Karunakaran, M., Oh, H-S., Kim, H., Kim, S.,
614 Park, J., Kang, S., Choi, W-B., Kang, S., Lee, Y-H., 2007. Genome-wide functional
615 analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genet.* 39, 561–565.
616
617 Kado, C.I., Heskett, M.G., 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
618 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60, 969–
619 976.
620
621 Keesey, J., 1987. *Biochemica Information*. Boehringer Manhein Biochemicals,
622 Indianapolis.
623
624 Konishi, M., Yanagisawa, S., 2011. The regulatory region controlling the nitrate-
625 responsive expression of a nitrate reductase gene, NIA1, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*
626 *Physiol.* 52, 824–36.
627
628 Kuć J., 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32, 54–60.
629
630 Lana, A.C., Carvalho, M.A.F., 2013. Nitrato redutase e sua importância no
631 estabelecimento de plantas de arroz de terras altas. Embrapa Arroz e Feijão, Santo
632 Antônio de Goiás.
633
634 Larsen, J., Cornejo, P., Barea, J.M., 2009. Interactions between the arbuscular
635 mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria
636 *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*.
637 *Soil Biol. Biochem.* 41, 286-292.
638
639 Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev.*
640 *Microbiol.* 63, 541–556.
641

642 Martins, B.E.M, 2015. Caracterização morfológica, bioquímica e molecular de isolados
643 bacterianos antagonistas a *Magnaporthe Oryzae*. Dissertation, Universidade Federal de
644 Goiás, Brasil.

645

646 Meher, H.C., Gajbhite, V.T., Singh, G.A., 2012. Liquid chromatography method for
647 determination of selected amino acids, coenzymes, growth regulators, and vitamins
648 from *Cicer arietinum* (L.) and *Solanum lycopersicum* (L.). Journal AOAC Int. 95, 1142-
649 1152.

650

651 Minami, E.I., Ozeki, Y., Matsuoka, M., Koizuka, N., Tanaka, Y., 1989. Structure and
652 some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants.
653 European J. Biochem. 185, 19-25.

654

655 Mirik, M., Aysan, Y., Cinar, O., 2008. Biological control of bacterial spot disease of
656 pepper with *Bacillus* strains. Turk. J. Agri. For. 32, 381–390.

657

658 Nascente, A.S., Kluthcouski, J., Rabelo, R.R., Oliveira, P., Cobucci, T., Crusciol,
659 C.A.C., 2011. Produtividade do arroz de terras altas em função do manejo do solo e da
660 época de aplicação de nitrogênio. Pesqui. Agropecu. Trop. 41, 60-65.

661

662 Nascimento, F.X., Rossi, M.J., Soares, C.R.F.S., McConkey, B.J., Glick, B.R., 2014.
663 New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny,
664 evolution and ecological significance. PLoS One 9, 1-17.

665

666 Nemie-Feyissa, D., Królicka, A., Forland, N., Hansen, M., Heidari, B., Lillo, C., 2013.
667 Post-translational control of nitrate reductase activity responding to light and
668 photosynthesis evolved already in the early vascular plants. J. Plant Physiol. 170, 662-
669 667.

670

671 Nishizawa, Y., Saruta, M., Nakazono, K., Nishio, Z., Soma, M., Yoshida, T., Nakajima,
672 E., Hibi, T., 2003. Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-
673 inducible β -glucanase gene *Gns1*. Plant Mol. Biol. 51, 143-152.

674

675 Notteghem, J.L., 1981. Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. In:
676 BLAST and upland rice: report and recommendations from the meeting for international
677 collaboration in upland rice improvement. International Rice Research Institute, Los
678 Baños, pp 43-51.

679

680 Ou, S.H., 1987. Rice Diseases 2nd edn. CAB International, Farnham House, Farnham
681 Royal, Slough.

682

683 Ou, S.H., 1980. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. Annu,
684 Rev. Phytopathol. 18, 167-187.

685

686 Pan, S.Q., Ye, X.S., Kuc, J., 1991. Association of a b-1,3-glucanase activity and
687 isoform pattern with systemic resistance to blue mold in tobacco induced by stem
688 injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus.
689 Physio. Mol. Plant. P. 39, 25-39.

690

691 Prabhu, A.S., Filippi, M.C., Silva, G.B., Lobo, V.L.S., Moraes, O.P., 2009. An
692 unprecedented outbreak of rice blast on a newly released cultivar BRS Colosso in
693 Brazil. In: Wang., G.L., Valente, B. (Eds.), Advances in Genetics, Genomics and
694 Control of Rice Blast Disease. Springer, New York, pp 257–266.
695
696 Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009.
697 Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nat. Chem. Biol. 5, 308–
698 316.
699
700 Qin, S., Miao, Q., Feng, W.W., Wang, Y., Zhu, X., Xing, K., Jiang, J.H., 2015.
701 Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria
702 associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. Appl. Soil
703 Ecol. 93, 47-55.
704
705 Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J.D.G., 2011. Hormone crosstalk in plant
706 disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. Annu. Rev.
707 Phytopathol. 49, 317-343.
708
709 Saikia, S., Parker, E.J., Koulman, A., Scott, B., 2006. Four gene products are required
710 for the fungal synthesis of the indole-diterpene, paspaline. FEBS Lett. 580, 1625–1630
711
712 Spaepen, S., Vanderleyden, J., Okon, Y., 2009. Plant growth-promoting actions of
713 rhizobacteria. Adv. Bot. Res. 51, 283–320.
714
715 Son, J.S., Sumayo, M., Hwang, Y.J., Kim, B.S., Ghim, S.Y., 2014. Screening of plant
716 growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot
717 disease in pepper. Appl. Soil Ecol. 72, 1-8.
718
719 Talbot, N.J., 2003. On the trail of a cereal killer: investigating the biology of
720 *Magnaporthe grisea*. Annu. Rev. Microbiol. 57, 177-202.
721
722 Thaler, J.S., Humphrey, P.T., Whiteman, N.K., 2012. Evolution of jasmonate and
723 salicylate signal crosstalk. Trends Plant. Sci. 17, 260-270.
724
725 Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N., Jaiswal, D.K., 2014. Evaluation of plant growth
726 promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of
727 chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. Soil Biol. Biochem. 70, 33-37.
728
729 De Vleeschauwer, D., Gheysen, G., Hofte, M., 2013. Hormone defense networking in
730 rice: tales from a different world. Trends Plant Sci. 18, 555-565.
731
732 Wang, R., Shen, W.B., Liu, L.L., Jiang, L., Liu, Y.Q., Su, N., Wan, J., 2008. A novel
733 lipxygenase gene from developing rice seeds confers dual position specificity and
734 responds to wounding and insect attack. Plant Mol. Biol. 66, 401-414.
735
736 Wilson, R.A., Talbot, N.J., 2009. Under pressure: investigating the biology of plant
737 infection by *Magnaporthe oryzae*. Nat. Rev. Microbiol. 7, 185–195.
738

- 739 Zaidi, A., Ahmad, E., Khan, M.S., Saif, S., Rizvi, A., 2015. Role of plant growth
740 promoting rizhobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective.
741 Sci. Hortic. 195, 231-239.
742
743 Zeigler, R.S., Barclay, A., 2008. The relevance of rice. Rice 1, 3-10.
744

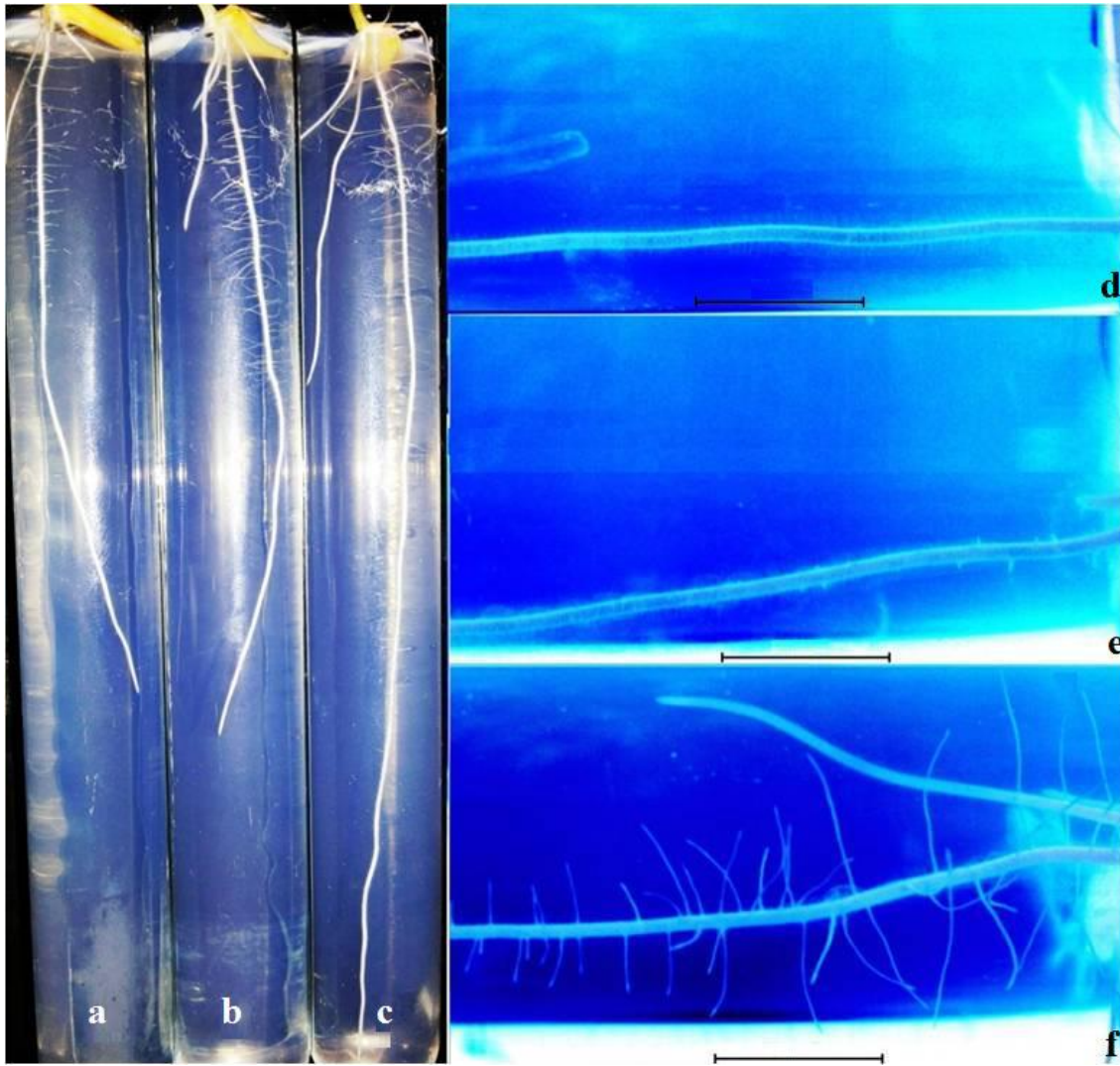


Fig. 1. Root growth of rice seedling 10 days after planting. Seeds were microbialized with water (A and D), with isolates BRM 32110 (B and E) and BRM 32114 (C and F) and transferred to test tubes containing water-agar medium (0.8% w / v) (bar = 5 mm).

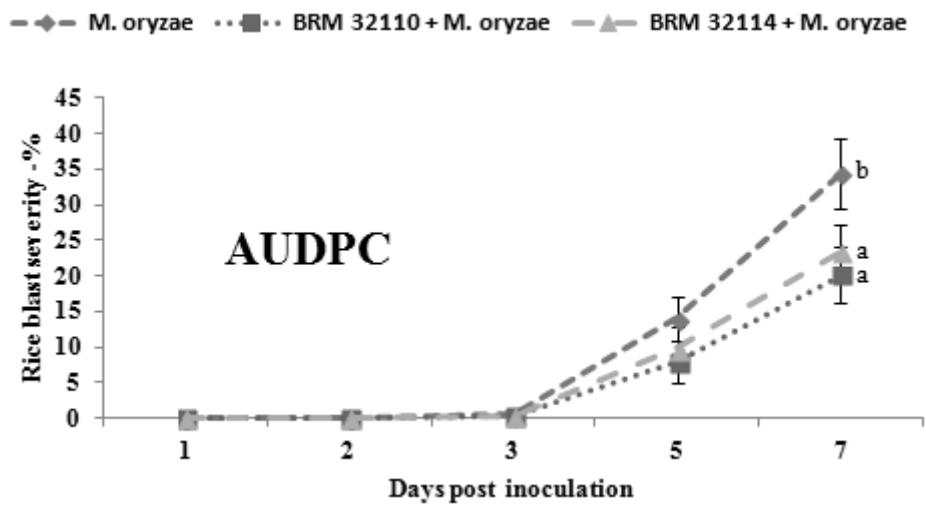


Fig. 2. Area under the disease progress curve (AUDPC) of three different treatments: control (diamond): seeds microbiolized and plants drenched with water only and sprayed inoculated with *M. oryzae* conidial suspension; BRM32110 (square): seeds microbiolized and plants drenched with BRM 32110 suspension and sprayed inoculated with *M. oryzae* conidial suspension; BRM32114 (triangle): seeds microbiolized and plants drenched with BRM 32114 suspension and sprayed inoculated with *M. oryzae* conidial suspension. The bars above and below show maximum and minimum values of disease severity, respectively. Curves followed by the same letter are not statistically different by Tukey ($p=0,05$) test.

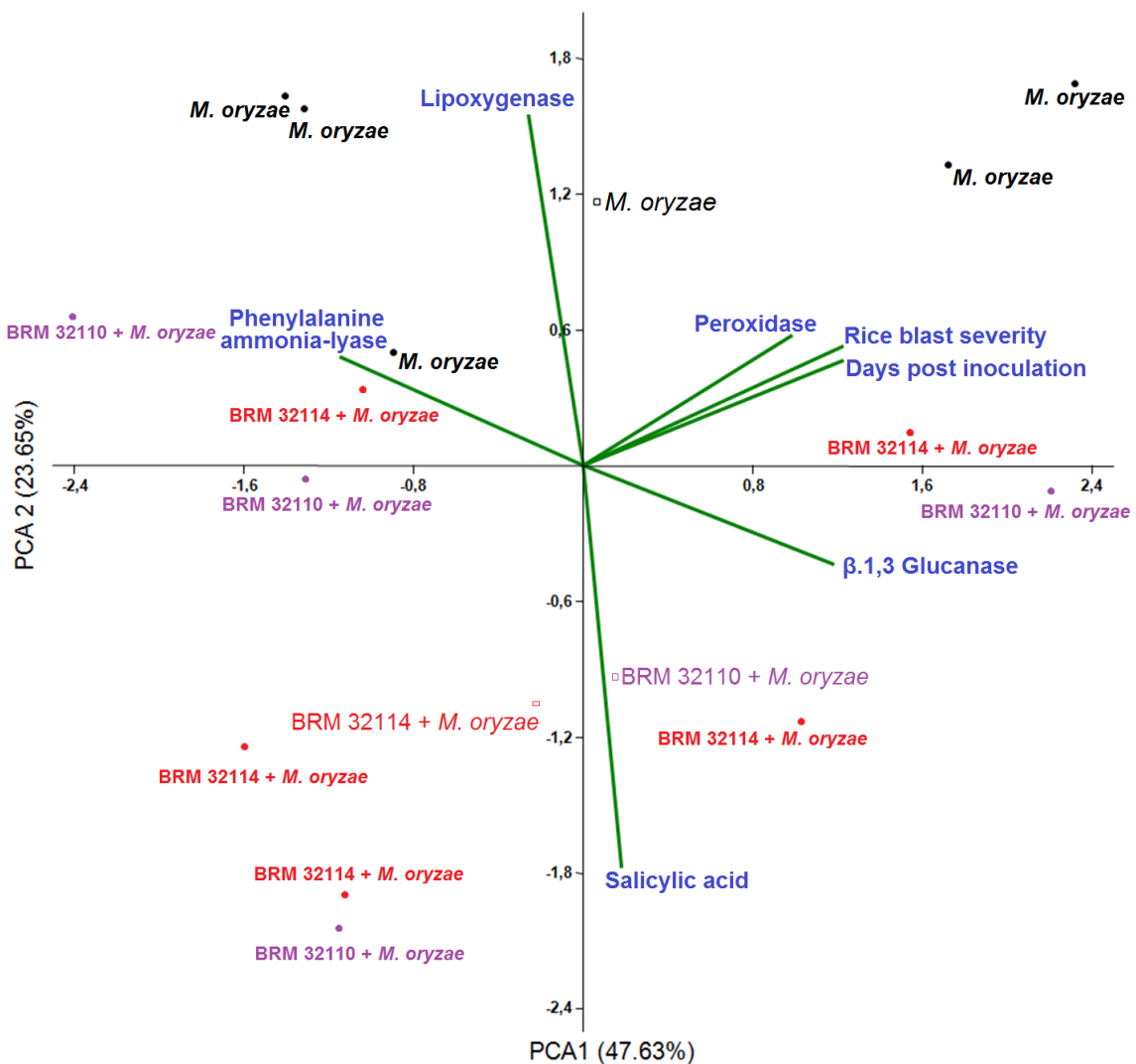


Fig. 3. Principal Component Analyses plot with induced resistance variables investigated for control of rice blast (*M. oryzae*) by plant growth-promoting rhizobacteria.

CAPÍTULO 2

Indução de resistência à brusone foliar em arroz por isolados avirulentos de
Magnaporthe oryzae

Indução de resistência à brusone foliar em arroz por isolados avirulentos de *Magnaporthe oryzae*.

RESUMO

A brusone do arroz é uma doença de difícil controle devido à alta variabilidade genética de *M. oryzae*. A resistência raça-específica é associada com reação de hipersensibilidade e pode induzir respostas de defesa da planta contra patógenos virulentos. O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos de defesa envolvidos na indução de resistência (IR) e a interação dessas respostas de defesa contra *M. oryzae*. Quantificou-se a atividade das proteínas relacionadas à patogênese (PRP) conteúdo de compostos fenólicos (CF), teores de SA, além da identificação de modificações histológicas em plantas de arroz induzidas com *M. oryzae* avirulento (PY10749) e desafiadas com *M. oryzae* virulento (PY10900). Suspensão de conídios de PY10749 foi pulverizado nas folhas da cultivar de BRS Primavera 48 horas antes do desafio com PY10900. Comparadas a testemunha, a severidade de brusone foliar (SBF) foi menor nas plantas induzidas, que apresentaram lesões típicas de reação de hipersensibilidade. As atividades de β -1,3-glucanase (GLU), fenil alanina-amônio liase (PAL) e peroxidase (POX) foram maiores nas plantas induzidas nas primeiras horas após o desafio com PY10900, bem como a quantidade de CF e teor de SA. As variáveis de PRPs bem como CF, SA, dias após a indução (DPI) e SBF foram submetidas uma análise multivariada. A análise de componentes principais (PCA) revelou que GLU, PAL, SA e DPI foram a principal fonte de variância observada no primeiro componente; SBF, POX e PAL no segundo e SBF e CF no terceiro. Esses resultados sugerem que, em interações incompatíveis entre *Oryza sativa*-*M. oryzae*, a atividade GLU é alta nos primeiros dias, decrescendo com o passar o tempo e que os níveis de SA e PAL alternam entre si. SBF foi menor nas plantas com maior atividade de POX e indicam que essa PRP possui papel-chave no desenvolvimento de lesões do tipo RH. As análises de microscopia revelaram que as plantas induzidas responderam de forma rápida ao desafio de *M. oryzae* virulento. Apesar de seus conídios germinarem e formarem apressório, não houve penetração e colonização dos tecidos foliares.

Palavras-chave: Interação incompatível, *Oryza sativa*, reação de hipersensibilidade, resistência sistêmica adquirida.

Induction of resistance in rice against leaf blast resistance by avirulent isolate of *Magnaporthe oryzae*.

ABSTRACT

Rice blast is a disease of difficult control due to the high genetic variability of the pathogen. Race-specific resistance is associated with sensitivity reaction and may induce plant defense responses against virulent pathogens. The goal of this work was to study the defense mechanisms involved in the induction of resistance (IR) through the quantification of pathogenesis proteins related (PRP), phenolic compounds content (CF), level of salicylic acid (SA) and to observe modifications at the cellular level in plants induced by avirulent *M. oryzae* (PY10749) and challenged with virulent isolate (PY10900). Suspension of PY10749 conidia was sprayed on the BRS Primavera rice cultivar 48 hours prior to challenge with PY10900. Compared to the control, the leaf blast severity (SBF) was lower in the induced plants, which presented lesions typical of the hypersensitivity reaction. β -1,3-Glucanase (GLU), phenylalanine ammonium-lyase (PAL) and peroxidase (POX) activities were higher in the plants induced during the first hours after challenge with PY10900, as well as the amount of CF and SA content. The variables of PRPs as well as CF, SA, days after induction (DPI) and SBF were submitted to a multivariate analysis. Principal component analysis (PCA) revealed that GLU, PAL, SA and DPI were the main source of variance observed in the first component; SBF, POX and PAL in the second and SBF and CF in the third. These results suggest that in incompatible interactions between *Oryza sativa*-*M. oryzae*, GLU activity is high in the early days, decreasing over time, and that SA and PAL levels alternate with each other. SBF was lower in plants with higher POX activity and indicate that this PRP has a key role in HR mediated by PY10749. Microscopy analysis revealed that the induced plants responded rapidly to the challenge of virulent *M. oryzae*. Although its conidia germinated and formed appressoria, there was no penetration and colonization of the foliar tissues.

Key words: Incompatible reaction, hypersensitivity reaction, *Oryza sativa*, systemic acquired resistance.

1. INTRODUÇÃO

Uma característica do sistema imune em eucariotos é a habilidade de reconhecer patógenos invasores e mobilizar apropriadamente as respostas de defesas. As plantas são capazes de defenderem-se de uma ampla gama de patógenos por meio de mecanismos sofisticados de reconhecimento e sinalização (Spoel & Dong, 2012). Durante a interação planta-patógeno, a primeira linha de defesa da planta é seu sistema de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e a microrganismos (MAMP) que confere resistência basal por meio da imunidade ativada por PAMP (PTI) (Faulkner & Robatzek, 2012). Se o sistema de reconhecimento dos MAMPs falharem contra microrganismos patogênicos, a segunda linha de defesa é induzida (PTI). Esta é uma resistência específica entre a cultivar da hospedeira e a raça do patógeno, entretanto, com o aparecimento de novas raças do patógeno esse tipo de resistência pode ser quebrada (Dang *et al.*, 2012) o que acontece com frequência com *Magnaporthe oryzae*, fungo causador da brusone do arroz (Dean *et al.*, 2012). A imunidade ativada por efetores (ETI) é um tipo de resistência a doenças que as plantas ativam quando seus genes de resistência (R) reconhecem, direta ou indiretamente, um produto específico de genes do patógeno, também chamado de efector, codificado por gene(s) de avirulência (Avr) (Kunstler *et al.*, 2016). Tanto em PTI quanto em ETI, o resultado do reconhecimento do patógeno é ativação de respostas de defesas que podem desencadear entre outros mecanismos, reação de hipersensibilidade (HR), que é uma forma de morte celular programada que restringe o patógeno no sítio de infecção, o que leva ao aparecimento de pontoações castanhas visíveis a olho nú (Tsuda & Katagiri, 2010).

Como resultado do reconhecimento dos patógenos pelas plantas, a HR desencadeia em cascata uma série de respostas de defesa. Ela induz sinais celulares e bioquímicos, que ativa outras respostas de defesa que incluem fluxos de íons, indução de cascata de sinais de proteínas quinases, explosão oxidativa, aumento de hormônios elicitores como ácido jasmônico, estimulam metabolismo secundário com a produção de compostos fenólicos e fitoalexinas e aumentam a expressão de genes relacionados a patogênese, que estão envolvidos na produção de proteínas relacionadas a patogênese (Daymi *et al.*, 2016; Kunstler *et al.*, 2016). Essa sequência de modificações, juntamente com respostas estruturais de defesa como deposição de lignina, formação de papilas e deposição de calose, estão relacionadas com a restrição do patógeno ao sítio de

penetração, impedindo a colonização das células e tecidos da planta pelo patógeno por meio da formação de barreias mecânicas ao crescimento do fungo.

A brusone do arroz é uma das doenças mais graves do mundo, sendo de difícil controle, reduzindo a produção anual de arroz entre 10 e 30% (Strange & Scott, 2005). Vários genes de resistência a *M. oryzae* foram identificados (Monaco *et al.*, 2013) e muitos deles foram clonados, entretanto, a maioria dos genes R conferem resistência à um ou poucos isolados devido a sua especificidade com a raça do patógeno, não protegendo a planta contra outras raças deste fungo. Tanto nos casos de compatibilidade como de incompatibilidade, a expressão de respostas de defesa depende da eficiência do reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro (Filippi *et al.*, 2007). Investigar a interação entre *M. oryzae-Oryza sativa*, bem como a interação entre as respostas de defesa da planta são pontos fundamentais para identificar medidas alternativas para o controle da brusone.

Neste sentido, o uso de isolados avirulentos para induzir respostas de defesa pode ser uma ferramenta importante para entender os mecanismos envolvidos na indução de resistência e representa uma estratégia inteligente na busca de novas fontes de resistência a brusone, assim conferindo uma ampla resistência contra não só outros isolados de *M. oryzae*, mas também contra outros patógenos do arroz.

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de indução de resistência em plantas de arroz utilizando isolados avirulentos de *M. oryzae*, observando as respostas de defesa bioquímicas e em nível histológico pelas plantas de arroz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção de isolados de *Magnaporthe oryzae*

Vinte e três isolados de *M. oryzae* foram utilizados para teste de virulência, foram eles: 4145, 4285, 4287, 4327, 4330, 4355, 4377, 4378, 4382, 4389, 4466, 4651, 10723, 10731, 10749, 10771, 10786, 10885, 10893, e 10900. Esses isolados pertencem a Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão e foram obtidos de monospóricos feitos a partir de lesões esporulativas de folhas. A virulência dos isolados foi testada utilizando dezesseis cultivares diferenciadoras, oito cultivares comerciais nacionais de arroz de terras altas (Carajás, Confiança, Maravilha, Primavera, Progresso, Caiapó, IAC 47 e IAC 201) e oito cultivares internacionais (Raminad, Zenith, NP 125, Usen, Dular, Kanto S1, STT e Caloro). Sementes de cada cultivar foram plantadas em linhas em bandejas de plástico (30x15x10 cm) contendo 3 Kg de solo adubado (FTE 1g/ kg solo, Zn 1g/2 kg e NPK - 5/30/15g/kg), e mantidas em condições de 60% de umidade e temperatura de média de 25 °C em casa de vegetação. Foram semeadas em média 10 sementes por cultivar. Os isolados de *M. oryzae* foram reativados em meio BDA e multiplicado em placas de Petri contendo meio de Aveia (50g de aveia, 10g dextrose, 15g ágar, 1L água), durante 10 dias a 28 °C. A conidiogênese foi estimulada com a remoção do micélio aéreo, feito com o auxílio de um bastão de vidro, e as placas expostas a luz contínua, sob alta umidade, durante 48 horas. Os conídios foram coletados com água destilada e esterilizada, a suspensão foi ajustada a 3×10^5 conídios.mL⁻¹ seguindo o método de Filippi & Prabhu, 2001, e pulverizada nas folhas em plantas, 21 dias após a semeadura. Uma bandeja com as mesmas cultivares inoculadas com água foi utilizada como controle e/ou detecção de contaminação. A severidade de brusone foliar foi avaliada sete dias após a inoculação desafiadora utilizando uma escala que varia de 0 a 9 do *International Rice Research Institute* (1988) que leva em consideração o tipo de lesão, onde plantas com lesões de 0, 1 e 3 são consideradas resistente (reação incompatível) e 4 a 9 como suscetível (compatível).

2.2. Plantio cultivar BRS Primavera

Sementes de arroz BRS Primavera foram esterilizadas com soluções de álcool 70% e hipoclorito de sódio e plantadas em bandejas com 3 kg de solo adubado (FTE 1g/

kg solo, Zn 1g/2 kg e NPK - 5/30/15g/kg), e mantidas em condições de 60% de umidade e temperatura média de 25 °C em casa de vegetação. Cada bandeja possui oito sulcos, com 10 plantas em cada.

2.3. Indução de resistência usando isolado avirulento de *M. oryzae*

O Isolado avirulento de *M. oryzae* proveniente da coleção de microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão foi selecionado com base nos critérios descritos no tópico anterior. Ele foi reativado em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) e multiplicado em placas de Petri com meio de aveia (aveia 2%, 1,5% ágar, p/v), durante 10 dias a 28 °C. A produção de conídios foi estimulada com a remoção do micélio aéreo da colônia de *M. oryzae*. Os conídios foram coletados com água destilada e esterilizada e 48 após, a suspensão será ajustada a 3×10^5 conídios.mL⁻¹ (Filippi & Prabhu, 2001) e inoculadas na cultivar de arroz Primavera 19 dias após a semeadura. A porcentagem de área foliar afetada pela brusone foi quantificada usando uma escala de notas (0-82% de área foliar afetada) de acordo com Notteghem (1981). As plantas foram avaliadas durante uma semana após a inoculação de *M. oryzae* em condições de casa de vegetação.

2.4. Desafio com *M. oryzae*

O isolado virulento PY10900 de *M. oryzae* proveniente da coleção de microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão foi cultivado nas mesmas condições de crescimento que o isolado avirulento, bem como os ajustes de concentração. A suspensão de conídios foi inoculada em cultivares primavera com 21 dias após o plantio. As plantas foram marcadas para obter-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC - *area under the disease progress curve*) e a porcentagem de área foliar afetada pela brusone foi medida usando uma escala de notas (0,5 a 82% de área foliar afetada) de acordo com Notteghem (1981). As plantas foram avaliadas no 1°, 2°, 3°, 5° e 7° dia após a inoculação de *M. oryzae* em condições de casa de vegetação.

2.5. Desenho experimental

O delineamento realizado foi de blocos ao acaso (DBC). Os tratamentos foram: testemunha *M. oryzae* avirulento (AVR), testemunha - *M. oryzae* virulento (VIR); plantas induzidas com isolado AVR e desafiadas com VIR (AVR + VIR) e controle negativo (H₂O). Foram utilizadas três bandejas por tratamento.

2.6. Determinação da atividade das enzimas β -1,3 glucanase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase, quantificação de compostos fenólicos e ácido salicílico em plantas de arroz

A fim de detectar propriamente o estado de *priming* nas plantas, os valores das variáveis em questão foram checados também nos seus respectivos controles (plantas não-desafiadas com isolado virulento PY10900) tendo assim valores da atividade das respectivas enzimas, tanto em plantas induzidas, induzidas e desafiadas e plantas não induzidas e não desafiadas (H₂O), para comparações e detecção de atividades significativamente superior. Plantas tratadas apenas com *M. oryzae* foram utilizadas como testemunhas e plantas tratadas com H₂O como controle negativo. As coletas foram feitas em 1, 2, 3, 5, 7 e 9 DPI. Toda parte aérea da planta foi coletada, dez plantas por tratamento, e então acondicionadas em caixas de gelo e congeladas (-20 °C) para uso posterior.

Extração de proteínas

As amostras da parte aérea das plantas de arroz foram maceradas em nitrogênio líquido e em cada amostra foi adicionado solução-tampão (Tris-HCl 10 mM; NaCl [150 mM]; EDTA [2 mM]; DTT [2 mM]; PMFS [1 mM]; Leptina [10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]; Aprotinina [10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]). Em seguida, as amostras foram agitadas num vortex durante 1 minuto e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar as proteínas solúveis totais e nos ensaios de determinação de atividade enzimática. Cinquenta μL de cada amostra foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf acrescentando 1000 μL de CBB (comoassie brilliant blue). As amostras foram homogeneizadas e colocadas em repouso durante 15 minutos. Após, transferiu-se 100 μL para placas de Elisa as quais foram colocadas em espectrofotômetro (λ 597 nm). O conteúdo de proteínas solúveis totais no extrato bruto foi medido de acordo com o método de Bradford (1976), com albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

β -1,3-Glucanase (EC 3.2.1.39) (GLU)

Utilizou-se a metodologia descrita por Pan *et al.*, (1991) com algumas modificações. Atividade de GLU em extrato proteico de folhas de arroz de diferentes tratamentos foram avaliados pela medição da taxa de redução de açúcar utilizando laminarina como substrato. O reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) foi usado como

agente colorimétrico. A atividade foi expressa em unidades por miligrama de proteína ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como atividade enzimática catalisando a formação de açúcares redutores que aumenta a absorvância de uma unidade por hora.

Peroxidase (EC 1.11.1.7) (POX)

A atividade de peroxidase foi quantificada por meio da medição do nível de oxidação de 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) usando suas próprias atividades colorimétricas, onde a coloração fica mais intensa a medida que a reação acontece. Uma unidade foi definida como atividade enzimática catalisando a formação de 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) que aumenta a absorvância de uma unidade por hora (Keeseey, 1987).

Fenilalanina Amônia-liase (EC 4.3.1.24) (PAL)

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada, utilizando 2 ml de solução de fenilalanina 10 mM, em solução tampão borato 0,1 M, pH 9,0 e 50 μl de cada amostra, em triplicata. A mistura foi homogeneizada e submetida à quantificação em espectrofotômetro, em comprimento de onda 290 nm (ultravioleta) (Côrtes et al., 2008).

Compostos Fenólicos (CF)

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada segundo a metodologia de Dicko *et al.* (2002). A parte aérea das plantas de arroz foram coletadas para quantificação dos compostos fenólicos. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido após a coleta. As plantas foram maceradas com auxílio de cadinhos e pistilos até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Trezentos microlitros dos compostos fenólicos solúveis foram colocados em 1500 μL de metanol 70% e, após levá-las ao sonicador por 30 minutos, as amostras foram filtradas com auxílio de algodão. O ensaio foi feito em triplicata por cada amostra onde 120 μL do extrato foi misturado com 220 μL de H_2O milli-Q e 200 μL de Folin-Ciocalteu. Após 5 min de incubação foi adicionado solução de Na_2CO_3 a 20% e 600 μL de H_2O milli-Q. A mistura foi incubada por 30 min a temperatura ambiente e a leitura foi feita em espectrofotômetro numa absorvância de 720 nm.

Ácido Salicílico (SA)

Para quantificação de AS nas plantas de arroz, 200 mg da parte aérea de cada tratamento foram maceradas e transferidas para microtubos (2 mL). Em cada microtubo foi adicionado 1 mL de metanol (90%), seguido de agitação em agitador, por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas, a 5000 rpm por 10 minutos, e transferidas para um tubo falcon, de 15 mL. Adicionou-se em cada tubo, 1 mL de metanol PA e 2 mL de ácido tricloroacético (5%), e 2 mL de acetato de etila, ciclopentano e isopropanol (50:50:1). As amostras foram agitadas em agitador por 1 minuto, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo para liofilização. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 200 µL de metanol (23%), em tampão acetato (20 µmol pH 5,0), que foram filtradas em minifiltro milipore (0,45 µm). A quantificação de ácido salicílico foi realizada em um aparelho de cromatografia líquida HPLC (High Performance Liquid Chromatography) apresentando tempo de retenção de 4,8 minutos (Saikia *et al.*, 2006; Meher *et al.*, 2012).

2.7. Microscopia das folhas de arroz tratadas com isolado avirulento de *M. oryzae*

Observação de estruturas de penetração via microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As folhas de arroz foram coletadas no primeiro e segundo dia após o desafio com o patógeno virulento (3 e 4DPI, respectivamente). Fragmentos de aproximadamente 1 centímetro das folhas foram utilizados para MEV. Esses fragmentos foram fixados em glutamina 2,5% (p/v) por 24 horas. Após, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,05M e submetidas a desidratação etanólica seriada de 30%, 40%, 50%, 60% e 70% durante cinco minutos cada série. A secagem das amostras foi feita na condição de ponto crítico com CO₂. Os fragmentos foram colocados em *stubs* para metalização, sendo cobertas com ouro para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura.

Microscopia de luz de estruturas fúngicas de colonização

A colonização a nível anatômico foi observado por meio de microscopia de luz. Folhas de arroz inoculadas com isolados avirulento de *M. oryzae* PY10749 foram coletadas no quinto dia após a inoculação desafiadora com o isolado virulento PY 10900. Para a caracterização anatômica das folhas de arroz, foram realizadas secções transversais nas folhas à mão livre com auxílio de lâmina de aço e suporte de isopor.

Em seguida os fragmentos foram imersos em azul de astra 0,3% e fucsina básica 0,1% (3:1) (KRAUS *et al.*, 1998). As secções foram montadas entre lâmina e lamínula com solução de glicerina hidratada a 50%. Os resultados foram analisados e documentados em microscópico óptico (Leica[®] DM500) acoplado à câmara fotográfica Leica[®] ICC50, usando a versão 1.8.1 do software LAD EZ (Leica[®] Alemanha).

2.8. Análise estatística

Análise univariada

Os dados SBF, GLU, PAL, POX, CF e AS foram avaliados utilizando uma análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p=0.05$).

Análise multivariada

Análise de componentes principais (PCA) reuniu as variáveis relacionadas com as respostas de defesa da planta e severidade de doença. A PCA foi realizada utilizando os pacotes Rcmdr e FactoMineR, ambos do software 'R' 2.15 (R Development Core Team, Vienna, Austria). Essa análise foi feita utilizando tanto os efeitos multivariados das variáveis de indução de resistência (PAL, GLU, PO, AS) quanto as variáveis de doença (severidade e DPI).

3. RESULTADOS

3.1. Quantificação de doença

3.1.1. Seleção de isolados de *M. oryzae*

Os isolados de *M. oryzae* PY10749 e PY10900, foram os isolados avirulentos e virulentos selecionados para os ensaios realizados neste trabalho, respectivamente. O isolado de *M. oryzae* PY10749 foi escolhido pelo fato de desencadear lesões nas plantas do tipo RH e o isolado PY10900 por causar lesões grandes e esporulativas. Além desses resultados, ambos isolados apresentam boa esporulação e rápido crescimento em meio de aveia (dados não mostrados).

TABELA 1- Reação de cultivares a inoculação com diferentes isolados de *M. oryzae*. Os números são referentes ao tipo de lesão.

Isolado <i>M. oryzae</i>	Cultivar															
	Carajás	Confiança	Maravilha	Primavera	Progresso	Caiapó	IAC 47	IAC 201	Raminad	Zenith	NP 125	Usen	Dular	Kanto 51	SST	Caloro
4145	0	0	0	3	1	0	0	0	1	0	3	5	0	5	9	9
4285	0	1	1	5	1	0	1	0	0	1	5	5	5	9	9	5
4287	0	0	0	5	0	0	1	0	0	0	7	5	3	5	9	7
4327	3	1	0	5	0	0	0	0	0	0	5	5	3	7	7	7
4330	0	0	0	7	0	0	0	0	1	0	3	5	3	7	9	7
4355	0	0	0	7	0	0	5	1	0	0	5	5	3	7	9	9
4377	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	3	5	1	5	7	7
4378	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	9	9
4382	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0	3	3	0	5	7	7
4389	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	3	1	7	9	9
4466	0	0	0	5	0	0	1	3	1	3	3	5	1	7	9	5
4651	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	5	5
10723	1	1	1	1	0	3	7	5	0	1	0	9	3	1	7	9
10731	1	1	0	0	0	1	5	5	1	1	5	9	3	0	5	9
10749	3	3	1	1	1	0	5	5	1	5	5	9	1	0	5	9
10771	0	0	0	5	1	3	3	1	0	1	3	1	5	5	3	7
10786	3	5	5	5	7	1	3	1	0	5	5	9	9	9	9	9
10885	0	1	0	1	5	0	1	1	0	3	1	7	0	0	3	0
10893	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	5	5	0	0	5	0
10900	3	5	5	7	7	1	3	1	0	5	5	9	9	9	9	9

Plantas com 0, 1 e 3 são consideradas resistente (reação incompatível) e 4 a 9 como suscetível.

3.1.2. Indução de resistência e supressão de brusone foliar

Dentre os isolados *M. oryzae* utilizados nos testes para selecionar indivíduos avirulentos e virulentos por meio das cultivares diferenciadoras, foi escolhido o isolado de *M. oryzae* PY10749 como agente indutor, visto que apresentou reação incompatível com a cultivar BRS Primavera, portanto avirulento, e o isolado PY10900 como *M. oryzae* virulento. Nas plantas de arroz suscetíveis à brusone induzidas com isolado avirulento de *M. oryzae*, os sintomas típicos apareceram entre 48 e 72 horas após a indução (dados não mostrados), com lesões de reação de hipersensibilidade (Figura 1A e 1B). As lesões nas plantas induzidas com o isolado avirulento PY10749 e desafiado com PY10900 (1C) foram semelhantes àsquelas encontradas nas plantas quando somente induzidas, não havendo diferenças estatísticas entre estes tratamentos e, quando comparadas com a testemunha, a redução foi maior que 90%. Já nas testemunhas, onde o tratamento foi apenas o desafio com o patógeno virulento (PY10900), a infecção progrediu e as lesões típicas da doença (Figura 1D) atingiu 30% da área foliar afetada (Tabela 1).

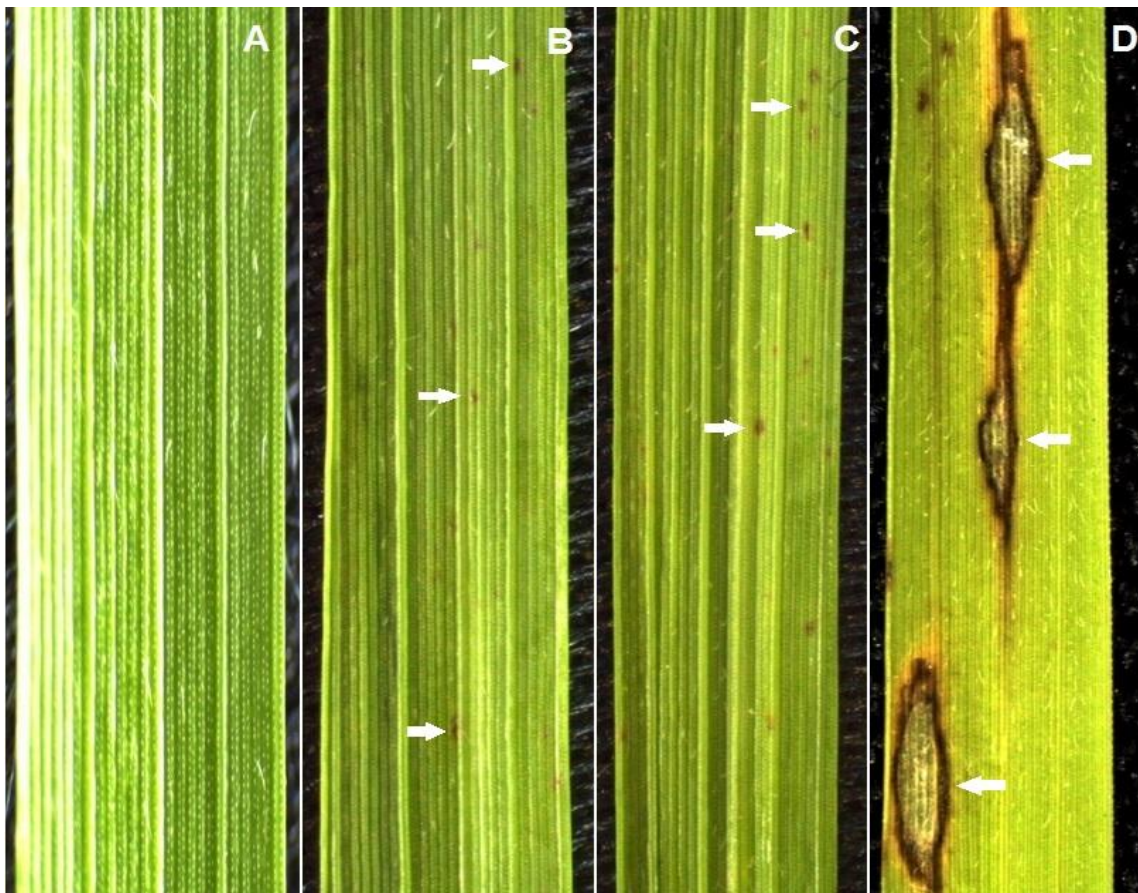


FIGURA 1- Severidade de brusone foliar em folhas de arroz. Plantas controle (A), induzidas com PY10749 (B), induzidas com PY10749 e desafiadas com PY10900 (C) e testemunha PY10900 (D). Setas indicam sintomas de RH em B e C e lesões desenvolvidas e esporulativas em D.

3.2. Atividades das enzimas relacionadas com a defesa da planta, e quantificação dos compostos fenólicos e teores de ácido salicílico

Plantas tratadas apenas com o isolado avirulento de *M. oryzae*

A atividade de GLU em plantas induzidas foi maior em todos os dias avaliados quando comparados com o controle (H₂O), exceto no 4 DPI (Tabela 2). Quando comparada com o controle, a atividade de PAL em plantas induzidas foi maior apenas no 4DPI e mostrou um aumento nos dois primeiros dias avaliados, entretanto decresceu no 3 DPI, oscilando nos outros tempos amostrados. A atividade de POX apresentou um aumento nas primeiras 48hs após a indução, com os maiores valores nas plantas induzidas com o isolado avirulento no 2DPI. A concentração de compostos fenólicos (CF) decresceram no controle e permaneceu constante nas plantas induzidas, aumentando apenas no 4DPI e 9DPI. Os teores de SA foram maiores nas plantas induzidas nos dois primeiros dias avaliados apresentando um aumento constante até o 3DPI, oscilando nos dias seguintes. A concentração de SA também aumentou do 1 ao 3DPI no controle, reduzindo sua concentração de forma significativa nos dias subsequentes.

Tabela 2. Atividade de proteínas relacionadas à patogênese β -1,3 glucanase (GLU), fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX). e concentração de compostos fenólicos (CF), teor de ácido salicílico (SA) e severidade de brusone foliar em plantas de arroz de terras altas tratadas com os isolado avirulento seguidas ou não de inoculação desafiante com isolado de *M. oryzae* PY10900 virulento.

		TRATAMENTO								
		DPI ^a	H2O		PY10749 AVR		AVR+VIR		PY10900 VIR	
GLU ^b	1		33,59	c	39,44		b			
	2		29,67	bc	37,61		b			
	3		28,08	abA	59,67	dC	38,75	cB	27,78	aA
	4		50,93	eB	30,02	aA	27,44	abA	31,82	abA
	5		23,39	abA	31,27	aB	26,07	aA	30,13	abB
	7		30,04	bcA	38,32	bB	31,55	bA	32,65	abA
	9		40,18	dA	49,54	cB	50,42	dB	36,08	bA
PAL ^b	1		2,05E-05	ab	1,41E-05		c			
	2		6,07E-05	d	4,35E-05		e			
	3		2,03E-05	abC	3,84E-06	aA	7,18E-06	aB	8,78E-06	aC
	4		1,58E-05	aA	3,14E-05	dC	2,96E-05	eC	2,60E-05	cB
	5		2,24E-05	bB	1,28E-05	bcA	2,00E-05	cB	1,61E-05	bA
	7		3,29E-05	cC	1,09E-05	bA	1,42E-05	bA	2,07E-05	bcB
	9		6,33E-05	dC	3,37E-05	dA	2,54E-05	dA	4,79E-05	dB
POX ^b	1		0,329	b	1,145		d			
	2		1,444	f	2,256		e			
	3		1,030	eD	0,744	bcB	0,398	aC	0,259	aA
	4		0,883	dC	0,744	bcB	0,351	aA	0,404	bA
	5		0,193	aA	0,342	aC	0,409	aD	0,288	aB

	7	0,350	bA	0,530	abB	0,368	aA	0,309	aA
	9	0,701	cB	1,080	cdC	0,678	bB	0,382	bA
CF ^c	1	10,59	cd	8,04	a				
	2	7,21	ab	8,99	ab				
	3	4,84	aA	9,33	abB	9,07	bB	8,44	aB
	4	7,31	abA	11,31	bB	5,91	aA	10,08	bB
	5	9,00	cB	7,00	aA	6,57	aA	7,51	aA
	7	9,96	cdBC	9,22	abAB	8,42	bA	10,76	bC
	9	12,30	dB	11,60	bB	9,04	bA	11,63	bB
SA ^d	1	918,67	c	962,67	d				
	2	845,33	a	880,67	c				
	3	1125,67	eD	1088,00	fC	1065,67	cB	990,67	cA
	4	1048,33	dD	866,67	bA	904,00	bB	961,67	bC
	5	861,33	bC	885,33	cD	794,00	aA	809,33	aB
	7	926,00	cC	747,00	aA	911,33	bB	1041,00	dD
	9	1127,00	eD	1005,00	eA	1113,00	dC	1032,67	dB
SBF ^e	0			0,5	A	0,6875	A	29,5	B

Médias seguidas por letras minúsculas (colunas) iguais não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p=0,05$).

Médias seguidas por letras maiúsculas (rows) iguais na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p=0,05$).

^a DPI= "days post induction".

^b U.mg⁻¹

^c µg de ácido gálico.mL de extrato⁻¹

^d ng.g⁻¹.

^e Severidade de brusone foliar foi medida seguindo uma escala de notas que varia de 0,5 até 82% de área foliar afetada.

Plantas tratadas com o isolado avirulento e desafiadas com isolado virulento de *M. oryzae* (PY10900)

A atividade das proteínas relacionadas à patogênese, concentração de compostos fenólicos e teores de SA foram significativamente influenciadas pelo tratamento com o isolado avirulento bem como pelo desafio com o patógeno virulento, variando na sua quantidade por miligrama de peso fresco. A atividade de GLU foi maior no tratamento induzido com isolado avirulento nas primeiras 24 após o desafio quando comparado com a testemunha. A atividade declinou nos 3 dias seguintes voltando a aumentar e atingindo seu maior valor no último dia avaliado (5DPI). Os valores de PAL apresentaram maior atividade na testemunha no 3, 7 e 9 DPI, e nas plantas induzidas e desafiadas no 2 e 3 DPI. Em folhas das plantas controles e nas plantas induzidas, o concentração de compostos fenólicos foi maior no controle no 1DPI e nas plantas induzidas no 2 DPI. De acordo com os resultados de cromatografia, nas plantas induzidas e desafiadas, a média de componentes fenólicos mostrou um pico de concentração no 3DPI (24hs após o desafio) com valor de $9,07 \text{ mg.FW}^{-1}$, não diferenciando estatisticamente da testemunha, que apresentou concentração de compostos fenólicos maiores no 4, 7 e 9DPI (Tabela 2). A enzima POX mostrou uma maior atividade nas plantas induzidas do que na testemunha já no 1DPI e, excetuando o 2DPI, manteve esse comportamento nos demais tempos analisados, com valor no tratamento onde as plantas foram induzidas, com pico de atividade verificado no 9DPI. No primeiro dia após o desafio, o teor de SA foi maior nas plantas induzidas com o isolado avirulento, entretanto, no dias subsequentes o teor foi menor quando comparado aos valores encontrados na testemunha, aumentando no 9 DPI.

3.3. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de PCA mostrou que juntos, os três primeiros componentes explicaram 87,87% da variância observada, com valores de 47,987%, 22,658% e 17,225%, como demonstrado pela tabela 2. Visto que somados o primeiro e o segundo componentes da PCA, mais de 70% da variância observada foi explicada, os resultados e a discussão será realizada em cima dos valores apresentados por esses dois primeiros componentes. Em relação às variáveis analisadas, o hormônio SA, os dias após a indução (DPI) foram responsáveis por grande parte das variâncias nos dados. Entre as PRPs avaliadas, GLU foi a que apresentou maior influência na variância. Além dessa, POX e PAL, ambas PRP, mostraram grande atuação na variância observada no segundo componente.

Ácido salicílico e GLU foram negativamente correlacionadas com DPI (Tabela 3). Essa correlação indica que essas três respostas de defesa foram maiores no início do processo de indução, decrescendo seus níveis com o passar do tempo (Figura 2; Tabela 3). PAL também foi negativamente correlacionada com SA, sugerindo possuir um papel chave na atividade desse hormônio na planta. A atividade de POX mostrou uma forte correlação com a severidade de brusone foliar, onde os tratamentos que apresentaram os maiores níveis dessa enzima foram os que mostraram uma menor área foliar lesionada.

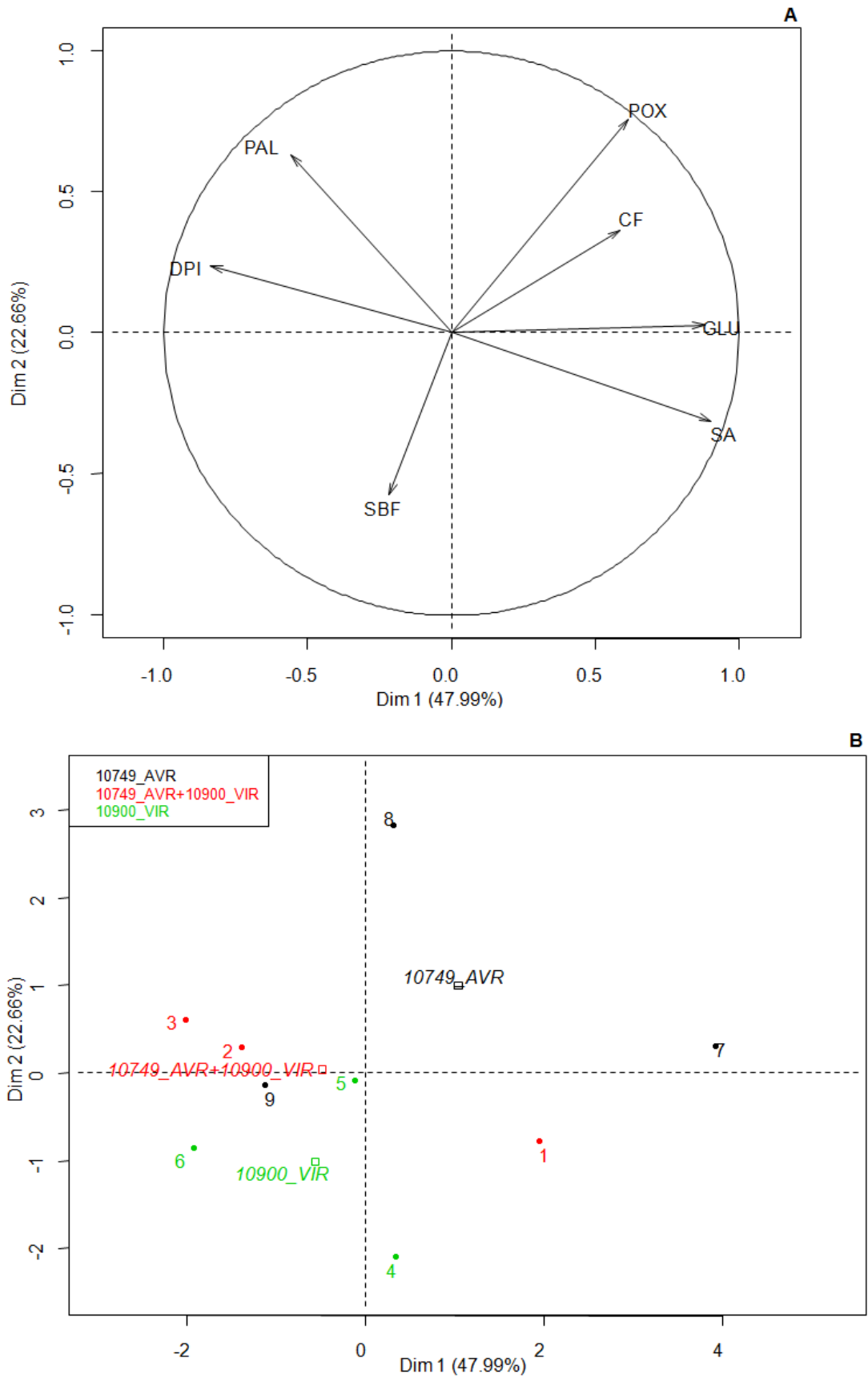


Figura 2 - PCA biplot com variáveis de investigadas na indução de resistência de plantas de arroz com isolado avirulento de *M. oryzae* de acordo com os dois primeiros componentes. A-correlação entre as variáveis; B-distribuição dos dados.

Tabela3. Matriz de correlação das variáveis relacionadas a indução de resistência em arroz para controle da brusone foliar (*Magnaporthe oryzae*) por isolado de *M. oryzae* avirulento (PY10749) e dimensões da análise de componentes principais com significância de $p < 0.05$.

Variáveis	PCA1	PCA2	PCA3
Rice blast severity	NS	-0.574	0.716
Days post induction	-0.835	NS	NS
B-1,3 Glucanase	0.877	NS	NS
Peroxidase	NS	0.758	NS
Phenylalanine ammonia-lyase	-0.557	0.629	NS
Phenolic compounds	NS	NS	0.668
Salicylic acid	0.903	NS	NS
Explained Variance	47,99%	22,66%	17,22%
Cumulative Variance	47,99%	70,65%	87,87%

NS = não significante a $p < 0,05$.

3.4. Colonização de tecidos foliares de arroz cv. Primavera por *Magnaporthe oryzae*

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de folhas de arroz

Nas folhas de arroz da cultivar suscetível induzidas com isolado PY10749 e desafiadas com o isolado virulento PY10900, bem como nas plantas apenas desafiada com o patógeno virulento, foram observados conídios germinados com a formação de apressórios formados e melanizados. Como ilustrado pela MEV (Figura 3), 24 horas após o desafio, o conídio estava murcho e o apressório não estavam mais túrgidos, apresentando-se murchos, indicando que houve sucesso na penetração dos tecidos foliares, possibilitando o desenvolvimento da infecção. Mesmo nas plantas induzidas previamente com o isolado avirulento, conídios do isolado PY10900 germinaram e formaram apressório melanizado, entretanto, mesmo 48 horas após o desafio (4DPI), os apressórios observados permaneceram túrgidos, indicando que não houve penetração na folha e conseqüentemente a colonização dos tecidos do mesófilo foliar não aconteceu (Figura 4). Figura 5 representa as plantas- controle (H₂O).

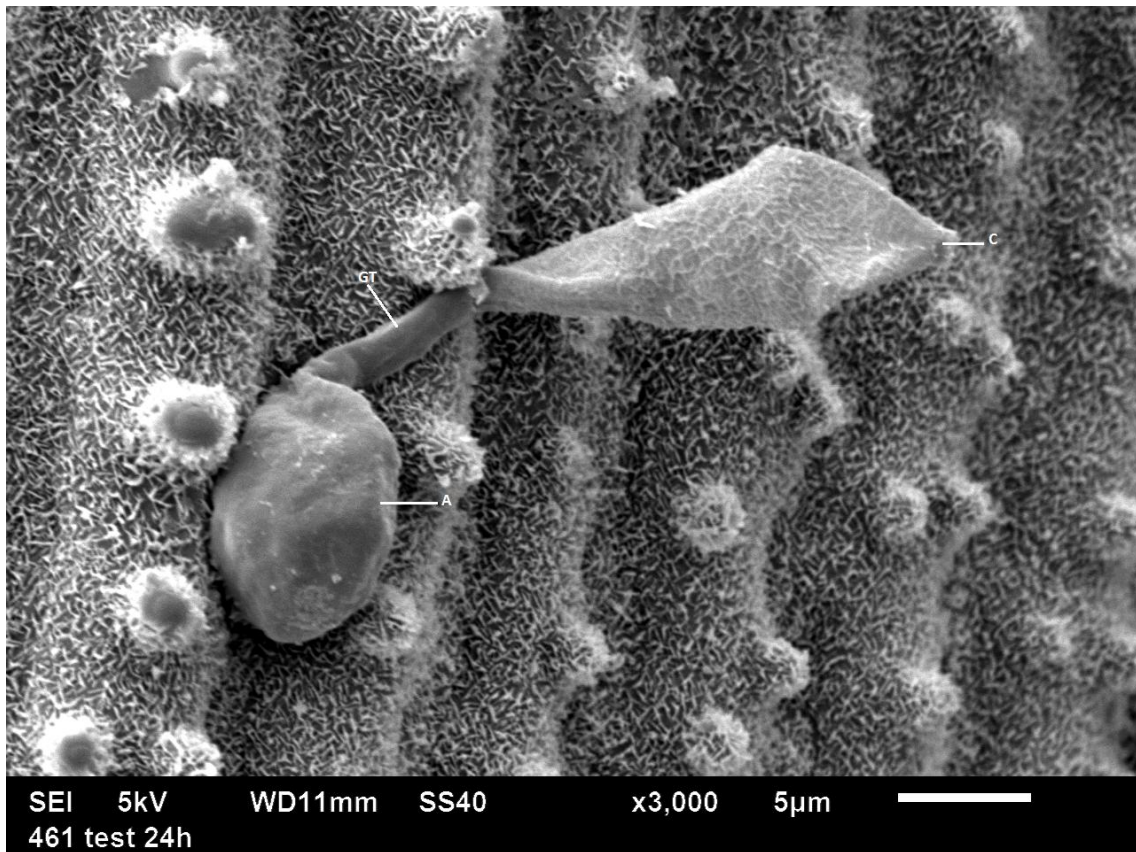


Figura 3 - Observação de microscopia eletrônica de varredura. Folha de arroz inoculada com isolado de *Magnaporthe oryzae* virulento PY10900 24h após o desafio (3DPI). A: apressório; GT: tubo germinativo; C: conídio.

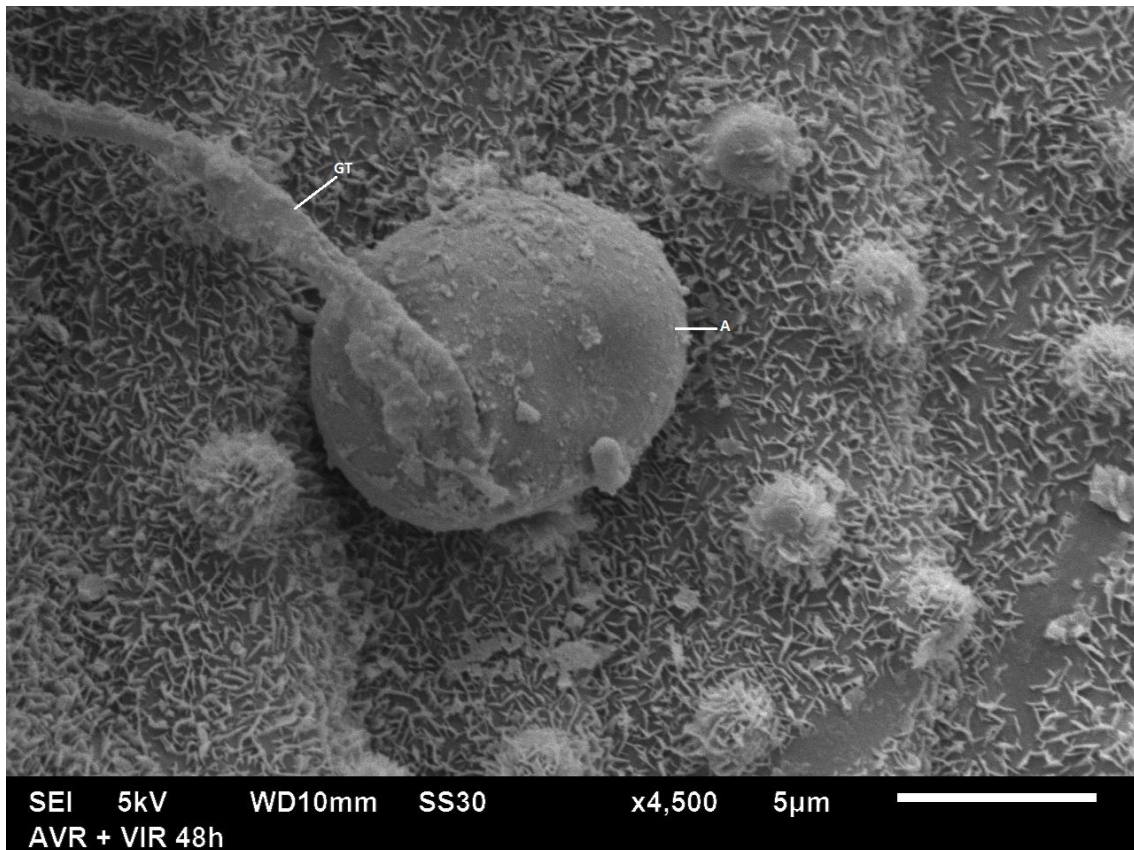


Figura 4 - Observação de microscopia eletrônica de varredura. Folha de arroz induzida com isolado avirulento PY10749 e inoculada com *Magnaporthe oryzae* virulento 48h após o desafio (4DPI). A: apressório; GT: tubo germinativo.

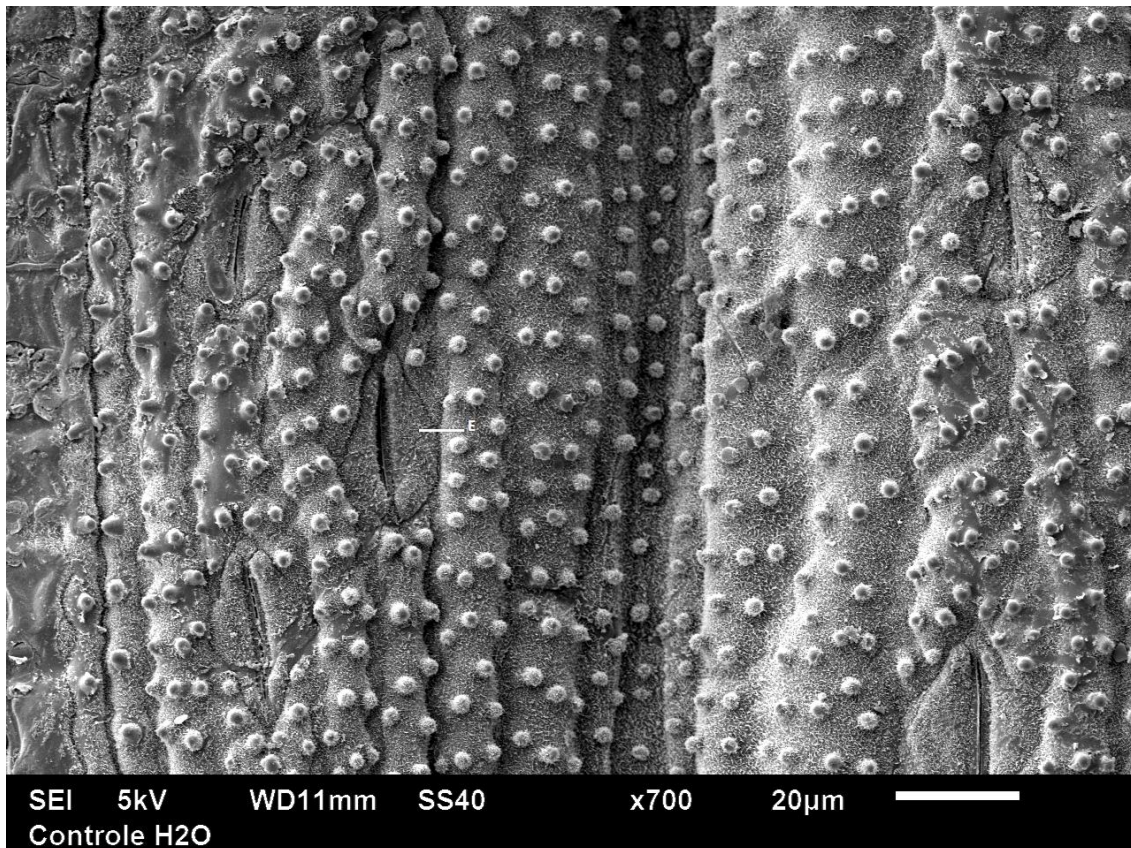


Figura 5 - Observação de microscopia eletrônica de varredura de folha de arroz tratadas com H₂O (controle). E: estômato.

Microscopia ótica de luz

Os cortes transversais das folhas de arroz mostraram uma das respostas citológicas de defesas das plantas foi o aparecimento de células com sinais de RH (reconhecidas pela cor castanha) observadas nos sítios de infecção. Nas células adjacentes àquelas com RH, foi observado o acúmulo do conteúdo citoplasmático em vesículas (Figura 6). Essas estruturas também foram observadas nas plantas que foram apenas induzidas com isolado avirulento PY10749 (Figura7) Nas plantas utilizadas como testemunha, o fungo iniciou causou a morte do tecido foliar (Figura 8). Nessa fase, verifica-se a formação de estruturas esporulativas (conidióforos e conídios) no centro das lesões (Figura 1D). Nessas plantas também foi observado o aparecimento do conteúdo citoplasmáticos em vacúolos de células circunvizinhas àquelas infectadas, mas essas respostas não foram efetivas para deter o crescimento fúngico nos tecidos foliares. Algumas células mortas dos tecidos colonizados estavam plasmolisadas, com evidente diminuição do volume celular, com a membrana plasmática retraída e distante da

parede celular, sendo que muitas dessas paredes estavam também degradadas (Figura 8).

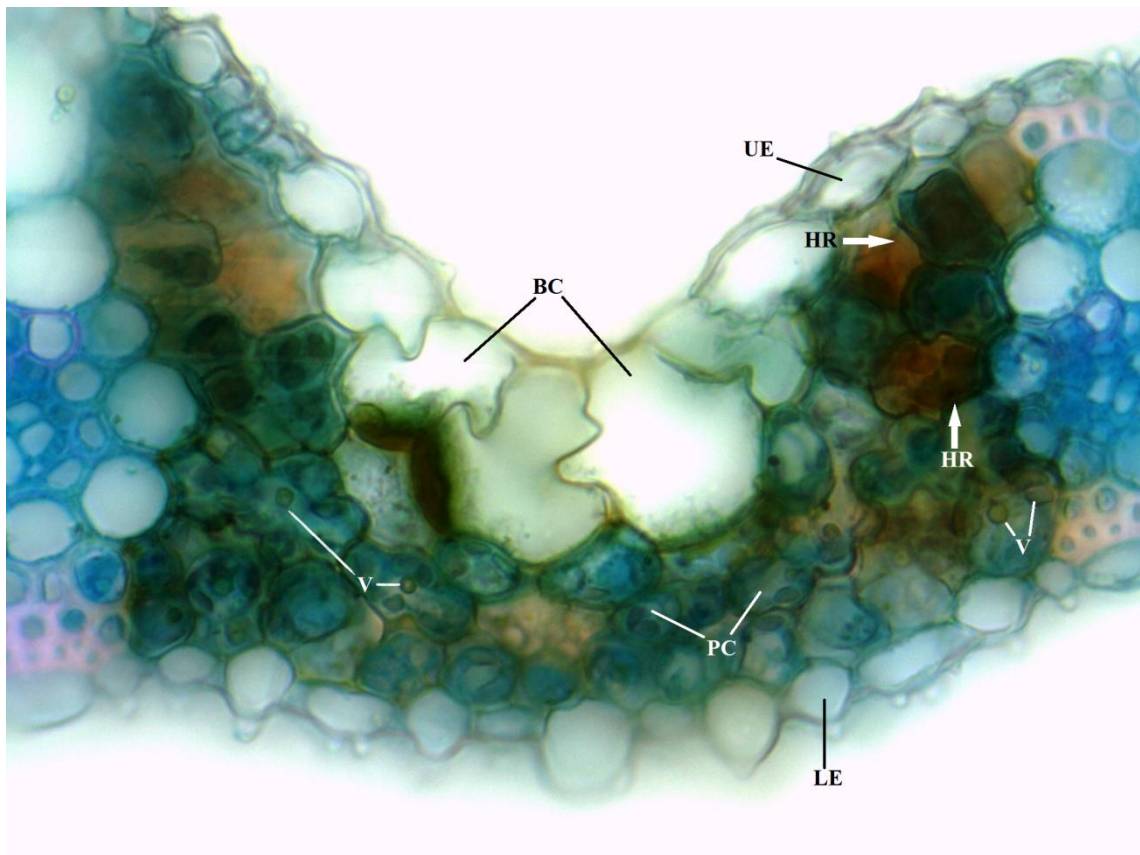


Figura 6 - Microscopia óptica de luz em plantas de arroz. Corte transversal de folhas de plantas induzidas com *M. oryzae* avirulento (PY10749) e desafiadas 48hs após com *M. oryzae* virulento (PY10900). BC: células buliformes; UE: epiderme superior; LE: epiderme inferior; PC: parênquima clorofiliano; V: vesículas com conteúdo citoplasmático; HR: reação de hipersensibilidade - células mortas.

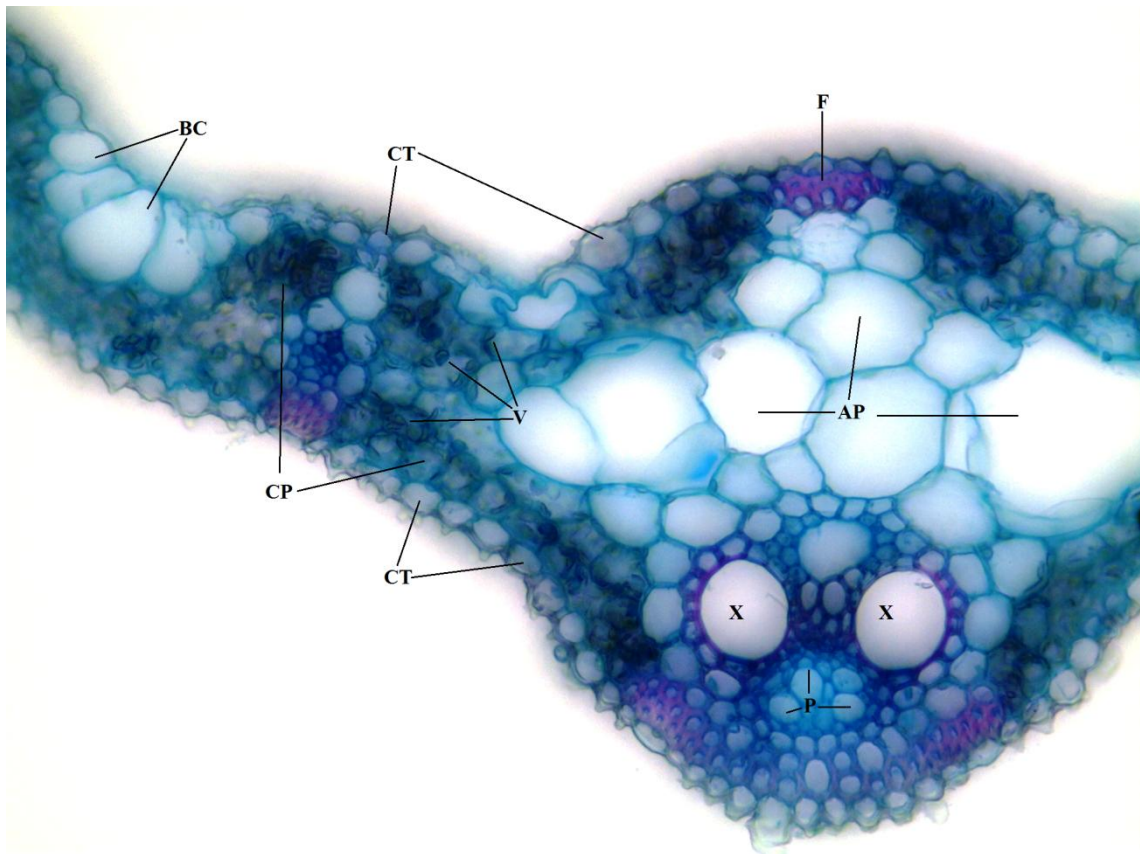


Figura 7 - Microscopia óptica de luz em plantas de arroz. Corte transversal de folhas de plantas induzidas com *M. oryzae* avirulento (PY10749). AP: parênquima aquífero; BC: células buliformes; CP: parênquima clorofiliano; CT: células propriamente ditas; F: fibras; V: vesículas com conteúdo citoplasmático; P: floema; X: xilema.

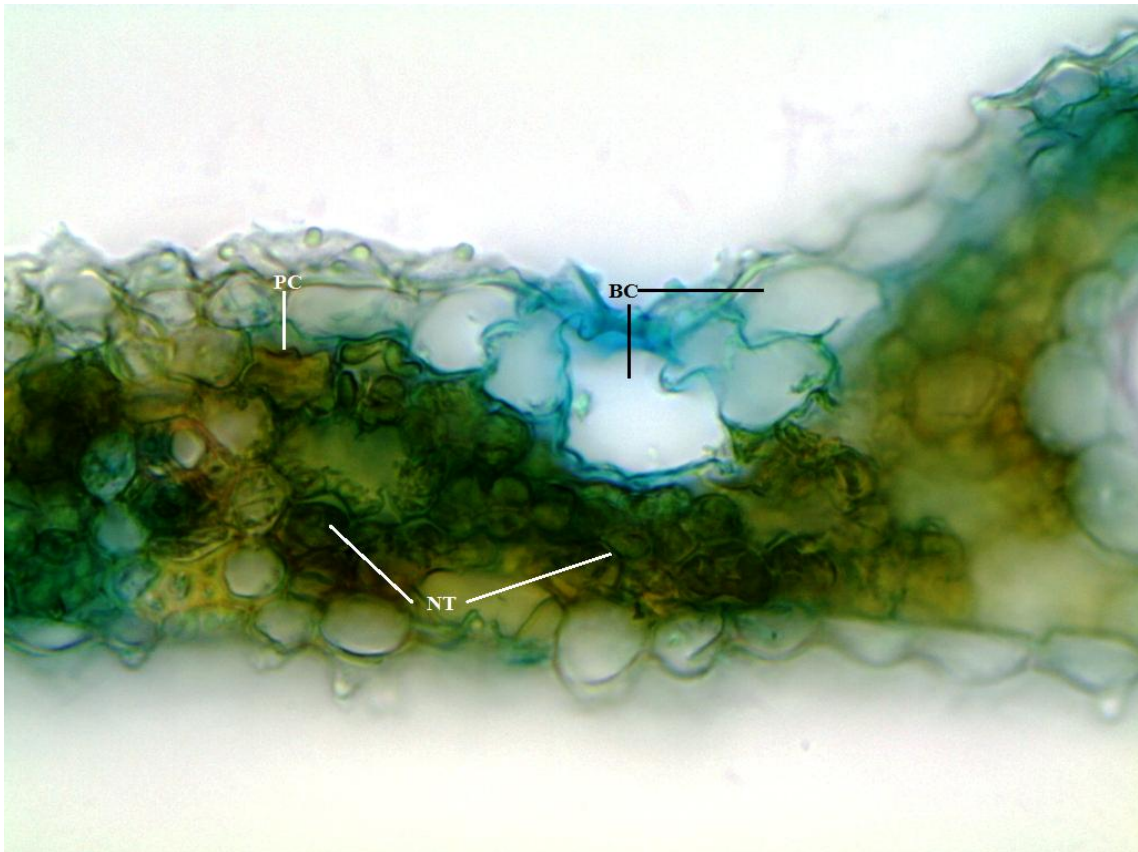


Figura 8 - Microscopia óptica de luz em plantas de arroz. Corte transversal em folhas de plantas desafiadas com PY10900 virulento (testemunha). BC: células buliformes; PC: célula plasmolisada; NT: tecido necrosado.

Deposição de calose em cortes paradérmicos

A observação por meio de microscopia de epifluorescência revelou a deposição de calose na parede celular de células epidérmicas das folhas de plantas induzidas com isolado PY10749 e desafiadas com PY10900, com fluorescência nas células vizinhas às lesões. Não foi observada fluorescência nos outros tratamentos (Figura 9).

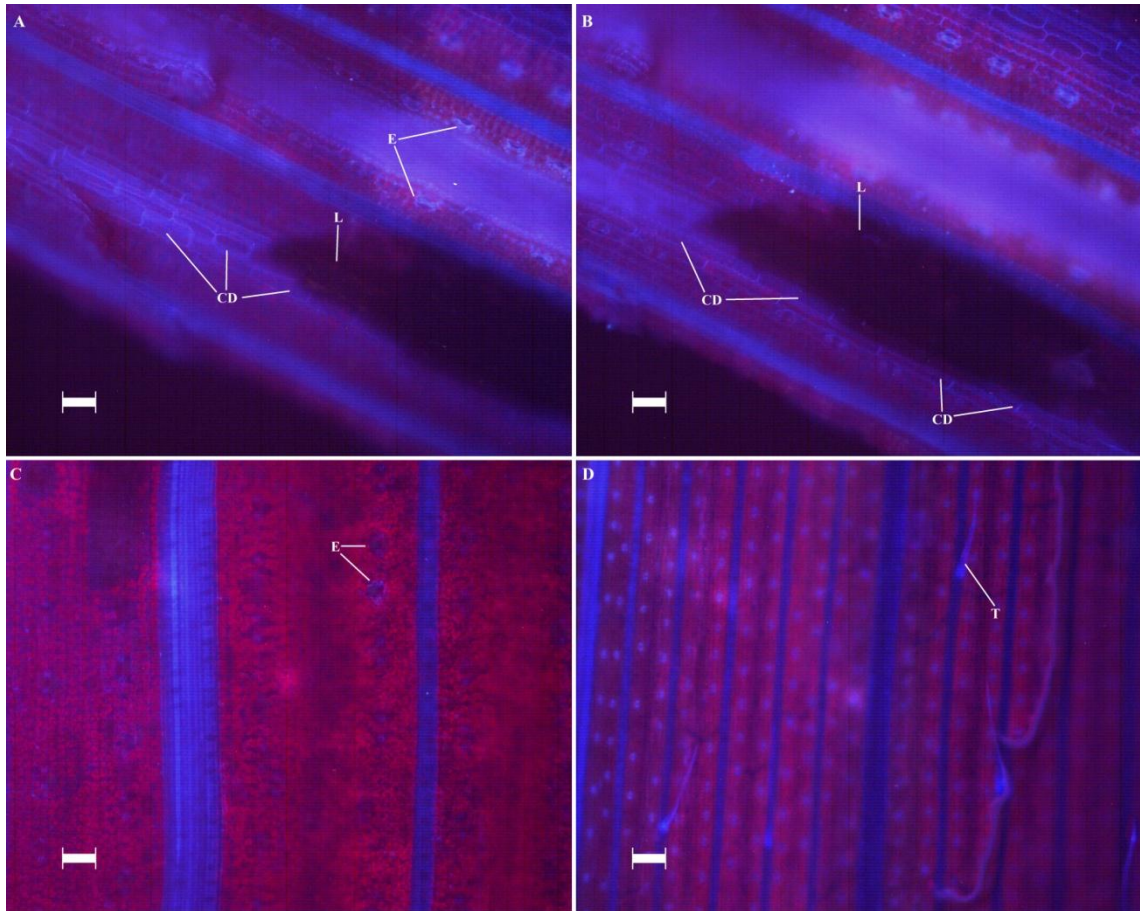


Figura 9 - Observação de microscopia óptica de epifluorescência. A e B: plantas de arroz induzidas com isolado PY10749 e desafiadas com PY10900 mostrando células epidérmicas com fluorescência indicando deposição de calose (CD) ao redor de áreas lesionadas (L); C: plantas tratadas com PY10900 (E=estômatos); D: plantas controle (H₂O) com tricomas (T).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, a indução de resistência foi comprovada em plantas de arroz contra *M. oryzae* utilizando um isolado avirulento deste mesmo patógeno. Este trabalho é pioneiro no estudo da interação das variáveis de defesa bioquímicas e estruturais em plantas de arroz induzidas com isolado avirulento de *M. oryzae*. A porcentagem de área foliar afetada foi significativamente maior nas plantas desafiadas com isolado virulento do que nas plantas que, mesmo desafiadas, foram previamente inoculadas com isolado avirulento de *M. oryzae* (Figura 1), com diferenças também no tipo de lesão. A ativação de mecanismos de defesa pode levar a uma rápida resposta da planta ao ataque de patógenos, o que pode ter acontecido nas plantas induzidas com *M. oryzae* avirulento com a presença de HR. Essa mudança no metabolismo da planta induz à uma alteração na bioquímica da célula, restringindo a colonização de seus tecidos por delimitar a região infectada pelo patógeno, levando a uma reação de hipersensibilidade (HR) (Kunstler *et al.*, 2016). Em arroz, as lesões do tipo HR caracterizam-se por serem pontuais, não abertas e não esporulativas. Esse tipo de lesão é demonstrada nas figuras 1B e 1C, onde pontuações marrons indicam necrose celular nos sítios de penetração do patógeno. Essa morte celular causada pela HR desencadeia uma resposta de defesa local e sistêmica, iniciando, por exemplo, a produção de fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e ativação de proteínas relacionadas a patogênese (Dickman & Fluhr, 2013). Essa resposta indica que há uma relação raça-específica entre o gene R do hospedeiro e o gene Avr do patógeno, entretanto, a inoculação do isolado avirulento conferiu resistência à planta contra o isolado PY10900, mesmo este isolado sendo virulento à cultivar BRS Primavera. Resultados de outro trabalho indicaram essa especificidade entre genes R e genes Avr, onde isolados avirulentos de *M. oryzae* conferiu proteção às plantas de arroz mesmo contra raças de *M. oryzae* virulentas, aquelas capazes de estabelecer infecção (Filippi *et al.*, 2007).

Verificou-se diferenças nas atividades de PRPs entre os tratamentos utilizados antes do desafio com *M. oryzae* virulento. A atividade de GLU foi aumentada pela presença do isolado avirulento PY10749. O valor de GLU foi constante nos dois primeiros dias após a indução e foi maior do que os valores encontrados no controle (H₂O) (Tabela 2). No 3DPI, quando as plantas induzidas foram inoculadas (AVR+VIR) (24hs após o desafio com *M. oryzae* virulento) a atividade de GLU continuou mais alta, com 38,75 U.mg⁻¹, 28,3% maior do que na testemunha. Esses resultados sugerem que

que a presença do fitopatógeno, avirulento ou virulento, possui a habilidade de intensificar a atividade de enzimas glucanases, já que essas enzimas hidrolisam os polímeros de β -1,3-glucana, um dos principais constituintes da parede celular de fungos (Ferreira *et al.*, 2007). A atividade de POX foi estimulada nas plantas induzidas com isolado AVR, aumentando significativamente nas primeiras horas após a indução, aumentando mais de três vezes no 1DPI e o dobro do valor observado no 2DPI, em relação ao controle. Durante uma interação patógeno-hospedeiro, a resistência raça-específica age de forma específica e rápida, reconhecendo o patógeno e levando a ativação de respostas de defesa (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005). O número de lesões do tipo HR foi alta tanto nas plantas induzidas com isolado avirulento quanto naquelas induzidas e desafiadas com isolado virulento. Peroxidases são produzidas pela planta hospedeira também em respostas a estresses bióticos, pode produzir espécies reativas de oxigênio e levar a uma resposta de hipersensibilidade, ativando o fortalecimento da parede celular e aumentando a produção de lignina (Camejo *et al.*, 2016).

Os valores e o padrão de atividade de PAL não foram os mesmos de GLU, onde os valores desta enzima foram maiores no controle do que nas plantas induzidas no período que antecedeu ao desafio, oscilando nos períodos subsequentes avaliados. PAL é a primeira enzima na via de biossíntese dos fenilpropanoides e possui uma importante função nas plantas após o ataque de patógenos (Zabala *et al.*, 2006) entretanto, diferente de outros trabalhos em que apresentou uma atividade maior nas plantas induzidas do que nos controles/testemunhas, PAL mostrou um padrão diferente de indução após o contato com *M. oryzae*, onde os maiores valores foram encontrados no controle (H₂O) e na testemunha (*M. oryzae*).

Assim como PAL, uma enzima que atua na biossíntese de compostos fenólicos com atividade antimicrobiana (Montesinos, 2000), os valores dos compostos fenólicos (CF) também foram menores nas plantas desafiadas com *M. oryzae*, entretanto, nos dois primeiros dias após a indução a sua quantidade manteve-se constante e no primeiro dia após o desafio (3DPI), o tratamento AVR+VIR apresentou concentração de CF superior ao encontrado na testemunha (Tabela 2). Compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas e possuem atividade antimicrobiana, podendo ser induzidos por patógenos em respostas de defesa das hospedeiras (Ferreira *et al.*, 2007).

O tratamento das plantas com o isolado de *M. oryzae* avirulento (AVR) desencadeou um aumento no teor de SA, permanecendo alto no dia subsequente ao do desafio (3DPI). A presença de patógenos pode desencadear um aumento no nível de SA

em hospedeiras (De Vleeschauwer *et al.*, 2013) nada obstante, o alto nível de SA nos controles (H₂O). Diferente das dicotiledôneas, nas quais os níveis de SA são baixos e podem aumentar exponencialmente durante o ataque de patógenos, as plantas de arroz acumulam altos níveis deste hormônio mesmo em condições de não-infecção (Silverman *et al.*, 1995).

Neste trabalho, PCA revelou como os mecanismos de indução de resistência interagiram e como essa interação influenciou as respostas de defesa da planta para controle da brusone foliar. Utilizando apenas três componentes, a PCA resumiu mais 87% da variância observada (Tabela 3). A variável DPI está negativamente correlacionada com a atividade de GLU e com o teor de SA, onde níveis decresceram com o passar do tempo e, cujos valores maiores de atividade de teor, respectivamente, foram encontrados nos tratamentos induzidos e desafiados com *M. oryzae*. SA também foi correlacionado negativamente com o a enzima PAL. Houve uma alternância entre a atividade de PAL e o teor de SA. Quando o valor de uma dessas variáveis subia, o valor da outra decrescia (Tabela 2). PAL é uma enzima chave na síntese dos fenilpropanóides e tem no ácido trans-cinâmico, precursor do SA, o seu substrato. Sua atividade decresce a medida que o substrato é consumido e o produto da reação vai sendo formado (Ferreira *et al.*, 2007). A correlação entre SBF e a atividade de POX foi negativa no segundo componente da PCA. Os tratamento com menores índices de área foliar afetada foram aqueles nos quais observou-se uma maior atividade de POX. Isso sugere que essa enzima contribuiu para que a infecção não ocorresse. A atividade de peroxidase da família PR9 pode agir no fortalecimento da parede celular por meio da catálise da lignina, como também pode atuar contra o patógeno através de respostas rápidas que podem levar à uma HR (Camejo *et al.*, 2016). A variável CF correlacionou-se positivamente com o aumento da severidade da brusone foliar. Esta correlação pode ser atribuída à presença crescente do patógeno em desenvolvimento provocando o progresso contínuo da doença. Os compostos fenólicos possuem atividade antimicrobiana, como as fitoalexinas, mecanismos de defesa induzidos em resposta ao ataque de fitopatógenos (Kuc, 1995).

A análise da superfície foliar via MEV ilustrou e comparou o início do processo de colonização, evidenciando a formação de apressórios tanto na testemunha (PY10900) bem como nas plantas tratadas com PY10749 + PY10900. Na figura 3 pode-se observar que o apressório formado deu continuidade ao processo de colonização ao penetrar no tecido foliar nas primeiras 24hs após o desafio nas plantas não induzidas. Já no

tratamento PY10749 + PY10900, mesmo após 48hs o apressório permaneceu túrgido, sugerindo que não houve sucesso na penetração na folha (Bechinger *et al.*, 1999).

Os cortes das folhas observados em microscopia óptica revelaram a presença de grupos de células mortas nas plantas induzidas com isolado avirulento e desafiadas com *M. oryzae* virulento, sem a presença de crescimento micelial do patógeno (Figura 6), como também não revelaram nenhum sintoma de brusone foliar (Figura 1). Manchas necróticas características de respostas de hipersensibilidade e a presença de vesículas com conteúdo citoplasmático marrons foram observadas tanto nas plantas somente induzidas no 2DPI (Figura 7), como também nas plantas desafiadas, no 4 DPI (segundo dia após o desafio) (Figura 6), confirmando a ocorrência da indução de resistência. As reações de hipersensibilidade estimulam a produção de compostos que fortificam a parede celular fazendo-a mais resistente à pressão mecânica aplicada durante a penetração feita pelo apressório, além de levar ao acúmulo de produtos de oxidação fenólica amarronzados (Heath, 2000; Bolwell *et al.*, 2001; Kadota *et al.*, 2015).

Observou-se a fluorescência de células epidérmicas nas plantas induzidas e desafiadas, indicando a presença de calose na parede celular vegetal. A deposição desses compostos na parede celular é uma reação de defesa a estresses bióticos e, juntamente com acumulação de EROs e compostos fenólicos, constituem em mecanismos de indução de defesa contra o ataque de patógenos.

5. CONCLUSÃO

Plantas induzidas com isolado avirulento PY10749 apresentaram uma área foliar afetada significativamente menor; nestas não houve o estabelecimento da infecção. Após o desafio com isolado virulento de *M. oryzae* (PY10900), a resistência das plantas mostrou-se estar relacionada com um rápido reconhecimento do patógeno, expressa por meio de uma resposta de hipersensibilidade.

Conídios do fitopatógeno germinaram e formaram apressório, entretanto não foram capazes de penetrar a folha das plantas previamente induzidas com isolado avirulento. O tratamento das plantas com PY10749 também foi eficiente em impedir a colonização das plantas por *M. oryzae* virulento, com a formação de estruturas vesiculares nas plantas previamente induzidas.

Em plantas de arroz, o isolado PY10749 aumentou a atividade das enzimas de defesa GLU, PAL e POX, além de aumentar a concentração de CF e SA nos primeiros dias após o desafio com PY10900. SAR em arroz desencadeada por *M. oryzae* avirulento pode estar associada a essas cinco variáveis de defesa. Estudos como este de interação planta-patógeno ajuda na elucidação dos mecanismos pelos quais a célula vegetal lida com essas situações de estresse. Uma visão geral das variáveis de defesa foi dada pela análise multivariada, estabelecendo a importância da relação entre as respostas de defesa desencadeadas pelo isolado avirulento para o controle da brusone foliar.

6. LITERATURA CITADA

- BECHINGER, C.; GIEBEL, K.F.; SCHNELL, M.; LEIDERER, P.; DEISING, H.B. & BASTMEYER, M.. 1999. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285:1896-9.
- BOLWELL, P.P.; PAGE, A.; PISLEWSKA, M., & WOJTASZEK, P. 2001. Pathogenic infection and the oxidative defences in plant apoplast. *Protoplasma* 217:20-32.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72:248–254.
- CAMEJO, D.; GUZMÁN-CEDENO, A. & MORENO, A. 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103:10-23.
- CÔRTEZ, M.V.C.B.; VIANA, H.F.; SILVA, F.R.; SILVA-LOBO, V.L.; SILVA, G.B.; PRABHU, A.S. & FILIPPI, M.C.C. 2008. Quantificação da atividade enzimáticas de proteínas relacionadas à patogênese no patossistema *Oryza sativa/Magnaporthe oryzae*. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás.
- DANGL, J.L.; HORVATH, D.M. & STASKAWICZ, B.J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment, *Science* 341:746-751.
- DAYMI, C.; GUZMÁN-CEDENO, A. & MORENO, A. 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103:10-23.
- DEAN R, VAN KAN JAL, PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, DI PIETRO A, SPANU PD, RUDD JJ, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, FOSTER GD 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13:414-430

- DICKMAN, M.B. & FLUHR, R. 2013. Centrality of Host Cell Death in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology* 51:543-70.
- DICKO, M.H.; HILHORST, R.; GRUPPEN, H.; TRAORE, A.S.; LAANE, C.; van BERKEL, W.J.H. & VORAGEN, A.G.J. 2002. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenoloxidase, and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3780-3788.
- DONG, X.; HONG, Z.; CHATTERJEE, J. & KIM S, VERMA, D.P.S. 2008. Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. *Planta* 229:87-98.
- FAULKNER, C. & ROBATZEK, S. 2012. Plants and Pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:699-707.
- FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; BORGES, A. & TEIXEIRA, A.R. 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 8:677-700.
- FILIPPI, M.C. & PRABHU, A.S. 2001. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:27-35.
- FILIPPI, MARTA C.C.; SILVA, GISELE B. & PRABHU, ANNE S. 2007. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. *Fitopatologia Brasileira* 32:387-392.
- HEATH, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-34.
- KADOTA, Y.; SHIRASU, K. & ZIPFEL, C. 2015. Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology* 56:1472-1480.

- KEESEY, J., 1987. Biochemica Information. Boehringer Manhein Biochemicals, Indianapolis.
- KRAUS, J.E.; SOUSA, H.C.; RESENDE, M.H.; CASTRO, N.M.; VECCHI, C. & LUQUE, R. 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant material. *Biotechnic & Histochemistry* 73:235-24.
- KUC, J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 33:275-97.
- KUNSTLER, A.; BACSO, R.; GULLNER, G.; HAFEZ, Y.M. & KIRALY, L. 2016. Staying alive - is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 93:75-84.
- MEHER, H.C.; GAJBHITE, V.T. & SINGH, G.A. 2012. Liquid chromatography method for determination of selected amino acids, coenzymes, growth regulators, and vitamins from *Cicer arietinum* (L.) and *Solanum lycopersicum* (L.). *Journal AOAC International* 95:1142-1152.
- MONACO, M.K.; STEIN, J.; NAITHANI, S.; WEI, S.; DHARMAWARDHANA, P.; KUMARI, S.; AMARASINGHE, V.; YOUENS-CLARK, K.; THOMASON, J.; PREECE, J.; PASTERNAK, S.; OLSON, A.; JIAO, Y.; LU, Z.; BOLSER, D.; KERHORNOU, A.; STAINES, D.; BRANDON, W.; WU, G.; D'EUSTACHIO, P.; HAW, R.; CROFT, D.; KERSEY, P.J.; STEIN, L.; JAISWAL, P. & WARE, D. 2013. Gramene 2013: comparative plant genomics resources. *Nucleic Acids Research* 42: 1193–1199.
- MONTESINOS, E. (2000) Pathogenic plant–microbe interactions. What we know and how we benefit. *Int. Microbiol.* 3, 69–70.
- NOTTEGHEM, J.L. 1981. Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. In: *BLAST and upland rice: report and recommendations from the meeting*

for international collaboration in upland rice improvement. International Rice Research Institute, Los Baños, pp 43-51.

PAN, S.Q.; YE, X.S. & KUC, J. 1991. Association of a b-1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mold in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:25-39.

SAIKIA, S.; PARKER, E.J.; KOULMAN, A. & SCOTT, B. 2006. Four gene products are required for the fungal synthesis of the indole-diterpene, paspaline. *FEBS Letters* 580:1625–1630

SPOEL, S.H. & DONG, X. 2012. How do plants achieve immunity? defense without specialized immune cells. *Nature Review of Immunology* 12:89-100.

STRANGE, R.N. & SCOTT, P.R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Phytopathology* 43: 83–116.

TSUDA, K. & KATAGIRI, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern triggered and effector-triggered immunity, *Current Opinion on Plant Biology*. 13:459-465.

VENEAULT-FOURREY, C.; LAUGÉ, R. & LANGIN T. 2005. Nonpathogenic strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. *Applied Environmental Microbiology* 71:4761-70.

De VLEESSCHAUWER, D.; GHEYSEN, G. & HOFTE, M. 2013. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in Plant Science* 18:555-565.

ZABALA, G.; ZOU, J.J.; TUTEJA, J.; GONZALEZ, D.O.; CLOUGH, S.J. & VODKIN, L.O. 2006. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway

of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection, BMC Plant Biology 6:26-43.

CAPÍTULO 3

Indução de resistência em arroz por meio de indutores abióticos para controle de *Magnaporthe oryzae*.

Indução de resistência em arroz por meio de indutores abióticos para controle de *Magnaporthe oryzae*.

RESUMO

Acibenzolar-S-metil (ASM) e ácido jasmônico (JA) são indutores abióticos capazes de ativar respostas de defesa de plantas. A comunicação existente entre as rotas de sinalização ativadas por ASM e JA, comumente se manifesta como um antagonismo recíproco. Foi examinado o efeito de ambos no controle da brusone do arroz a fim de revelar como o processo de indução de defesa desencadeada por eles e interferência nas atividades de β -1,3-glucanase (GLU), fenil alanina-amônio liase (PAL), Lipoxigenase (LOX), Peroxidase (POX), compostos fenólicos (CF) totais, teor de ácido salicílico (SA) e no desenvolvimento da doença. Plantas de arroz foram tratadas com JA, ASM e com a mistura de ambos (JA+ASM) e então desafiadas com *Magnaporthe oryzae*. ASM pode ativar a resistência sistêmica induzida; JA promoveu um aumento da suscetibilidade de arroz ao ataque de *M. oryzae*. O antagonismo entre ASM e JA foi demonstrado pela aplicação conjunta de ambos, onde a severidade de brusone foliar (SBF) foi maior em plantas induzidas com ASM mas foi menor do que aquelas tratadas com JA. A atividade de LOX, maior em plantas tratadas com JA, mostrou estar correlacionado positivamente com o aumento da severidade. Plantas tratadas com ASM que apresentaram maior atividade de POX tiveram menor SBF. Esta enzima mostrou estar ligada ao metabolismo secundário de defesa devida a sua correlação com componentes da via dos fenilpropanóides como PAL, SA e compostos fenólicos (CF). Este é o primeiro relato de efeito cruzado entre ASM e JA em arroz.

Palavras-chaves: Acibenzolar-S-metil, ácido jasmônico, brusone, *crosstalk*, fitormônios, lipoxigenase, *Oryza sativa*.

ABSTRACT

Acibenzolar-S-methyl (ASM) and jasmonic acid (JA) are abiotic inducers capable of activating plant defense responses. The cross-talk between the ASM and JA-activated pathways commonly manifests as reciprocal antagonism. We examined the effect of both on rice blast control in order to discover how the induction triggered by them and their reciprocal interaction interfere with the defense responses and disease development. Rice plants were treated with JA, ASM and the mixture of both (JA + ASM) and then challenged with *Magnaporthe oryzae*. ASM can activate systemic resistance induced; JA promoted an increase in rice susceptibility to *M. oryzae* attack. The antagonism between ASM and JA was demonstrated by the joint application of both, where rice blast severity (SBF) was higher in ASM-induced plants but was lower than those treated with JA. Lipoxygenase activity (LOX), higher in plants treated with JA, was positively correlated with increased severity. Plants treated with ASM that had higher peroxidase activity (POX) had lower SBF. This enzyme has been shown to be linked to secondary defense metabolism due to its correlation with phenylpropanoid pathway components such as phenylalanine ammonia-lyase (PAL), salicylic acid (SA) and phenolic compounds (CF). This is the first report of cross-effect between ASM and JA in rice.

Key words: Acibenzolar-S-methyl, crosstalk, jasmonic acid, phytohormones, lipoxygenase, rice blast, *Oryza sativa*.

1. INTRODUÇÃO

Plantas possuem mecanismos de defesa latentes que podem ser ativados ou reforçados quando em contato com agentes indutores, onde vias sinalizadoras governadas por hormônios vegetais têm papel preponderante.

O ácido salicílico (SA) é um hormônio fenólico, derivado do triptofano e está envolvido em diversos processos metabólicos (Vlot *et al.*, 2009). O aumento da concentração de SA nas plantas pode desencadear resistência sistêmica adquirida (SAR). Este fenômeno é associado com o acúmulo de SA; este hormônio é requerido para a transdução de sinal, sendo efetivo na elicitação das defesas contra patógenos biotróficos. A ativação de genes relacionados à patogênese (PR), acúmulo de proteínas PR (PRPs), produção de espécies reativas de oxigênio e síntese de fitoalexinas, fazem parte das mudanças expressada pela planta quando tem suas defesas elicitadas por SA (Thaler *et al.*, 2012; Camejo *et al.*, 2016). A aplicação exógena de SA e seus análogos, como acibenzolar-S-metil (ASM) em plantas pode induzir resistência contra diversos fitopatógenos (de Vleeschauwer *et al.*, 2013). O uso do ativador de plantas ASM pode induzir a expressão de genes responsivos a SA, induzindo resistência, ativando a proteção contra uma ampla gama de patógenos de diferentes tipos e diferentes modos de colonização (Jiang *et al.*, 2010; Nahar *et al.*, 2012; de Vleeschauwer *et al.*, 2013).

Ácido jasmônico (JA) e seu derivados, comumente chamados de jasmonatos, são reguladores derivados de lipídios sintetizados a partir do ácido linoléico, e estão envolvidos em respostas de defesa e vários outros processos metabólicos. JA é um hormônio que ativa a proteção de plantas contra patógenos necrotróficos, como *Rhizoctonia solani*, e hemibiotróficos, como *M. oryzae*. Assim como SA, o aumento do nível de JA pode levar indução de resistência, chamada resistência sistêmica induzida (ISR), ativando também genes responsivos a JA, tais como genes PR, com o consequente acúmulo de PRPs.

Quando desafiada por patógenos, as células das plantas reprogramam-se para ativar seus mecanismos de defesa. A morte celular programa nos sítios de infecção é uma resposta de defesa comum contra patógenos biotróficos e também contra insetos sugadores, que necessitam do tecido vivo para se nutrirem. Por outro lado, a morte celular é um pré-requisito para a colonização do tecido por patógenos necrotróficos, devido ao fato desses fungos se nutrirem de células mortas. Por isso mesmo é essencial que as plantas ativem o mecanismo apropriado de defesa de acordo com o tipo do patógeno. A resistência mediada por SA é efetiva contra patógenos biotróficos enquanto

que o JA e/ou etileno (ET) medeiam respostas de defesa mais efetivas contra patógenos com estilo necrotrófico de colonização, sendo também importantes em respostas contra herbivoria (Glazebrook, 2005; Steven & Dong, 2008). Além de elicitar vias de defesa, hormônios também interagem, apresentando efeitos regulatórios entre si, relação essa conhecida como *crosstalk*. O *crosstalk* entre SA e JA se manifesta comumente como um recíproco antagonismo, podendo ser adaptativo, dependendo das condições em que a planta se encontra; em plantas que exibem altos níveis de SA apresentam baixa quantidade de JA, bem como o acúmulo de JA induz uma queda na concentração de SA. Nessas situações, o efeito cruzado entre essas vias de sinalização constituem um dos mecanismos que permitem as plantas ajustar as suas respostas de defesa de acordo com o tipo do patógeno. Evolutivamente, alguns patógenos como *M. oryzae*, adquiriram a capacidade de interferir no *crosstalk* entre os hormônios como estratégia de virulência, alterando o balanço hormonal para seu benefício (Thaler *et al.*, 2012).

Para alcançar níveis de resistência efetivos após o reconhecimento de *M. oryzae*, as plantas de arroz devem ajustar as diferentes vias sinalizadoras por meio das interações sinérgicas e antagônicas. O antagonismo entre SA e JA já conhecido, entretanto, não se sabe se existe interação entre as vias indutoras de ASM e de JA quando esses indutores são aplicados, qual o efeito dessa relação no desenvolvimento do patógeno na planta e no consequente controle da doença.

O objetivo desse trabalho foi determinar se existe antagonismo entre ácido jasmônico e ASM, aplicando-os nas plantas de forma conjunta e separada, e comparar as respostas de defesa que desencadeiam em plantas de arroz contra *M. oryzae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho experimental.

O delineamento realizado foi de blocos ao acaso (DBC). Os tratamentos foram:

M. oryzae virulento - testemunha; plantas induzidas com ASM (Bion®, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda), JA e desafiadas com *M. oryzae* virulento (ASM e/ou JA + VIR) e controle negativo (H₂O). Foram utilizadas três bandejas por tratamento.

2.2. Plantio cultivar BRS Primavera.

Sementes de arroz BRS Primavera foram esterilizadas com soluções de álcool 70% (1 min) e hipoclorito de sódio (3 min), enxaguadas em água e plantadas em bandejas com 3 kg de solo adubado (FTE 1g/ kg solo, Zn 1g/2 kg e NPK - 5/30/15g/kg), e mantidas em condições de 60% de umidade e temperatura média de 25 °C em casa de vegetação. Cada bandeja possui oito sulcos, com 10 plantas em cada.

2.3. Aplicação das moléculas químicas de ASM e JA em plantas de arroz para controle da brusone.

Vinte e um dias após o plantio, a última folha emitida até então foi induzida com quatro soluções: ASM 0,5 mM (50%), JA 0,25 mM, JA 0,25 mM + ASM 0,5 mM e água destilada. A suspensão de conídios à 10^5 conídios.mL⁻¹ de *M. oryzae* (PY10900) foi inoculada 48h após a indução abiótica. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento. A porcentagem de área foliar afetada pela brusone foi avaliada usando uma escala de notas (0,5 a 82% de área foliar afetada) de acordo com Nottoghem (1981). As plantas foram avaliadas durante uma semana após a inoculação de *M. oryzae* em condições de casa de vegetação

2.4. Desafio com *M. oryzae*.

O isolado virulento de *M. oryzae* 10900 proveniente da coleção de microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão foi reativado em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) e multiplicado em placas de Petri com meio de aveia (aveia 2%, 1,5% ágar, p/v), durante 10 dias a 28 °C. A produção de conídios foi estimulada com a remoção do micélio aéreo da colônia de *M. oryzae*. Os conídios foram coletados com água destilada e esterilizada e 48h após, a suspensão foi ajustada a 3×10^5 conídios.mL⁻¹ (Filippi & Prabhu, 2001) e inoculadas em plantas 19 dias após a semeadura. A porcentagem de área foliar afetada pela brusone

foi quantificada usando uma escala de notas (0-82% de área foliar afetada) de acordo com Notteghem (1981). As plantas foram avaliadas durante uma semana após a inoculação de *M. oryzae* em condições de casa de vegetação.

2.5. Determinação da atividade das enzimas β -1,3 glucanase, lipoxigenase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase, quantificação de compostos fenólicos e teor de ácido salicílico em plantas de arroz.

Plantas tratadas apenas com *M. oryzae* foram utilizadas como testemunhas e plantas tratadas com H₂O como controle negativo. As coletas foram feitas em 1, 2, 3, 5, 7 e 9 DPI. Toda parte aérea da planta foi coletada, dez plantas por tratamento, e então acondicionadas em caixas de gelo e congeladas (-20 °C) para uso posterior.

Extração de proteínas

As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e em cada amostra foi adicionado solução-tampão (Tris-HCl 10 mM; NaCl [150 mM]; EDTA [2 mM]; DTT [2 mM]; PMFS [1 mM]; Leptina [10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Aprotinina [10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]). Em seguida, as amostras foram agitadas num vortex durante 1 minuto e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar as proteínas solúveis totais e nos ensaios de determinação de atividade enzimática. 50 μL de cada amostra foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf acrescentando 1000 μL de CBB (*comoassie brilliant blue*). As amostras foram homogeneizadas e colocadas em repouso durante 15 minutos. Logo após, transferiu-se 100 μL para placas de Elisa as quais foram colocadas em espectrofotômetro (λ 597 nm). O conteúdo de proteínas solúveis totais no extrato bruto foi medido de acordo com o método de Bradford (1976), com albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

β -1,3-Glucanase (EC 3.2.1.39) (GLU)

Utilizou-se a metodologia descrita por Pan *et al.*, (1991) com algumas modificações. Atividade de GLU em extrato proteico de folhas de arroz de diferentes tratamentos foram avaliados pela medição da taxa de redução da produção de açúcar utilizando laminarina como substrato. O reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) foi usado como agente colorimétrico. A atividade foi expressa em unidades por miligrama

de proteína ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Uma unidade foi definida como atividade enzimática catalisando a formação de açúcares redutores que aumenta a absorvância de uma unidade por hora.

Lipoxigenase (EC:1.13.11.12) (LOX)

A atividade de LOX foi determinada de acordo com Axelrod et al. (1981) usando ácido linoléico como substrato. 50 μl do extrados da parte aérea de arroz foi adicionado em 2 mL de solução de ácido linoléico (10 mM) em tampão fosfato (50 mM, pH 6.0) (0,1% v/v), em temperatura ambiente. A atividade de LOX foi quantificada em espectrofotômetro ($\lambda=234$ nm).

Peroxidases (EC 1.11.1.7) (POX)

A atividade de peroxidase foi realizada por meio da medição do nível de oxidação de 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) usando suas próprias atividades colorimétricas. Uma unidade foi definida como atividade enzimática catalisando a formação de 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) que aumenta a absorvância de uma unidade por hora (Keeseey, 1987).

Fenilalanina Amônia-liase (EC 4.3.1.24) (PAL)

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada, utilizando 2 ml de solução de fenilalanina 10 mM, em solução tampão borato 0,1 M, pH 9,0 e 50 μl de cada amostra, em triplicata. A mistura foi homogeneizada e submetida à quantificação do produto em espectrofotômetro, em comprimento de onda 290 nm (ultravioleta) (Côrtes et al., 2008).

Compostos Fenólicos (CF)

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada segundo a metodologia de Dicko *et al.* (2002). A parte aérea das plantas de arroz foram coletadas para quantificação dos compostos fenólicos. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido após a coleta. As plantas foram maceradas com auxílio de cadinhos e pistilos até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Trezentos miligramas dos compostos fenólicos solúveis foram colocados em 1500 μL de metanol 70% e, após levá-las ao sonicador por 30 minutos, as amostras foram filtradas com auxílio de algodão. O ensaio foi feito em triplicata por cada amostra onde 120 μL do extrato foi misturado com 220 μL de H_2O milli-Q e 200 μL de Folin-Ciocalteu. Após 5 min de

incubação foi adicionado solução de Na_2CO_3 a 20% e 600 μL de H_2O milli-Q. A mistura foi incubada por 30 min a temperatura ambiente e a leitura foi feita em espectrofotômetro numa absorbância de 720 nm.

Ácido Salicílico (SA)

Para quantificação de AS nas plantas de arroz, 200 mg da parte aérea de cada tratamento foram maceradas e transferidas para microtubos (2 mL). Em cada microtubo foi adicionado 1 mL de metanol (90%), seguido de agitação em agitador, por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas, a 5000 rpm por 10 minutos, e transferidas para um tubo falcon, de 15 mL. Adicionou-se em cada tubo, 1 mL de metanol PA e 2 mL de ácido tricloroacético (5%), e 2 mL de acetato de etila, ciclopentano e isopropanol (50:50:1). As amostras foram agitadas em agitador por 1 minuto, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo para liofilização. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 200 μL de metanol (23%), em tampão acetato (20 μmol pH 5,0), que foram filtradas em minifiltro milipore (0,45 μm). A quantificação de ácido salicílico foi realizada em um aparelho de cromatografia líquida HPLC (High Performance Liquid Chromatography) apresentando tempo de retenção de 4,8 minutos (Saikia *et al.*, 2006; Meher *et al.*, 2012).

2.6. Análise estatística

Análise univariada

Os dados de severidade de brusone foliar (SBF), GLU, PAL, LOX, POX, CF e AS foram avaliados utilizando uma análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p=0.05$).

Análise multivariada

Análise de componentes principais (PCA) reuniu as variáveis relacionadas com as respostas de defesa da planta e severidade de doença. A PCA foi realizada utilizando os pacotes Rcmdr e FactoMineR, ambos do software 'R' 2.15 (R Development Core Team, Vienna, Austria). Essa análise foi feita utilizando tanto os efeitos multivariados das variáveis de indução de resistência (PAL, LOX, GLU, PO, AS) quanto as variáveis de doença (severidade e DPI).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação de severidade de brusone foliar.

Em plantas tratadas com ASM e desafiadas com o patógeno, não se observou a formação de lesões esporulativas, mas evidenciou-se os sintomas de RH, que são pontoações castanhas que indicam morte celular, sem a presença de lesões esporulativas (Figura 1A). Quando as plantas de arroz foram tratadas com a mistura de ASM e JA, a porcentagem de área foliar afetada foi maior do que em plantas tratadas com ASM, apresentando lesões abertas com bordas marrons e centro acinzentado (indicando esporulação do fungo) (Figura 1B) e, quando comparado com a testemunha, houve redução de 44% de área foliar afetada (Tabela 1). Ao contrário de ASM, a severidade de brusone foliar (SBF) nas plantas tratadas com JA foi muito superior em tamanho às aquelas observadas nos outros tratamentos, inclusive na testemunha (Figura 1D). As lesões atingiram grande parte da extensão foliar, causando a morte de muitas das plantas avaliadas (Figura 1C), indicando que a aplicação de JA, 48 horas antes da inoculação desafiante, não elicitou a defesa da planta e induziu a suscetibilidade das plantas de arroz a *M. oryzae*.

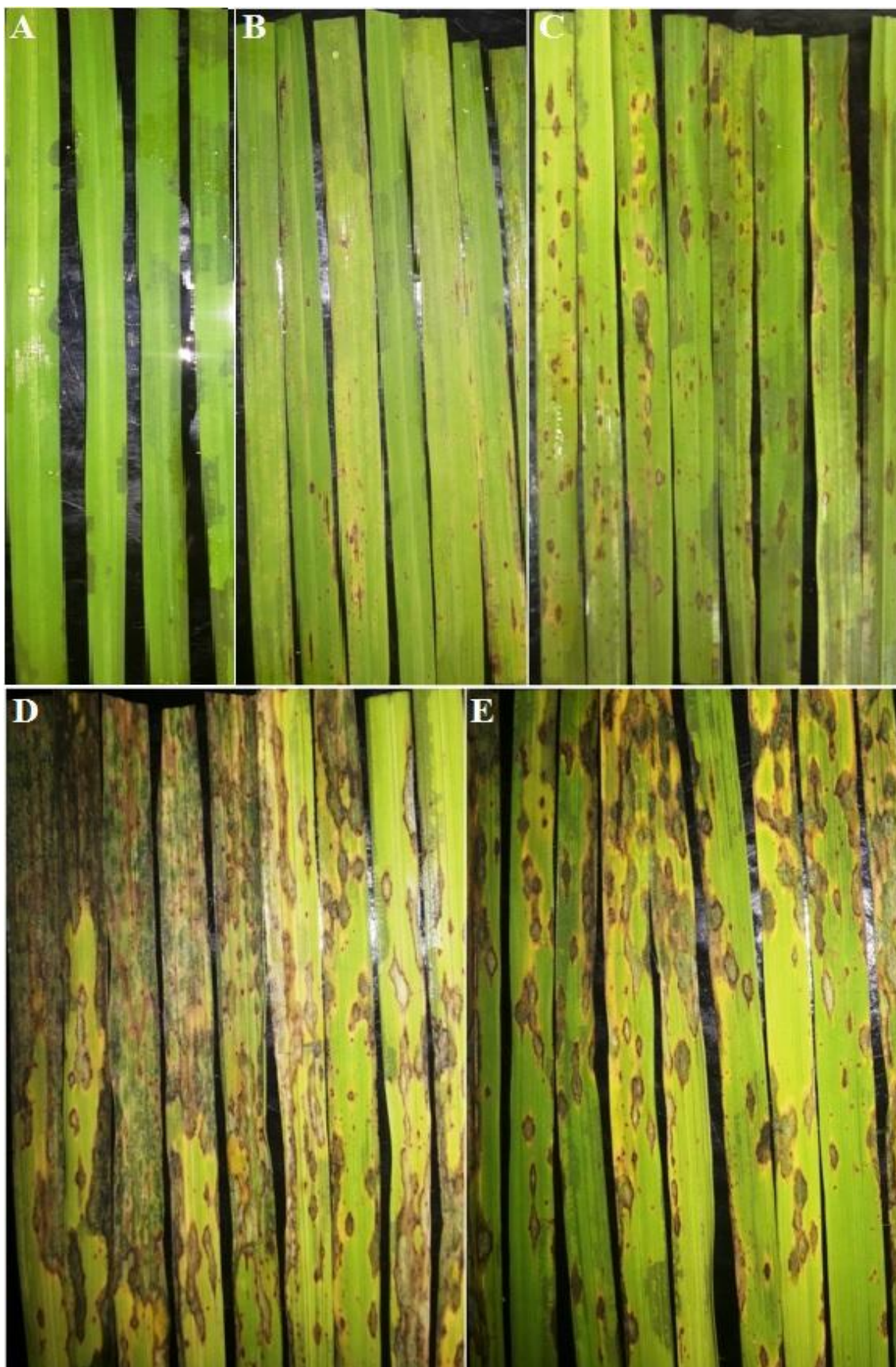


FIGURA 1- Severidade de brusone foliar em folhas de arroz. Tratamento controle (H₂O) (A). B-E: plantas induzidas com ASM (B), induzidas com JA+ASM (C), induzidas com JA (D) e testemunha (PY10900) (E).

3.2. Atividades das enzimas relacionadas com a defesa da planta, e quantificação dos compostos fenólicos e teores de ácido salicílico.

Plantas tratadas apenas com os agentes indutores JA, ASM e JA+ASM.

De modo geral, os valores de PRPs, compostos fenólicos (CF) e AS variaram tanto entre quanto dentro dos tratamentos. A atividade de GLU foi estimulada em todos os tratamentos nos dois primeiros dias de indução (1DPI e 2DPI), sendo maior nas plantas induzidas com os agentes indutores do que nas plantas controle (H₂O). No 1DPI, seu valor foi maior em plantas tratadas com JA, seguidas de JA+ASM e ASM, em ordem decrescente. No 2DPI, somente os tratamentos JA e JA+ASM que se diferenciaram do controle. Dentre os tratamentos, apenas as plantas tratadas com JA+ASM apresentaram atividade de PAL maior do que o controle (Tabela 1). Nos dois dias subsequentes (2DPI e 3DPI), os maiores valores foram observados em plantas induzidas com ASM. Todos os tratamentos diferiram do controle no 1DPI, apresentando valores superiores. No 1DPI, a maior atividade de LOX foi observada nas plantas induzidas com JA. No 2DPI, o valor máximo de atividade de LOX foi encontrado no tratamento ASM. Já no 3DPI, o pico de atividade foi observado novamente em plantas tratadas com JA. Dentre os agentes indutores, a atividade de POX foi maior nas plantas induzidas com ASM no 1DPI e 2DPI. No 3DPI, além das plantas induzidas com ASM, a atividade de POX foi maior também em plantas tratadas com JA (Tabela 1). Os níveis de compostos fenólicos (CF) foi maior no 1DPI em plantas tratadas com JA, sendo este o único tratamento que diferiu do controle nesse primeiro tempo de avaliação. No 2DPI, todos os tratamentos diferiram do controle e o pico do teor de CF também foi maior no tratamento JA e no 3DPI, plantas induzidas com ASM mostraram os maiores valores de CF. Os teores de SA foram maiores nos três primeiros dias naqueles tratamentos que receberam ASM tanto em forma conjunta com JA, quanto aplicado isoladamente. No 1DPI, plantas induzidas com JA+ASM apresentaram os maiores valores de SA. No 2DPI, o pico do teor foi observado em plantas tratadas com ASM e no 3DPI, em JA+ASM (Tabela 1).

Table 1. Atividade de proteínas relacionadas à patogênese β -1,3 glucanase (GLU), fenilalanina amônia-liase (PAL), lipoxigenase (LOX), peroxidase (POX) e concentração de compostos fenólicos (CF) e de ácido salicílico (SA) e severidade de brusone foliar (SBF) em plantas de arroz de terras altas tratadas com JA, ASM, e JA+ASM seguidas ou não de inoculação desafiante com *M. oryzae* (PY10900).

Variáveis	DPI ^a	Tratamento																
		JA	JA+ASM	ASM	H2O	JA+ <i>M. oryzae</i>	JA+ASM+ <i>M. oryzae</i>	ASM+ <i>M. oryzae</i>	<i>M. oryzae</i>									
GLU ^b	1	26,65	cC	14,64	aB	11,55	aAB	9,84	aA									
	2	27,22	cB	29,93	dB	18,23	cA	18,48	bcdA									
	3	27,40	cC	24,00	cBC	44,27	dD	59,29	eE	17,29	bAB	30,56	cC	16,36	aA	10,26	aA	
	4	34,76	dB	14,07	aA	17,38	bcA	18,06	bcA	14,92	aA	16,49	aA	49,15	eC	17,50	bA	
	5	8,67	aA	14,56	aB	14,67	bB	22,26	cdD	18,69	bC	21,46	bD	37,84	dF	30,28	eE	
	7	42,99	eF	24,24	cD	10,71	aA	14,25	abB	23,02	dCD	17,24	aB	30,00	cE	20,68	cC	
	9	19,26	bA	20,03	bA	18,70	cA	25,09	dB	20,92	cA	52,97	dC	25,90	bB	24,18	dB	
	PAL ^b	1	1,15E-05	cA	5,78E-05	fC	2,19E-05	dB	2,43E-05	eB								
		2	7,75E-06	bA	6,52E-06	bcA	2,02E-05	cC	1,52E-05	dB								
3		1,62E-05	dD	7,28E-06	cB	1,13E-05	bC	3,27E-07	aA	1,25E-05	dC	5,90E-06	aB	6,47E-06	aB	1,24E-05	bC	
4		8,21E-06	bB	1,93E-06	aA	9,74E-06	bB	1,32E-05	cdC	6,03E-05	eF	1,42E-05	cCD	1,59E-05	bD	3,64E-05	cE	
5		1,61E-05	dC	1,85E-05	eD	2,50E-05	eE	1,15E-05	cB	6,69E-06	cA	8,64E-06	bA	1,64E-05	bC	1,12E-05	cB	
7		4,46E-06	aB	1,54E-05	dC	2,06E-05	cdD	2,23E-05	eD	5,59E-06	bB	5,86E-06	aB	3,03E-05	cE	2,25E-06	aA	
9		2,76E-05	eC	4,87E-06	bB	4,64E-06	aB	5,67E-06	bB	1,57E-06	aA	4,70E-06	aB	5,05E-06	aB	4,45E-06	aB	
LOX ^b		1	5,72E-05	eD	2,67E-05	cB	3,53E-05	cC	5,18E-06	cA								
		2	4,91E-05	dC	5,42E-06	aA	6,15E-05	eD	1,51E-05	fB								
	3	4,19E-05	cE	8,01E-06	aBC	3,80E-06	aA	7,84E-06	eB	2,65E-05	bD	6,29E-06	aB	1,03E-05	bC	2,84E-05	cD	
	4	2,11E-05	aB	4,48E-05	dD	4,23E-05	dD	2,96E-05	gC	4,50E-05	cD	1,99E-05	cB	3,29E-06	aA	3,39E-05	dC	
	5	2,13E-04	fG	2,13E-05	bC	3,22E-05	cD	1,10E-06	aA	5,70E-05	eF	1,51E-05	bBC	9,25E-06	bB	4,42E-05	eE	
	7	1,53E-05	aC	6,20E-06	aB	5,11E-07	aA	6,83E-06	dB	1,94E-05	aD	1,48E-05	bC	1,98E-06	aA	6,21E-06	aB	
	9	3,38E-05	bF	1,81E-05	bBC	1,29E-05	bB	2,97E-06	bA	2,02E-05	aCD	6,75E-06	aA	2,72E-05	cE	2,49E-05	bDE	
	POX ^b	1	1,10	bA	1,08	bA	1,49	cdC	1,29	bB								
		2	1,52	cA	1,46	cA	1,78	eB	1,87	cB								
3		1,36	cB	0,83	aA	1,42	cB	0,86	aA	1,55	abB	1,02	aA	1,92	cB	1,95	bcC	
4		1,13	bBC	1,43	cDE	0,86	aA	1,25	bCD	1,57	abE	1,05	aB	1,59	bEF	1,78	cF	
5		0,86	aA	1,21	bC	1,26	bC	1,06	abB	1,94	cD	1,34	bC	1,31	aC	2,06	cD	

	7	0,66	aA	0,83	aAB	0,95	aB	1,02	abBC	1,50	aD	1,78	bE	1,17	aC	1,20	aC
	9	1,46	cB	0,75	aA	1,56	dB	1,72	cB	1,65	bB	1,38	cB	2,16	dC	2,51	dD
CF ^e	1	7,43	eC	5,60	dB	3,96	cA	5,55	dB								
	2	8,88	fC	5,86	dB	6,13	dB	5,14	cA								
	3	4,01	bB	2,63	aA	8,28	eF	5,14	cC	5,12	dC	5,69	dD	6,81	cE	11,98	eG
	4	4,30	cD	7,17	eG	2,73	aA	4,16	bD	4,63	cE	3,41	bB	3,92	bC	6,78	cF
	5	3,41	aB	9,12	fF	2,80	aA	3,45	aB	4,97	dC	7,16	eD	2,63	aA	8,45	dE
	7	3,14	aB	5,09	cE	2,70	aA	5,28	cE	4,34	bD	3,94	cC	7,94	dF	2,63	aA
	9	5,48	dD	3,28	bB	3,38	bB	7,19	eE	2,63	aA	2,63	aA	8,64	eF	3,91	bC
SA ^d	1	807,67	bA	817,00	aB	807,00	bA	809,33	cA								
	2	835,33	dB	860,33	cC	865,33	dD	823,33	dA								
	3	817,33	cA	862,00	cD	850,33	cC	826,33	deB	820,67	bA	889,00	cE	887,00	dE	894,00	eE
	4	895,67	eB	926,00	eC	873,33	eA	895,67	fB	889,67	dB	872,33	bA	916,33	eC	889,67	dB
	5	926,00	fE	955,33	fF	927,33	fE	832,33	eB	883,33	dC	904,33	dD	798,67	aA	798,67	cA
	7	769,00	aAB	913,00	dD	929,00	fF	765,00	aA	776,00	aB	920,33	eE	826,67	cC	776,00	aB
	9	807,67	bD	826,67	bE	789,67	aBC	795,33	bC	868,67	cF	762,33	aA	804,67	bD	784,00	bB
SBF ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40,3125	D	12,375	B	1,234375	A	22,125	C

Médias seguidas por letras minúsculas (columns) iguais não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p=0,05$).

Médias seguidas por letras maiúsculas (rows) iguais na coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p=0,05$).

^a DPI= days post induction

^b U.mg⁻¹

^c µg de ácido gálico.mL de extrato⁻¹

^d ng.g⁻¹.

^e Severidade de brusone foliar foi medida seguindo uma escala de notas que varia de 0,5 até 82% de área foliar afetada.

Plantas tratadas com JA, ASM e JA+ASM e desafiadas com isolado virulento de *M. oryzae* (PY10900).

Assim como na ausência do fitopatógeno, as atividades das PRPs, bem como valores de CF e teores de SA oscilaram entre os tratamentos e, principalmente, dentre os tratamentos (Tabela 1). A atividade de GLU foi mais intensa nas plantas que receberam a aplicação dos indutores em conjunto (JA+ASM) no primeiro dia após o desafio com o patógeno (3DPI e 9DPI). Nos quatros períodos seguintes avaliados (4DPI, 5DPI e 7DPI) os maiores valores foram encontrados nas plantas induzidas com ASM. De modo geral, a atividade de PAL foi crescente nos dois primeiros dias após o desafio (3DPI e 4DPI) em todos os tratamentos; nenhum tratamento apresentou atividade superior ou estatisticamente diferente daquela encontrada na testemunha. No 4DPI as plantas induzidas com JA foram as únicas superiores à testemunha e no 5DPI, foram as induzidas com ASM. Somente no 7DPI é que todos os outros tratamentos se diferenciaram da testemunha, onde as plantas induzidas com ASM apresentaram maiores de PAL. Os maiores valores de LOX foram observadas nas plantas induzidas apenas com JA, exceto no 5DPI. LOX apresentou um aumento contínuo do 3DPI ao 5DPI, decrescendo nos últimos períodos avaliados. Dentre os tratamentos que receberam agentes indutores, as plantas tratadas com ASM tiveram maior atividade de POX. Apenas no penúltimo período avaliado (7DPI) é que observou-se uma atividade de POX nos tratamentos induzidos (JA e JA+ASM) superior àquela registrada nas testemunhas. Os valores de CF foram maiores no 3DPI do que no 4DPI. Os valores de CF foram maiores na testemunha quase todos os tempos analisados, exceto no 7 DPI, onde as plantas induzidas tiveram maiores índices de CF, e no 9 DPI onde somente as plantas induzidas com ASM apresentaram valores superiores aos demais. De modo geral, houve um decréscimo constante na quantidade de CF nos tratamentos analisados, com exceção das plantas tratadas com ASM onde no 7DPI os valores aumentaram e no 9DPI observou-se seu pico. Na presença de *M. oryzae*, os teores de SA, no 3DPI, foi maior nas plantas induzidas com JA+ASM sem, no entanto, diferir da testemunha. Já no 4DPI, ASM apresentou o maior teor de SA e foi o único tratamento superior à testemunha. Plantas induzidas com JA+ASM apresentaram os maiores teores de SA no 5DPI e, juntamente com JA, foram os tratamentos com níveis deste hormônio maior do que os da testemunha. No 7 DPI e 9DPI, os maiores níveis de SA foram observados nos tratamentos JA+ASM e JA, respectivamente.

3.3. Análise de Componentes Principais (PCA).

Os três primeiros componentes explicaram 74,13% da variância observada, com valores de 35,78%, 21,55% e 16,8% para PC1, PC2 e PC3, respectivamente (Figura 2). A maioria dos resultados foram suportados principalmente pelos três primeiros componentes da PCA. As PRPs LOX, POX e GLU, juntamente com SBF mostraram grande influência na variância observada no PC1. A variância encontrada no PC2 foi influenciada principalmente pelo DPI, SA e CF. A variância encontrada no terceiro componente (PCA3) foi influenciada por PAL e também por POX, CF e SA.

Severidade de brusone foliar (SBF) foi negativamente correlacionada com GLU. Em contraste com GLU, LOX e POX por sua vez foram positivamente correlacionadas com SBF (Tabela 2). A variável DPI está correlacionada de forma negativa com CF e SA, indicando que seu valores tendem a diminuir com o passar do tempo. Os níveis de CF foram correlacionados positivamente com POX e claramente influenciáveis pelo hormônio SA e pela enzima PAL, ambos com valores negativos de correlação com esta primeira variável.

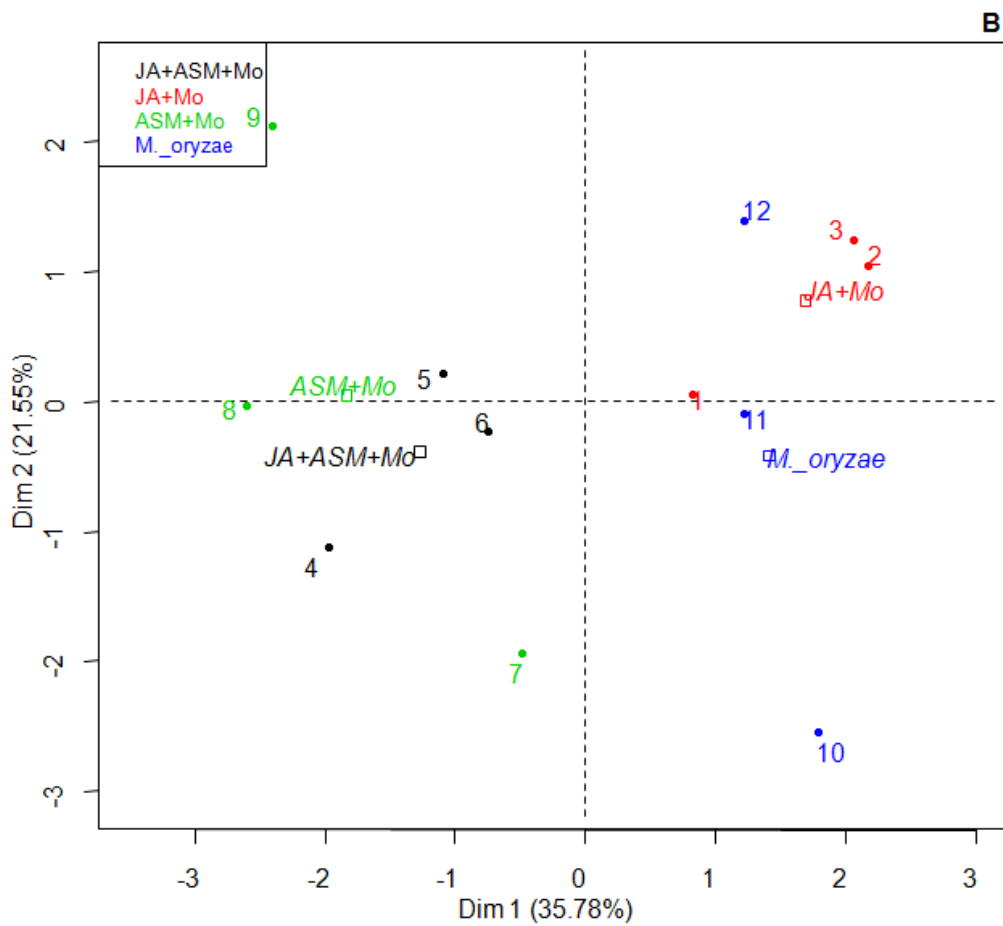
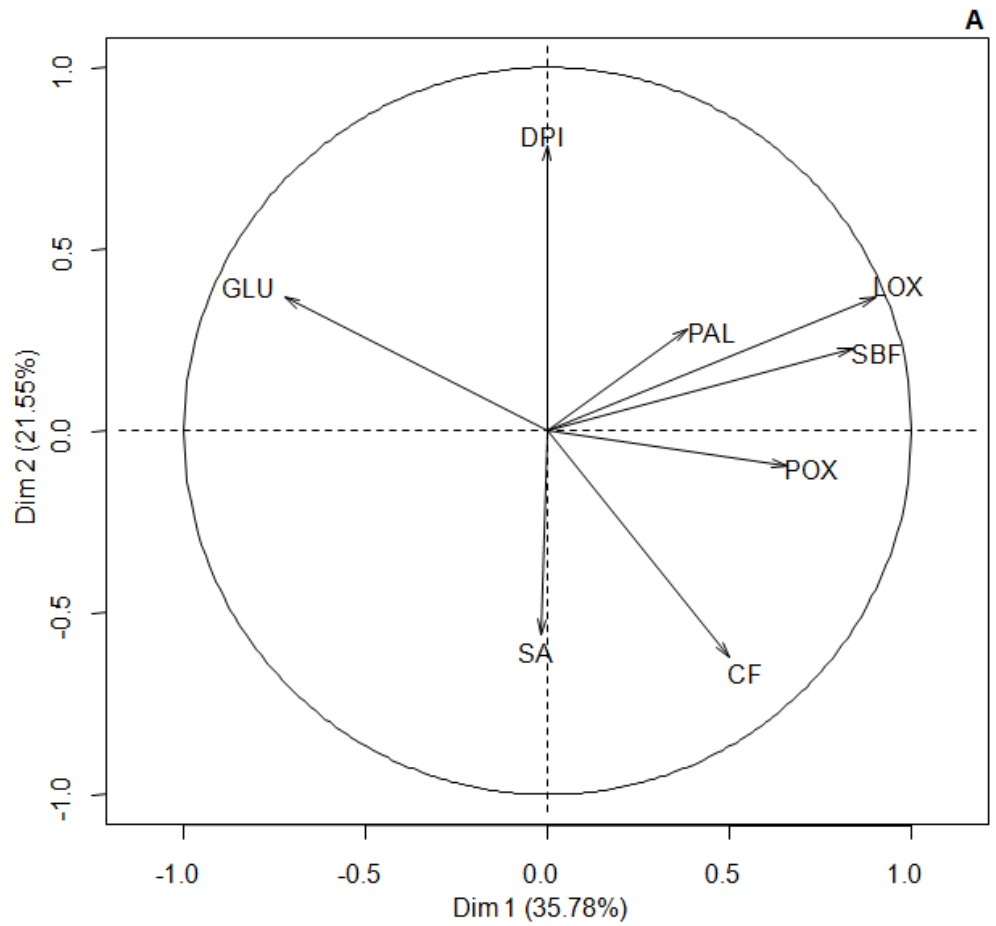


Figura 2 - PCA biplot com variáveis de investigadas na indução de resistência de plantas de arroz com JA, ASM e JA+ASM desafiadas com *M. oryzae* (Mo) de acordo com os dois primeiros componentes. A-correlação entre as variáveis; B-distribuição dos dados.

Tabela 2. Matriz de correlação das variáveis relacionadas a indução de resistência em arroz para controle da brusone foliar (*Magnaporthe oryzae*) por JA, ASM e JA+ASM e dimensões da análise de componentes principais com significância de $p < 0.05$.

Variables	PCA1	PCA2	PCA3
Rice blast severity	0.838	NS	NS
Days post induction	NS	0.784	NS
B-1,3 Glucanase	-0.723	NS	NS
Peroxidase	0.656	NS	0,542
Phenylalanine ammonia-lyase	NS	NS	-0,672
Lipoxygenase	0,9	NS	NS
Phenolic compounds	NS	-0,621	0,452
Salicylic acid	NS	-0,559	-0,443
Explained Variance	47,99%	22,66%	17,22%
Cumulative Variance	47,99%	70,65%	87,87%

NS = not significant at $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Neste presente trabalho, as plantas de arroz tratadas com os agentes indutores abióticos JA e ASM apresentaram diferentes porcentagens de severidade de doença quando desafiadas por *M. oryzae*. A aplicação de JA tornou as plantas mais suscetíveis a infecção causada por *M. oryzae*. A maior área foliar afetada pela doença foi encontrada neste tratamento, inclusive maior do que na testemunha, no qual apresentou o coalescimento de lesões o que levou à morte de muitas folhas desafiadas e, eventualmente, da planta inteira (Figura 1D).

A aplicação de ASM nas plantas 48hs antes do desafio com o patógeno suprimiu a doença, com a presença de lesões de respostas de hipersensibilidade (Figura 1B) e tem demonstrado ser ativador de mecanismos de defesa, com características de indução de resistência sistêmica (Liu *et al.*, 2008). A indução feita com a mistura dos dois compostos (JA+ASM) diminuiu a severidade da brusone foliar (Tabela 1). Apesar de não impediu o estabelecimento da infecção, com a presença de lesões abertas (Figura 1C), a área lesionada foi menor do que na testemunha (*M. oryzae*) (Figura 1E).

Entretanto, os resultados da SBF sugerem que há um antagonismo entre ASM e JA. O *crosstalk* entre JA e SA é bem documentado e comumente se manifesta como antagonismo recíproco (Thaler *et al.*, 2012). Também há evidências que plantas de abóbora induzidas com a mistura de JA com ASM, que é análogo do SA, ficaram mais suscetíveis ao ataque de patógenos do que plantas tratadas apenas com o indutor ASM (Liu *et al.*, 2008). A suscetibilidade de plantas ao ataque de patógenos biotróficos pode acontecer quando suas folhas são expostas ao JA (Liu *et al.*, 2008). SA é relacionado com resistência a patógenos biotróficos e JA ativa as defesas da planta contra patógenos necrotróficos (Thaler *et al.*, 2012). *M. oryzae* é um patógeno hemibiotrófico, iniciando a infecção com a forma biotrófica de colonização (Dean *et al.*, 2012) e nessa fase da doença, o SA desempenha papel importante nas respostas de defesa. Devido ao *crosstalk* existente entre esses dois hormônios vegetais, a aplicação de JA aumenta a resistência contra a colonização necrotrófica, entretanto, provoca uma queda nos níveis de SA e aumenta a suscetibilidade à fase biotrófica da colonização (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Nos dois primeiros dias após a indução, todos os tratamentos apresentaram níveis crescentes da atividade de GLU. Já nos períodos avaliados após o desafio com *M. oryzae*, a atividade dessa enzima oscilou. A presença de acibenzolar-S-metil aumentou a

atividade de GLU nas plantas após o desafio com o patógeno. No 3DPI e 4DPI, os maiores valores foram encontrados em plantas tratadas com JA+ASM e ASM, respectivamente. Assim como demonstrado neste trabalho, o pré-tratamento de plantas com ASM induziu a um aumento na atividade de GLU e em outras defesas das plantas, demonstrando ser efetivo na proteção contra patógenos virulentos (Niki *et al.*, 1998; Fidantsef *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2008).

Neste estudo nós examinamos se os tratamentos influenciam na atividade de PAL. Nos dois primeiros dias de indução, plantas que receberam ASM como tratamento apresentaram maior atividade dessa enzima. Outros estudos também demonstraram a atividade indutora de ASM em plantas induzidas por aumentar a expressão de PAL em plantas tratadas (Cools & ISHII, 2002). Na presença do patógeno, os maiores índices de PAL foram observados nas plantas que foram induzidas somente com JA nos dois primeiros dias após o desafio (3DPI e 4DPI), com valores muito superiores àqueles registrados nos tratamentos com ASM. Ao contrário do que acontece na interação muitas vezes antagônicas entre ácido jasmônico e ácido salicílico, há estudos que sugerem o papel indutor de jasmonatos na atividade de PAL (Sharan *et al.*, 1998) indicando a existência de outra natureza de regulação entre a via dos fenilpropanóides e os jasmonatos.

Os maiores valores referentes a atividade de LOX foram observado em plantas induzidas somente com JA. Apenas no 1DPI é que todos os tratamentos tiveram uma atividade de LOX acima do nível observado no controle. A aplicação exógena de ácido jasmônico induziu a atividade de LOX. Em todos os dias avaliados, os maiores picos de atividade dessa enzima foram encontrados nas plantas induzidas com este hormônio, na presença ou na falta de *M. oryzae* (Tabela 1). JA é o produto final da via dos octadecanóides e é uma molécula sinalizadora importante para ativação de vias de defesa nas plantas da qual LOX é uma das principais enzimas envolvidas (Liu *et al.*, 2015). Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que JA pode estimular a atividade de LOX via mecanismo de retroalimentação. Kim *et al.* (2003) observaram em plântulas de milho a ativação de genes relacionados com LOX pela aplicação de metil-jasmonatos. Antes do desafio, a atividade de LOX nas plantas tratadas com ASM foi maior do que no controle (H₂O) no 1DPI e 2DPI e quando inoculadas, apresentaram uma baixa atividade comparada aos outros tratamentos também desafiados, não sendo superior a testemunha em nenhum dos tempos avaliados. Resultados semelhantes foram encontrados por Khalili *et al.* (2009) quando aplicou SA em *Silybum marianum*, onde a

atividade de LOX foi maior nas primeiras horas após a indução, decrescendo nos períodos seguintes avaliados. Alguns fitopatógenos podem estimular a produção de hormônios vegetais, como etileno e JA; este último possui efeito antagônico ao SA fazendo seu nível decrescer, favorecendo assim a colonização (Pieterse *et al.*, 2009).

A atividade de POX foi crescente em todos os tratamentos antes do desafio. A aplicação de ASM induziu um aumento na atividade dessa enzima, sendo este o único tratamento que se diferenciou do controle na ausência do patógeno e, na presença de *M. oryzae*, apresentou o maior nível de atividade de POX no dia imediato ao desafio (3DPI) (Tabela 1). A aplicação de JA e ASM em conjunto, quando comparado a outros tratamentos, mostrou-se ineficaz na indução dessa enzima. Assim como a aplicação conjunta dos agentes indutores, as plantas induzidas com JA não apresentaram um aumento na atividade de POX quando comparados ao controle. Na presença do patógeno, os níveis de POX só foram maior do que os da testemunha no 7DPI. Uma das primeiras respostas de defesa produzida pelas plantas é a explosão oxidativa, com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), evento no qual POX tem papel importante (Dayme *et al.*, 2016). Além de afetar diretamente o patógeno, EROs atua como mensageiros ativando outros mecanismos de defesa, desencadeando reações de hipersensibilidade (RH) (Liu *et al.*, 2008; Dayme *et al.*, 2016), como observado nas plantas induzidas com ASM (Figura 1B).

Os valores de CF variaram dependendo do(s) elicitor(es) aplicado(s). Nas plantas induzidas com JA, o nível de CF após o desafio foi crescente e maior do que o controle nos dois dias antes do desafio. Quando aplicados em conjunto, os agentes indutores não alteraram o conteúdo de CF nas plantas de arroz. Nas plantas induzidas com ASM, os valores de CF foram crescentes, mas apenas no 2DPI que diferenciaram-se do controle (Tabela 1). Após o desafio, nos três primeiros dias subsequentes a inoculação, os valores de CF foram maiores na testemunha. No 3DPI, somente plantas tratadas com ASM diferiram do controle (H₂O) sem, no entanto, diferir da testemunha (*M. oryzae*), diminuindo com o tempo. Em bananas, o nível de CF aumentou após a exposição de plantas a metil-jasmonato, com valores superiores do que em plantas induzidas com SA, apesar de este último tratamento ser superior aos controles (Ncho *et al.*, 2016). Estes resultados sugerem que em arroz, a ação elicitora na produção de CF é relacionada ao tipo do elicitor.

As plantas tratadas com os indutores abióticos mostraram diferentes níveis de SA. Em geral, antes do desafio, as plantas apresentaram níveis crescentes de SA. Neste

trabalho, os maiores valores de SA foram anotados nas plantas induzidas com ASM, de forma isolada ou conjunta com JA (Tabela 1). A aplicação em conjunto de JA e ASM provocou um aumento de SA no 1DPI quando comparado com o controle. No 2DPI todos os tratamentos diferiram do controle, onde o pico de SA foi observado nas plantas tratadas com ASM. Observou-se um acúmulo de SA nos dois primeiros períodos avaliados após o desafio em plantas induzidas com ASM, com valores iguais ou superiores aos da testemunha em 3DPI e 4DPI, respectivamente. A ausência do acúmulo de SA em plantas induzidas com ASM tem sido confirmada em plantas de abóbora (Orober *et al.*, 2002) bem como em plantas de fumo (Friedrich *et al.*, 1996) entretanto, essas plantas exibiram sinais de indução de resistência com um aumento na produção de PRPs, de uma forma não-dependente de SA. Isso sugere que em arroz, ASM pode induzir a resistência de modo similar àquele desencadeado por SA.

Três componentes da PCA foram responsáveis por 74,13% da informação presente no conjunto das oito variáveis analisadas. A severidade de brusone foliar (SBF) e atividade de LOX foram fortemente associadas ao primeiro componente da PCA (Tabela 2) e ambas com altos valores de correlação. A maior atividade de LOX foi observada em plantas com altos índices de doença (Tabela 2). LOX são enzimas que catalisam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e são uma das principais enzimas envolvidas na biossíntese de JA (Wang *et al.*, 2008). Esse hormônio possui papel importante na defesa da planta na fase necrotífica da infecção de *M. oryzae*. Por ser um fungo hemibiotrófico, *M. oryzae* possui o modo biotrófico de nutrição (Vleeschauwer *et al.*, 2013), e nesse estilo de colonização SA está associado às respostas de defesa, entretanto, JA e SA possuem uma relação antagônica. Quando níveis de JA estão altos nas etapas iniciais da infecção, a colonização dos tecidos foliares pelo patógeno é favorecida devido ao baixo teor de SA nesse período (Thaler *et al.*, 2012). Esses resultados corroboram com aqueles encontrados no capítulo 1, onde plantas com maiores concentração de SA apresentaram menor severidade e plantas com maiores valores de LOX mostraram maiores índices de brusone. SBF também foi correlacionada com GLU. A associação dessa PRP com a severidade de doença indica a sua importância no controle da brusone foliar. Isso foi confirmado por outros trabalhos (Filippi *et al.*, 2007; Filippi *et al.*, 2011) e demonstrado aqui onde após o desafio com o patógeno, os tratamentos JA+ASM e principalmente ASM, plantas com maiores níveis de GLU, tiveram menor índices de SBF. GLU hidrolisa polímeros β -1,3-glucana que é um dos principais componentes da parede celular de fungos (Ferreira *et al.*, 2007).

Apesar de plantas tratadas com ASM mostrarem os menores índices de SBF e uma alta atividade de POX, as testemunhas e plantas induzidas com JA, que tiveram altos índices de doença, também apresentaram uma alta atividade de POX. Isso pode ser devido a presença do patógeno e o contínuo progresso da doença. Proteínas da família PR9 possuem atividade de peroxidase podem ser ativadas por indutores abióticos como ASM (Liu *et al.*, 2008) e também por estresses bióticos como ataque de patógenos (Daymi *et al.*, 2016). A correlação negativa de DPI com CF e SA indica que os níveis dessas duas últimas variáveis tendem a decrescer com o tempo. SA e CF mostraram influência na variância do segundo componente, com correlação positiva entre si. O aumento na quantidade de CF é uma resposta observada quando plantas possuem SA como elicitor. Ambos são componentes importantes em respostas de defesa de plantas onde SA atua como componente elicitor e CF são uma das respostas de defesa desencadeada por este hormônio (Misra *et al.*, 2014). A correlação positiva entre POX e CF observada em PC3 sugere uma relação entre essas duas variáveis. Uma das primeiras respostas de defesa da planta a estresses é a produção de EROs onde POX desempenha papel primordial (Camejo *et al.*, 2016). Dentre os mecanismos desencadeados por EROs estão a morte celular via HR e produção de CF. A produção de compostos fenólicos pode desencadear como lignificação da parede celular, estímulo da via dos fenilpropanóides, aumentando a síntese de SA e também o acúmulo de fitoalexinas (Misra *et al.*, 2014). Essas duas características, atividade de POX e acúmulo de CF, foram observadas neste trabalho e são comumente utilizadas para identificar respostas de hipersensibilidade. PAL também foi correlacionada negativamente com os CF. Houve uma alternância entre a atividade de PAL e a quantidade de CF. Na maioria dos tratamentos, quando o valor de uma dessas variáveis estava em alta, o valor da outra estava em baixa (Tabela 1). PAL é uma enzima chave na síntese dos CF (Ferreira *et al.*, 2007). Sua atividade decresce a medida que o substrato é consumido e o produto da reação vai sendo formado.

5. CONCLUSÃO

A aplicação de acibenzolar-S-metil foi eficiente na supressão da doença; plantas com ele tratadas apresentaram RH entre 48-72hs após o desafio com o isolado PY10900.

Houve *cross-talk* entre JA+ASM em plantas induzidas com ambos indutores. Em plantas tratadas com JA+ASM a SBF foi maior do que nas plantas induzidas só com ASM. Entretanto, a área afetada pela doença foi menor do que aquela observada nas plantas que receberam apenas JA como indutor.

A aplicação de JA aumentou a suscetibilidade do arroz a *M. oryzae* onde a SBF de plantas por ele induzidas apresentaram maiores valores do que na testemunha.

A indução de resistência observada nas plantas pulverizadas com ASM pode estar também relacionada com a atividade de GLU, POX e concentração de SA, que foram maiores e crescentes nessas plantas.

A atividade de LOX foi estimulada pela aplicação exógena de JA e foi relacionada com alta porcentagem SBF, sugerindo que o aumento da atividade dessa enzima nas fases iniciais da infecção não favorece a defesa da planta. A análise multivariada mostrou a importância da interação entre as respostas de defesa para o controle da doença.

Apesar de muitos autores estudarem o antagonismo entre as rotas de sinalização do SA (e análogos) e JA, este é o primeiro trabalho que registra o antagonismo entre esses dois indutores aplicados de forma exógena em arroz, avaliando suas respostas de defesa e sua consequência no controle e/ou evolução da doença.

6. LITERATURA CITADA

- AXELROD, B.C.; CHEESBROUGH, T.M. & LAASKO, S.L. 1981. Lipoxygenase from soybean. *Methods in Enzymology* 71:441-451.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72:248–254.
- CAMEJO, D.; GUZMÁN-CEDENO, A. & MORENO, A. 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103:10-23.
- CÔRTEZ, M.V.C.B.; VIANA, H.F.; SILVA, F.R.; SILVA-LOBO, V.L.; SILVA, G.B.; PRABHU, A.S. & FILIPPI, M.C.C., 2008. Quantificação da atividade enzimáticas de proteínas relacionadas à patogênese no patossistema *Oryza sativa/Magnaporthe oryzae*. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás.
- COOLS, H.J. & ISHII, H. 2002. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61:273-280.
- DAYMI, C.; GUZMÁN-CEDENO, A. & MORENO, A. 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103:10-23.
- DEAN, R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J. & FOSTER, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:414-430.
- DICKO, M.H.; HILHORST, R.; GRUPPEN, H.; TRAORE, A.S.; LAANE, C.; van BERKEL, W.J.H. & VORAGEN, A.G.J. 2002. Comparison of content in

phenolic compounds, polyphenoloxidase, and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3780-3788.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; BORGES, A. & TEIXEIRA, A.R. 2007. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 8:677-700.

FIDANTSEF, A.L.; STOUT, M.J.; THALER, J.S.; DUFFEY, S.S. & BOSTOCK, R.M. 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54:97-114.

FILIPPI, M.C. & PRABHU, A.S. 2001. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:27-35.

FILIPPI, MARTA C.C.; SILVA, GISELE B. & PRABHU, ANNE S. 2007. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. *Fitopatologia Brasileira* 32:387-392.

FILIPPI, M.C.C., SILVA, G.B., SILVA-LOBO, V.L., CÔRTEZ, M.V.C.B., MORAES, A.J.G., PRABHU, A.S., 2011. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, 58:160-166.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; RELLA, M.G.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J.P.; KESSMANN, H. & RYALS, J. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal* 10:61-70.

KEESEY, J. 1987. *Biochemica Information*. Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis.

- GLAZEBROOK, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43:205-227.
- JIANG, C.J.; SHIMONO, M.; SUGANO, S.; HOJIMA, M.; YAZAWA, K.; YOSHIDA, R.; INOUE, H.; HAYASHI, N.; SAKAKIBARA, H. TAKATSUJI, H. 2010. Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice–*Magnaporthe grisea* interaction. *Molecular Plant Microbe Interactions* 23:791-798.
- KHALILI, M.; HASANLOO, T.; TABAR, S.K. & RAHNAMA, H. 2009. Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in hair root cultures of *Silybum marianum*. *Cell Biology International* 33:988-994.
- KIM, ES.; CHOI, E.; KIM, Y.; CHO, K.; LEE, A.; SHIM, J.; RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K. & HAN, O. 2003. Dual positional specificity and expression of non-traditional lipoxygenase induced by wounding and methyl jasmonate in maize seedlings. *Plant Molecular Biology* 52:1203-1213.
- LIU, C.; RUAN, Y.; LIN, Z.; WEI, R.; PENG, Q.; GUAN, C. & ISHII, H. 2008. Antagonism between acibenzolar-*S*-methyl-induced systemic acquired resistance and jasmonic acid-induced systemic acquired susceptibility to *Colletotrichum orbiculare* infection in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72:141-145.
- LIU, Z.; ZHANG, S.; SUN, N.; LIU, H.; ZHAO, Y.; LIANG, Y.; ZHANG, L. & HAN, Y. 2015. Functional diversity of jasmonates in rice. *Rice* 8:5:1-13.
- MISRA, N.; MISRA, R.; MARIAM, A., YUSUF, K. & YUSUF, L. 2014. Salicylic acid alters antioxidant and phenolics metabolism in *Catharanthus roseus* grown under salinity stress. *African Journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM* 11:118-25.

- MEHER, H.C.; GAJBHITE, V.T. & SINGH, G.A. 2012. Liquid chromatography method for determination of selected amino acids, coenzymes, growth regulators, and vitamins from *Cicer arietinum* (L.) and *Solanum lycopersicum* (L.). *Journal AOAC International* 95:1142-1152.
- NAFISI, M.; FIMOGNARI, L. & SAKURAGI, Y. 2015. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry* 112:63-71.
- NAHAR, K.; KYNDT, T.; NZOGELA, Y.B. & GHEYSEN, G. 2012. Abscisic acid interacts antagonistically with classical defense pathways in rice-migratory nematode interaction. *New Phytologist* 196:901–913.
- NCHO, X.E.; DOUMBIA, M.L.; TRAORE, S.; KONAN, Y.K.F.; KONE, M. & KOUAKOU, T.H. 2016. Estimation of total phenolic compounds in treated leaves with methyl jasmonate and salicylic acid of banana (*Musa acuminata* L. AAA group cv. Grand Naine) susceptible to the Black Leaf Streak Disease. *Agricultural Science Research Journal* 6:175-181.
- NIKI, T.; MITSUHARA, I.; SEO, S.; OHTSUBA, N. & OHASHI, Y. 1998. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology* 39:500–7.
- NOTTEGHEM, J.L. 1981. Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. In: *BLAST and upland rice: report and recommendations from the meeting for international collaboration in upland rice improvement*. International Rice Research Institute, Los Baños, p.43-51.
- OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, B. & STAUB, T. 2002. Mechanism of phosphate-induced disease resistance in cucumber. *European Journal of Plant Pathology* 108:345–53.

- PAN, S.Q.; YE, X.S. & KUC, J. 1991. Association of a b-1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mold in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with *Tobacco Mosaic Virus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:25-39.
- PIETERSE, C.M.J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S. & WEES, C.M.V. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5:308-316.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M. & JONES, J.D.G., 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49:317-43.
- SAIKIA, S.; PARKER, E.J.; KOULMAN, A. & SCOTT, B. 2006. Four gene products are required for the fungal synthesis of the indole-diterpene, paspaline. *FEBS Letters* 580:1625–1630.
- SHARAN, M.; TAGUCHI, G.; GONDA, K.; JOUKE, T.; SHIMOSAKA, M.; HAYASHIDA, N. & OKAZAKI, M. 1998. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science* 132:13-19.
- SPOEL, S.H. & DONG, X. 2008. Making sense of hormone Crosstalk during plant immune responses. *Cell Host and Microbes* 3:347-351.
- THALER, J.S.; HUMPHREY, P.T. & WHITEMAN, N.K. 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* 17:260–270.
- De VLEESSCHAUWER, D.D.; GHEYSEN, G. & HOFTE, M. 2013. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in Plant Science* 18:555-565.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.M.A. & KLESSING, D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47:177–206

CAPÍTULO 4

Comparação do transcriptoma de arroz de terras altas induzidos com rizobactéria promotora de crescimento *Serratia* sp. e isolados avirulento e virulento de *Magnaporthe oryzae*.

Comparação do transcriptoma de arroz de terras altas induzidos com rizobactéria promotora de crescimento *Serratia* sp. e isolados avirulento e virulento de *Magnaporthe oryzae*.

RESUMO

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) e fitopatógenos ativam mecanismos de defesa contra uma ampla gama de patógenos de plantas por meio da indução de resistência. Este estudo objetivou identificar alguns genes diferencialmente modulados em planta de arroz tratado com um isolado de *Serratia* sp., e dois isolados de *Magnaporthe oryzae*, um avirulento (AVR) e outro virulento (VIR), comparando as respostas de defesa desencadeadas por esses agentes indutores, em buscas de novas fontes de resistência à brusone foliar. Plantas induzidas com PGPR, AVR e desafiadas com VIR tiveram seu RNA total extraído e levados a sequenciamento do transcriptoma via RNAseq. A análise dos genes diferencialmente expressos (DEG) identificaram 1666, 2118 e 1600 genes modulados em respostas a PGPR, AVR e VIR, respectivamente. As rotas do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) e genes responsivos foram ativadas em PGPR, AVR e VIR, com DEGs exclusivos em cada tratamento. Proteínas relacionadas a patogênese (PRPs) de sete atividades enzimáticas diferentes apresentaram DEG nas condições avaliadas, muitas com diferença expressiva entre os tratamentos. Um maior número de genes de fatores de transcrição da família WRKY foram encontrados em AVR e PGPR. Genes que codificam proteínas quinases ativadas por mitógeno e aqueles conhecidos com genes R foram DEG principalmente em AVR, entretanto, apresentaram-se genes exclusivos à cada agente indutor. Plantas em VIR apresentaram maior número de DEGs que codificam fitoalexinas. Genes que medeiam a interação entre vias hormonais também foram DE. OsNPR4 foi modulado diferencialmente em AVR e PGPR; já OsSLR1 foi responsivo apenas em VIR. Os dados de qPCR confirmaram a validade dos níveis de expressão encontrados pela técnica de RNAseq. Este é o primeiro estudo comparativo entre respostas de defesas ativadas por diferentes agentes indutores. Os resultados sugerem genes que podem ser usados como marcadores de indução bem como possíveis candidatos à fontes de resistência para melhoramento visando controle de fitodoenças do arroz.

Palavras-chave: Brusone, *priming*, RNA-seq, *Serratia* sp., sinalização hormonal.

Comparison of the transcriptome of upland rice induced by growth promoting rhizobacterium *Serratia* sp. and avirulent and virulent isolates of *Magnaporthe oryzae*.

ABSTRACT

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and phytopathogens can enable defense responses by inducing resistance, activating defense mechanisms against a wide range of pathogens. This study aimed to identify differentially modulated genes in rice inoculated with *Serratia* sp., *Magnaporthe oryzae* avirulent (AVR) and *M. oryzae* virulent (VIR), comparing the defense responses triggered by these inducing agents, in search of new sources of resistance to leaf blast. Plants induced with PGPR, AVR and challenged with VIR had their total RNA extracted and led to transcriptome sequencing through RNAseq. Analysis of differentially expressed genes (DEG) identified 1666, 2118 and 1600 genes modulated in responses to PGPR, AVR and VIR, respectively. Salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) and responsive genes were activated in PGPR, AVR and VIR, with DEGs unique to each treatment. Pathogenesis related proteins (PRPs) of seven different enzymatic activities had DEG under the conditions evaluated, many with great difference between treatments. A higher number of DEG WRKY transcription factors were found in AVR and PGPR. Genes that encode mitogen activated protein kinases and those known as R genes were mainly found in AVR, however, presented unique genes to each inducing agent. Plants challenged with VIR had higher numbers of DEGs that encode phytoalexins. Genes that mediate the interaction between hormonal pathways were also differentially expressed. OsNPR4 was differentially modulated in AVR and PGPR and OsSLR1 was responsive only in VIR. The qPCR data confirmed the validity of expression levels found by the RNAseq technique. This is the first comparative study approaching responses of defenses activated by different inducing agents. The results provide support for the importance of the activation of genes involved in the induction of resistance at initial moments of the response defense responses, highlighting genes that can serve as induction markers as well as possible candidates for resistance sources for plant breeding aimed at genetic control of diseases .

Key words: Hormonal signaling, priming, rice blast, RNA-seq, *Serratia* sp.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é a segunda espécie de planta mais cultivada no mundo, e devido ao crescimento da população mundial, há uma necessidade do aumento de aproximadamente 40% da produção desse cereal (Khush, 2005). Além desse desafio, a orizicultura é faceada por estresses bióticos, sendo a brusone a principal doença que acomete a cultura. Esta doença, causada por *Magnaporthe oryzae*, é de difícil controle. O melhoramento visando resistência durável a brusone é tarefa difícil devido à alta variabilidade do patógeno, sendo necessária a busca de novas ferramentas de manejo e o melhoramento das estratégias já existentes.

Para se contra-atacarem patógenos, plantas se protegem principalmente com sistema imune de duas categorias. Servindo-se de receptores localizados nas superfícies das células, plantas reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e/ou a microrganismos (MAMP). Esses receptores são moléculas estruturalmente conservadas presentes em uma ampla gama de microrganismos patogênicos, relacionados com PAMP, e benéficos, relacionados com MAMPs. Muitos desses padrões moleculares são produtos de genes *housekeeping* ou componentes de paredes celulares e podem induzir resistência em plantas. As respostas de defesa das plantas desencadeadas por padrões moleculares são conhecidos como imunidade desencadeada por PAMP e MAMP (PTI e MTI, respectivamente) (Schwessinger & Zipfel, 2008; Boller & Felix, 2009). Para que a infecção tenha sucesso, os patógenos usam efetores para suprimir as respostas de defesa ativada pelas plantas. O sistema defesa das plantas também evoluiu e possui a capacidade de detectar, direta ou indiretamente, esses efetores, colocando em ação a imunidade ativada por efetores (ETI). Vários desses elementos ativadores são comuns tanto a patógenos quanto a microrganismos benéficos, havendo semelhança também nas respostas de defesa por eles desencadeadas. ETI é constantemente acompanhada por reações de hipersensibilidade, incluindo a morte celular programada. No conjunto dessas respostas de defesa, ácido salicílico (SA) possui função importante na transdução de sinais. Outra molécula sinalizadora, etileno (ET), também está envolvido na manutenção dos reconhecimentos dos padrões moleculares na imunidade por eles ativadas (Mersmann *et al.*, 2010). Esse sistema é efetivo contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos, entretanto, plantas possuem sistema de defesa contra patógenos necrotróficos onde ET, juntamente com ácido jasmônico (JA), também está envolvido (Bakker *et al.*, 2007).

Para caracterizar respostas de plantas a determinados patógenos, a produção de hormônios e a ativação de outras componentes das respostas imunes responsivos aos hormônios podem servir como indicadores de indução de resistência. A interação entre arroz e *M. oryzae* é do tipo gene-a-gene, por isso mesmo, raças incompatíveis de *M. oryzae* podem ser usadas como ferramentas para investigar os mecanismos de resistência em arroz (Filippi *et al.*, 2007).

A cooperação entre microrganismos benéficos como rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR), além de resultar no aumento dos processos de crescimento, também ativa respostas de defesa das plantas. Estes fenômenos já foram estudados em arroz (Filippi *et al.*, 2011) entretanto, pouco se sabe das mudanças envolvidas a nível molecular, especialmente em arroz de terras altas. Há trabalhos que relatam que metabólitos secundários, proteínas relacionadas à patogênese (PRP) e hormônios são mecanismos encontrados em plantas tratadas com PGPR e que essas respostas podem ser potencializadas quando as rizobactérias são utilizadas em suas cultivares de origem (Droge *et al.*, 2014).

A caracterização dos determinantes genéticos, semelhantes e diferentes, envolvidos na regulação das respostas de defesa induzidas por patógenos e rizobactérias fornecem elementos para compreender os mecanismos envolvidos na indução de defesa em arroz e fornecem novas possibilidades de ferramentas para controle da doença e manejo da cultura. Estudos como este permite a identificação dos principais processos biológicos e categorias funcionais de genes relacionados a defesa contra brusone do arroz, não só em interações compatíveis e incompatíveis entre *M. oryzae* e *O. sativa* mas também em plantas de arroz induzidas com PGPR. Nesse sentido, RNAseq e outras ferramentas para o estudo de expressão gênica dão ensejo à essas oportunidades, possibilitando a identificação de genes modulados e envolvidos nos diversos processos desencadeados por esses agentes indutores.

O objetivo deste capítulo foi comparar o perfil dos transcriptomas obtidos durante a interação planta-indutor biótico/abiótico, analisando os genes modulados diferencialmente em resposta aos agentes indutores *Serratia* sp. e isolados avirulento e virulento de *M. oryzae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção de suspensão da PGPR *Serratia* sp. BRM 32114.

A rizobactéria utilizada neste estudo foi isolada da rizosfera de plantas de arroz provenientes de solos amazônicos, em primeiro ano de plantio de arroz, no município de Paragominas, Pará - Brasil e pertence a Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa com o número de acesso BRM32114. Esta bactéria foi identificada como pertencente ao gênero *Serratia* (número de acesso no GeneBank: KX378747). A PGPR foi crescida em placas de Petri, com meio 523 (Kado & Heskett, 1970) à 28 °C, por 24 horas. A suspensão de células bacterianas obtida foi ajustada para a uma absorbância de 550 nm de absorbância, correspondente a 10^8 UFC.mL⁻¹ e então aplicadas via rega em solos com plantas de arroz com 21 dias, 100 mL por bandeja.

Sementes da cultivar de arroz de terras altas BRS Primavera foram esterilizadas com álcool 70% e hipoclorito 2%, microbiolizadas com a suspensão bacteriana (150 rpm por 24h) e secas à temperatura ambiente antes de realizar o plantio. Sementes microbiolizadas com água foram utilizadas como tratamento controle.

2.2. Produção de inóculo do isolado avirulento de *M. oryzae*.

O isolado avirulento de *M. oryzae* PY10749 proveniente da coleção de microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão foi reativado em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) e multiplicado em placas de Petri com meio de aveia (aveia 2%, 1,5% ágar, p/v), durante 10 dias a 28 °C. A produção de conídios foi estimulada com a remoção do micélio aéreo da colônia de *M. oryzae*. Os conídios foram coletados com água destilada e esterilizada e 48 após, a suspensão será ajustada a 3×10^5 conídios.mL⁻¹ (Filippi & Prabhu, 2001) e inoculadas em plantas 21 dias após a semeadura.

2.3. Desafio das plantas de arroz com isolado virulento de *M. oryzae*.

Os isolados de *M. oryzae* foram reativados em meio BDA e multiplicado em placas de Petri contendo meio de Aveia (50g de aveia, 10g dextrose, 15g ágar, 1L água), durante 10 dias a 28 °C. A conidiogênese foi estimulada com a remoção do micélio aéreo, feito com auxílio de um bastão de vidro e as placas expostas a luz contínua sob alta umidade, durante 48 horas. Os conídios foram coletados com água destilada e

esterilizada e a suspensão ajustada a 3×10^5 conídios.mL⁻¹ seguindo o método de Filippi & Prabhu, 2001, e inoculadas em plantas, 19 dias após a semeadura.

2.4. Extração de RNA.

Para análise dos transcriptomas, amostras da parte aérea das plantas induzidas com a rizobactéria BRM321144, *M. oryzae* VIR (PY10900), *M. oryzae* AVR (PY10749) foram coletadas juntamente com o controle (H₂O). O experimento foi delineado em blocos ao acaso (DBC). Cada tratamento possui 3 bandejas com uma média de 80 plantas em cada. Vinte e quatro horas após a indução, coletou-se aleatoriamente das bandejas 30 plantas por tratamento. A cada dez plantas foi considerado uma réplica biológica, sendo, portanto, três réplicas por tratamento. As partes aéreas das plantas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C. O RNA total foi extraído usando nitrogênio líquido. A extração de RNA foi realizada com o kit *Sigma's Spectrum™ Plant Total RNA Kit* seguindo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi ressuscitado em água *milli-Q* RNase-free e armazenado a -80°C. A quantidade e a qualidade do RNA foi analisada por meio do NanoVue™ (GE Healthcare Life Sciences).

2.5. Sequenciamento de RNA e análise de bioinformática.

No total 12 amostras (três de cada tratamento) foram enviadas para sequenciamento no Centro de Genômica Funcional - Esalq (Piracicaba, SP, Brasil). As amostras foram submetidas a exame de qualidade e aquelas cujo perfil do BioAnalyser (Agilent Technologies CA, USA) com um RIN maior do que 6.5 foram sequenciadas. A plataforma utilizada foi Illumina HiSeq2500 e as *reads* geradas foram do tipo *paired-end* (PE) com tamanho de 100 pb. As análises de bioinformática foram realizadas no laboratório de enzimologia do ICB - UFG. Os arquivos FastQC foram usados para observar a qualidade das bibliotecas antes e depois da trimagem. O tratamento inicial dos dados foi feito removendo as regiões com baixa qualidade (Phred < 20) e de adaptadores usando o programa Trimmomatic (versão 0.30). As *reads* foram filtradas e as que tinham menos de 25 nucleotídeos foram descartadas. As *reads* foram então alinhadas e mapeadas contra um genoma de referência de arroz (*Oryza sativa* ssp. *japonica*, Nipponbare- MSU Rice Genome version 7.0) usando o software TopHat (versão 2.0.8) em sua configuração padrão. A montagem do transcriptoma e a análise de expressão diferencial dos genes de cada biblioteca foi realizada com o software

Cufflinks (versão 2.1.1). Os níveis de expressão foram determinados usando o software Cuffdiff dentro do Cufflinks. As *reads* de cada biblioteca foram normalizadas levando em consideração o tamanho dos genes, tamanho da biblioteca e o número de *reads* de cada gene, levando em conta a abundância de fragmentos por quilobase de exon por milhões de fragmentos mapeados. Os níveis de expressão de cada amostra foram normalizadas com a amostra do tratamento controle (H₂O). Foram considerados *up-regulated* e *down-regulated* os genes com valores positivos e negativos, respectivamente. Dessa forma foi possível inferir quais genes foram também diferencialmente expressos quando comparado os três tratamentos indutores entre si. Isso nos permitiu saber se houve DEGs exclusivos em algum tratamento e se estes continuariam sendo DEG mesmo quando comparado com as outras condições. Os níveis de expressão diferencial foram considerados significativos utilizando o *False discovery rate* (FDR) do teste de Bejamini-Hochberg (P<0.05).

2.6. Validação de RNAseq pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa.

Vinte genes foram selecionados entre os genes diferencialmente expressos *in silico* para análise de expressão via RT-qPCR. O conjunto de *primers* foram desenhados com o software Primer Express Software v2.0 (Applied Biosystems) baseado nas sequências codificantes (CDS) dos genes selecionados a partir de seus transcritos. A qualidade dos primers foram avaliadas pelo programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT Technologies). O RNA foi extraído a partir da parte aérea macerada em nitrogênio líquido usando cadinho e pistilo usando Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. 500 µL do reagente Concert™ Plant RNA gelado foi adicionados aos microtubos com 200 mg do tecido macerado. A mistura foi homogeneizada em vórtex e deixada em repouso na horizontal em temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 5°C a máxima velocidade. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos com 100 µL de NaCl 5M já adicionados aos tubos e então misturados por inversão. Posteriormente foram adicionados 300 µL de clorofórmio gelado. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados por 10 min a 4 °C a 12000g para separar as fases. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo; o mesmo volume de isopropanol gelado foi adicionado; as amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 10 min a temperatura ambiente para precipitar. As amostras foram novamente centrifugadas por

10 min a 4 °C a 12000g e o sobrenadante foi então descartado. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e levados à centrifugação por 1 min a 12000g a 4 °C. O líquido residual foi removido com auxílio de pipeta e os microtubos postos a temperatura ambiente para secagem total do etanol. O RNA foi ressuscitado em 30 µL de água *milli-Q* e armazenado a -80 °C. Para síntese de cDNA, o RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen™) para digerir o DNA presente nas amostras. Quatro microgramas de RNA de cada amostra passaram por transcrição reversa usando a transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen™) seguindo as instruções do fabricante. Ao RNA foi adicionado 2 µg de oligo dT, 2 µg de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - 10 mM) e o volume final ajustado para 24 µL com H₂O *milli-Q*. Os microtubos foram levados a incubação por 65 °C por cinco minutos. Em seguida, adicionou-se 8 µL de tampão 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 4 µL de DTT 100 mM, 2 µL de RNaseOUT™ e 2 µL de transcriptase reversa SuperScript II. O mix foi incubado por 40 °C por 50 min. A reação foi inativada a 70 °C por 15 min. As amostras agora contendo cDNA foram imediatamente congeladas a -20 °C. A PCR quantitativa foi realizada utilizando o Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen™). O volume total de cada reação foi de 10 µL, contendo 5 µL de SuperMix-UDG, 1 µL de cDNA (12,5 ng x µL⁻¹). O volume de cada primer bem como o volume de água variou para cada gene, sendo ajustado a concentração ideal para cada oligo (Anexo tabela 1). As reações foram feitas no aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®). O programa de amplificação foi o seguinte: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C durante 30 segundos. Os transcritos dos genes UBG5 e ACTIN foram usados como referências internas para normalizar o total de RNA presente em cada reação. As reações foram feitas em triplicata e a análise de expressão foi feita usando o programa DataAssit™ (Life Technologies) calculando o nível do ciclo de *threshold* de acordo com o método 2^{-ΔΔCT}. Ao final das reações foi feita uma curva de dissociação para conferir a especificidade do produto amplificado.

3. RESULTADOS

3.1. Bibliotecas de RNA-seq.

Após a quantificação e determinação da qualidade do RNA extraído de folhas de arroz 24 horas após a indução com *Serratia* sp. (BRM 32114), *M. oryzae* avirulento (PY10749), *M. oryzae* virulento (PY10900) e com H₂O (controle), as amostras foram submetidas ao sequenciamento de todo transcriptoma via RNA-seq. A partir do sequenciamento do transcriptoma das 12 bibliotecas (três bibliotecas por tratamento), foram gerados um total de 542.562.962 de *reads* de 100 pb *paired-ends* (PE) (Tabela 1).

Para realizar as análises relativas ao transcriptoma, foi utilizado o genoma de referência da espécie de arroz *O. sativa* japonica, versão 323_v7, ID: 29143, com tamanho de 374,471,240 bp. A cobertura total do genoma obtida por tratamento com os *reads* foi 60 vezes em média.

Posteriormente, as *reads* foram mapeadas e alinhadas por meio do *software* TopHat totalizaram 88,58% do número total das sequências de cada biblioteca.

3.2. Anotação global dos genes identificados em plantas de arroz submetidas a diferentes agentes indutores.

A análise da expressão diferencial dos transcritos relacionados com respostas de defesa desencadeadas por diferentes agentes indutores foi estimada a partir da cultivar de arroz de terras altas BRS Primavera. As *reads* encontrados nessa análise global do transcriptoma nos auxilia a entender os mecanismos e diferenças envolvidas na indução de resistência desencadeada por diferentes agentes indutores. Foram selecionados candidatos a genes envolvidos na síntese de hormônios/moléculas elicitoras e também aqueles genes responsivos à esses fitormônios ativados pela aplicação dos indutores bióticos.

Identificação dos genes diferencialmente expressos (DEGs).

A proporção de genes diferencialmente modulados variou entre os tratamentos, com AVR apresentando maiores DEG *up* e *down-regulated* (Figura 1). Quando o tratamento indutor foi o *M. oryzae* avirulento (AVR), o número de DEGs foi 2118 (1627 *up* e 492 *down-regulated*), o maior dentre os tratamentos. Já quando a planta foi desafiada com *M. oryzae* virulento (VIR) esse número foi de 1600 (Figura 2), com 1282 *up-regulated* e 318 *down-regulated*. Em plantas induzidas com PGPR, foi encontrado

1666 DEGs (Figura 2). Desse total, 1079 DEGs foram *up-regulated* e 587 *down-regulated* (Figura 3). O diagrama de Venn (Figura 4) mostrou que dos DEGs identificados, 936 são comuns aos três tratamentos, 397, 341 e 50 DEGs foram compartilhados pelas condições AVR-VIR, AVR-PGPR e VIR-PGPR, respectivamente. O maior número de DEGs exclusivos foram encontrados em AVR (444), seguido por PGPR (339) e VIR (217).

Para investigar as funções e os papéis dos DEGs selecionados nas plantas induzidas, foi utilizado a anotação funcional dos transcritos de arroz disponibilizados por RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Para a descrição dos genes nas sessões seguintes, o critério adotado foi baseado no papel de defesa dos genes relacionados com brusone ou em outros patossistemas, de acordo com o valor de *fold changes* (FC) apresentados pelos DEGs.

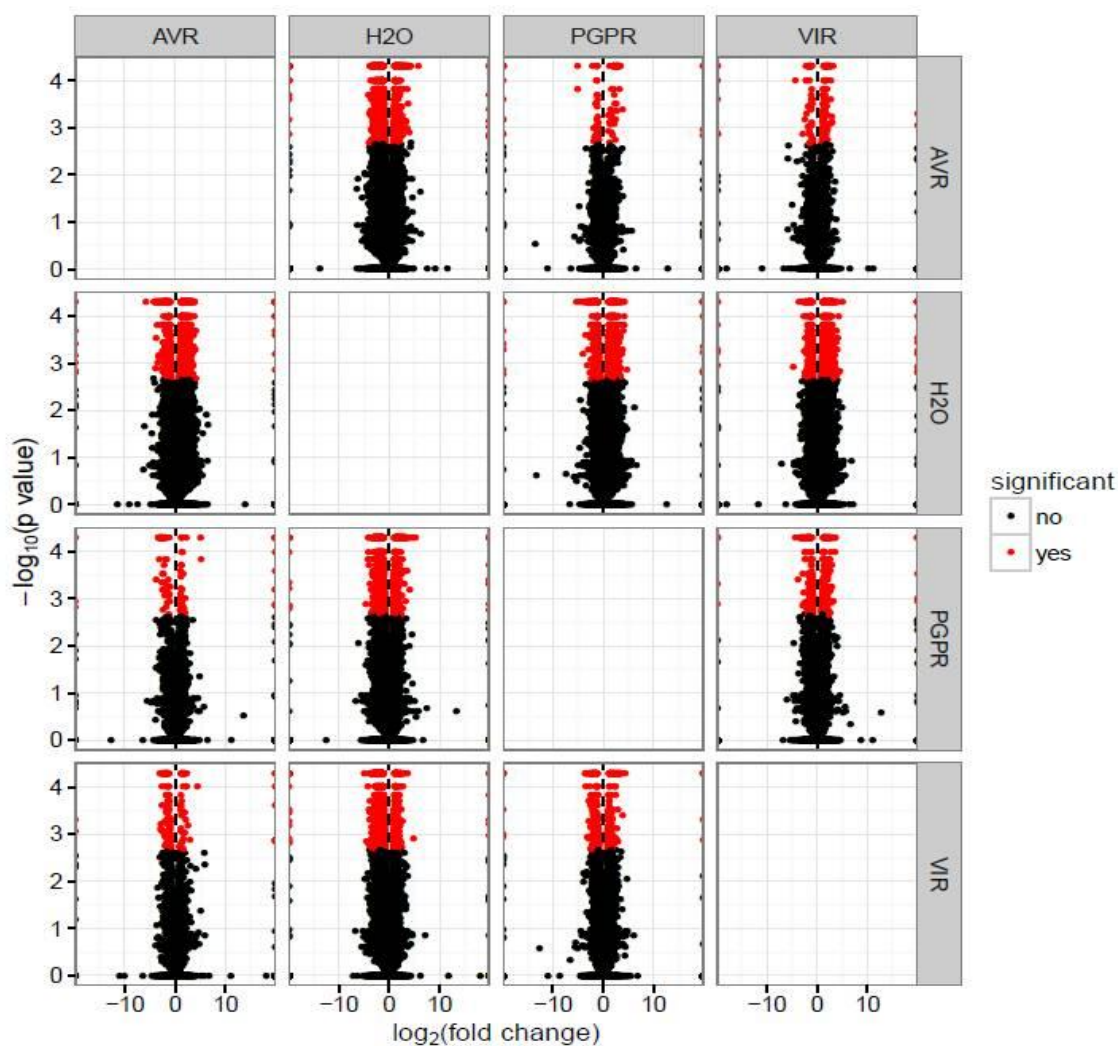


Figura 1 - Gráfico de média de expressão *versus* log fold change (MA-plots). Mudanças transcricionais estão presentes nas plantas de arroz após a indução. Valores de média de expressão normalizadas são plotadas contra log₂ fold changes. Genes com um FDR < 0.05 são plotados em vermelho.

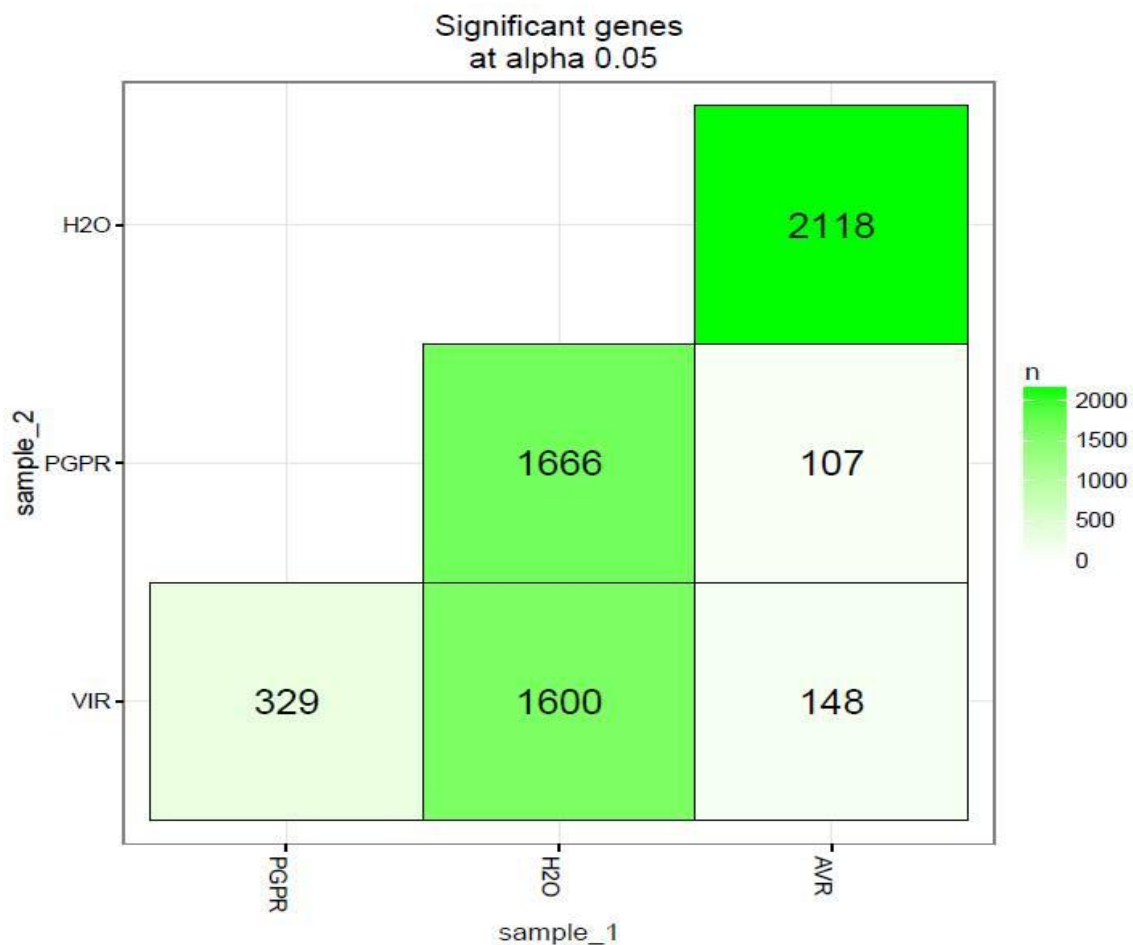


Figura 2. Diagrama de DEGs modulados pelos respectivos agentes indutores. Os DEGs encontrados 24hs após a indução.

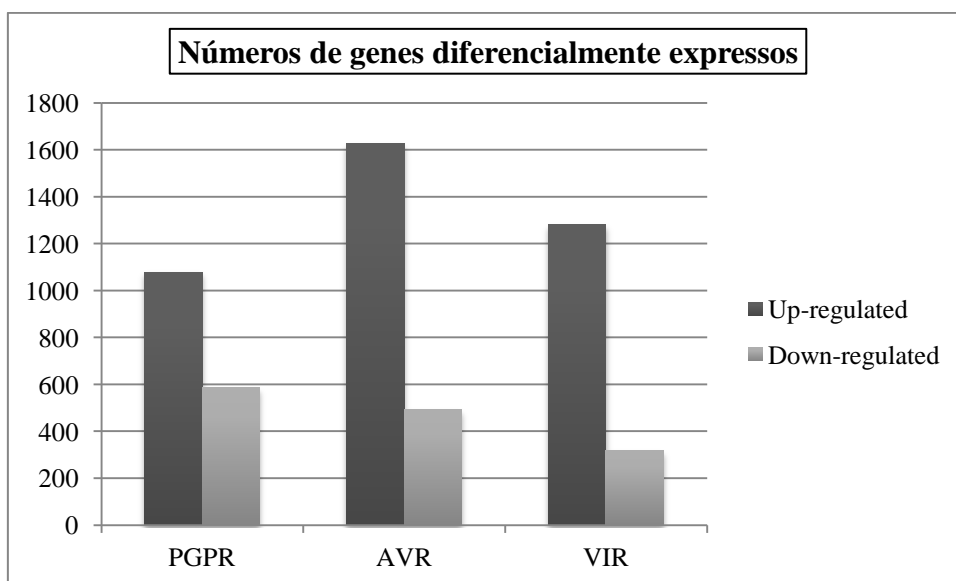


Figura 3. Mudanças no perfil de DEGs entre as três amostras. Eixo X: tratamento; eixo Y: número de genes diferencialmente expressos.

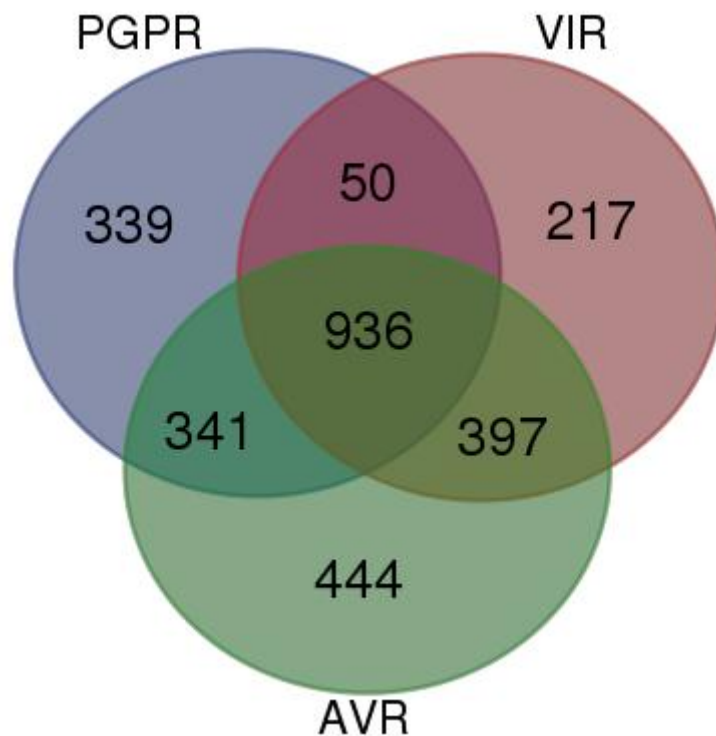


Figura 4. Diagrama de Venn ilustrando a relação entre os genes modulados nas condições PGPR, AVR e VIR.

3.3. DEGs em plantas induzidas com *Serratia* sp. BRM32114.

Três genes relacionados com via do chiquimato foram diferencialmente expressos em PGPR, todos *up-regulated*. Na biossíntese do triptofano foram encontrados dois DEGs: Aminodeoxi-corismato sintase (Os06g48620) e Antranilato fosforibosiltransferase (Os05g30750). Dos genes relacionados com salicilato, três foram diferencialmente modulados, todos eles com atividade de fenilalanina amônio-liase (PAL), são eles: *OsPAL01*, *OsPAL02* e *OsPAL08*. Desses três genes, *OsPAL01* foi DEG nas plantas induzidas com a rizobactéria. *OsSGT*, um gene envolvido com glicosilação de SA, foi DEG e superexpresso apenas em PGPR (Figura 5; Anexo tabela 2).

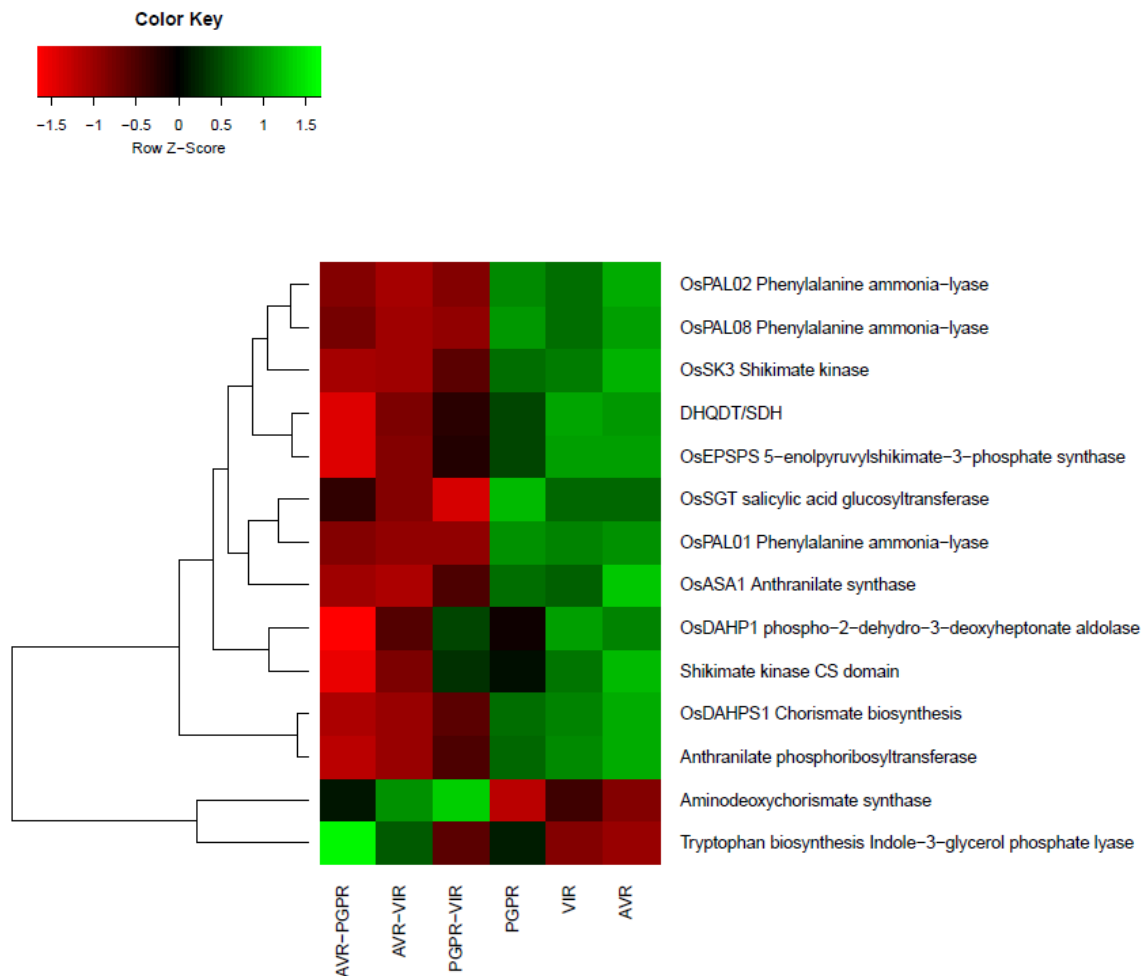


Figura 5. Clusterização e *heat map* da expressão de genes da biossíntese de SA e genes responsivo a SA modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

Oito genes que fazem parte da biossíntese do JA foram diferencialmente expressos nas plantas tratadas com a rizobactéria, onde dois foram superexpressos e seis foram reprimidos (Figura 6; Anexo tabela 3). Três genes com atividade de Lipoxigenase foram DEGs. Genes que codificam enzimas que atuam nas moléculas precursoras do metil-éster ácido jasmônico, *OsAOS2* (oxidase do alene) (Os03g12500) e fosfolipases A2 (Os01g40070 e Os03g50030) foram superexpressos em PGPR. O gene *oryzain beta* (Os04g57440) foi DEG exclusivo dessa condição. Genes de proteínas reguladoras da ativação e biossíntese de JA como a família das proteínas JAZ (*Jasmonate Zim Domain*) foram reprimidos. Seis genes dessa classe foram encontrados. Vários genes ativados por JA também foram diferencialmente modulados. *OsMYC2*, um gene de um fator de transcrição relacionado com ativação de genes responsivos ao JA, foi reprimido nas plantas tratadas com *Serratia* sp. Genes relacionados com a acumulação de JA, como

OsRER1 foi superexpresso. Outros genes responsivos ao JA também foram modulados (Figura 6; Anexo tabela 3).

Tabela 1. Descrição das bibliotecas sequenciadas (RNA-seq) de plantas de arroz.

Tratmento	<i>Reads</i> totais	<i>Reads</i> filtradas	% filtradas	Mapeadas	% mapeadas	<i>Reads</i> únicas	% <i>reads</i> únicas	Multi reads	% multi reads	Cobertura	Trascriptoma
H2O_1	46563860	42447620	91,16001	37160668	87,54476	36365597	97,86045	795071	2,13955	61,67711	53065125
H2O_2	41746416	37495276	89,81675	32804051	87,48849	31993749	97,52987	810302	2,470128	54,26233	53065125
H2O_3	44643638	40146602	89,92682	35488495	88,39726	34135094	96,18637	1353401	3,813633	57,89412	53065125
PGPR_1	46604942	42070598	90,27068	37738441	89,70265	34774958	92,14731	2963483	7,852691	58,97934	53065125
PGPR_2	42404548	38177556	90,03175	33956432	88,94344	33216607	97,82125	739825	2,178748	56,33633	53065125
PGPR_3	47092532	42713220	90,70062	39282066	91,967	38354981	97,63993	927085	2,360072	65,05117	53065125
AVR_1	40450488	36641020	90,58239	32514312	88,73746	31822638	97,87271	691674	2,127291	53,97212	53065126
AVR_2	44840962	40515176	90,35305	36349458	89,71813	35634144	98,03212	715314	1,967881	60,43655	53065127
AVR_3	42446670	38503816	90,71104	33709987	87,54973	32943115	97,72509	766872	2,27491	55,87248	53065128
VIR_1	46049680	41558736	90,24761	36266841	87,26647	35493040	97,86637	773801	2,133632	60,19723	53065129
VIR_2	46129858	41608946	90,1996	36879057	88,63252	36116780	97,93304	762277	2,066964	61,25511	53065130
VIR_3	53589368	48508928	90,51969	42251816	87,10111	41340798	97,84384	911018	2,156163	70,11519	53065131
TOTAL	542562962	490387494	-	434401624	-	422191501	-	12210123	-	716,0491	-
MÉDIA	45213580	40865624,5	90,37667	36200135	88,58742	35182625,1	97,20486	1017510	2,795139	59,67076	

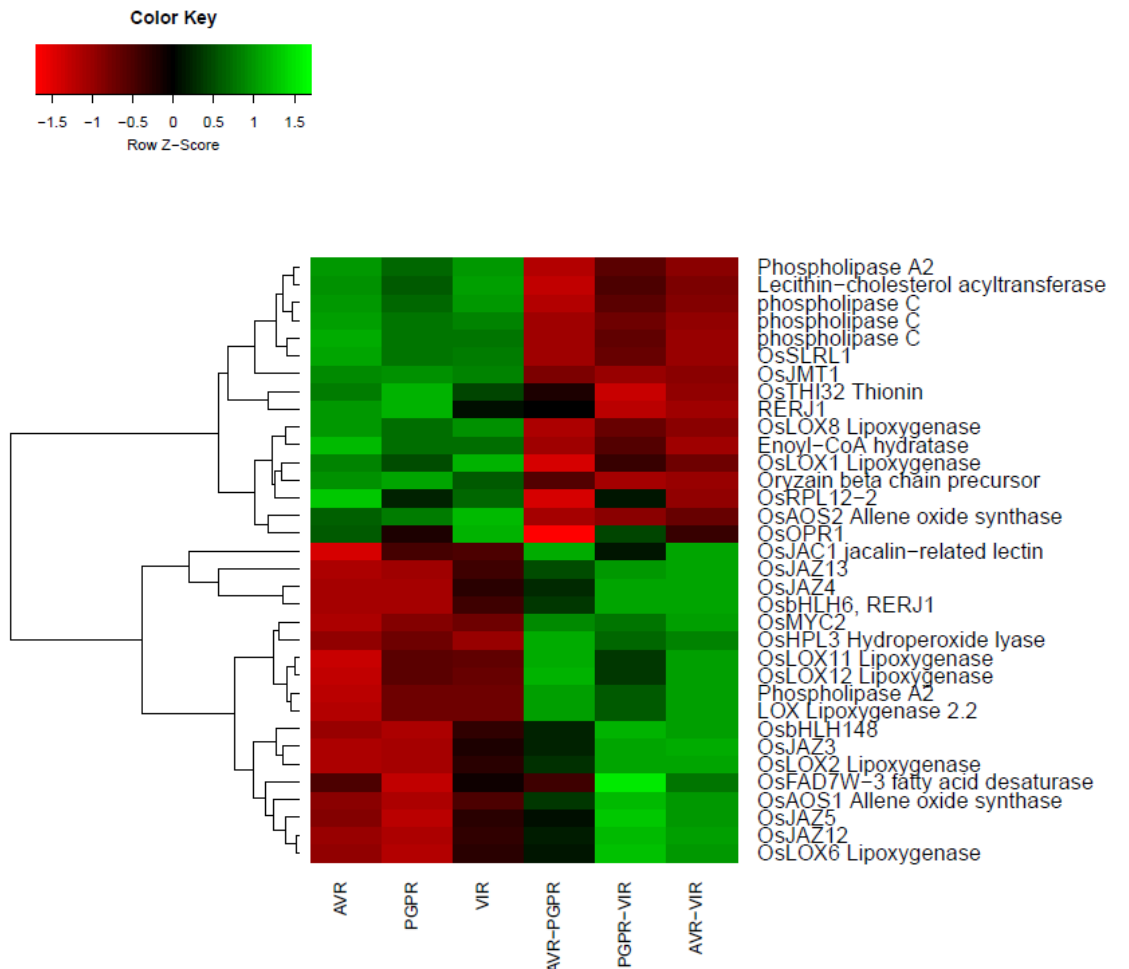


Figura 6. Clusterização e *heat map* da expressão de genes da biossíntese do JA e genes reponsivos a JA modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

Três genes de arroz relacionados com a síntese de etileno foram encontrados (Anexo tabela 4), todos eles reprimidos. *OsACO5* (Os05g05680) foi DEG apenas nas plantas induzidas com a rizobactéria (Figura 7; Anexo tabela 4)..*OsERFs* regulam a transcrição des genes envolvidos em resposta ao etileno. Três deles foram DEGs neste trabalho. *OsERF1* (Os04g46220) foi superexpressos, *OsERF91* e *OsERF101* foram reprimidos (Figura 7; anexo tabela 4).

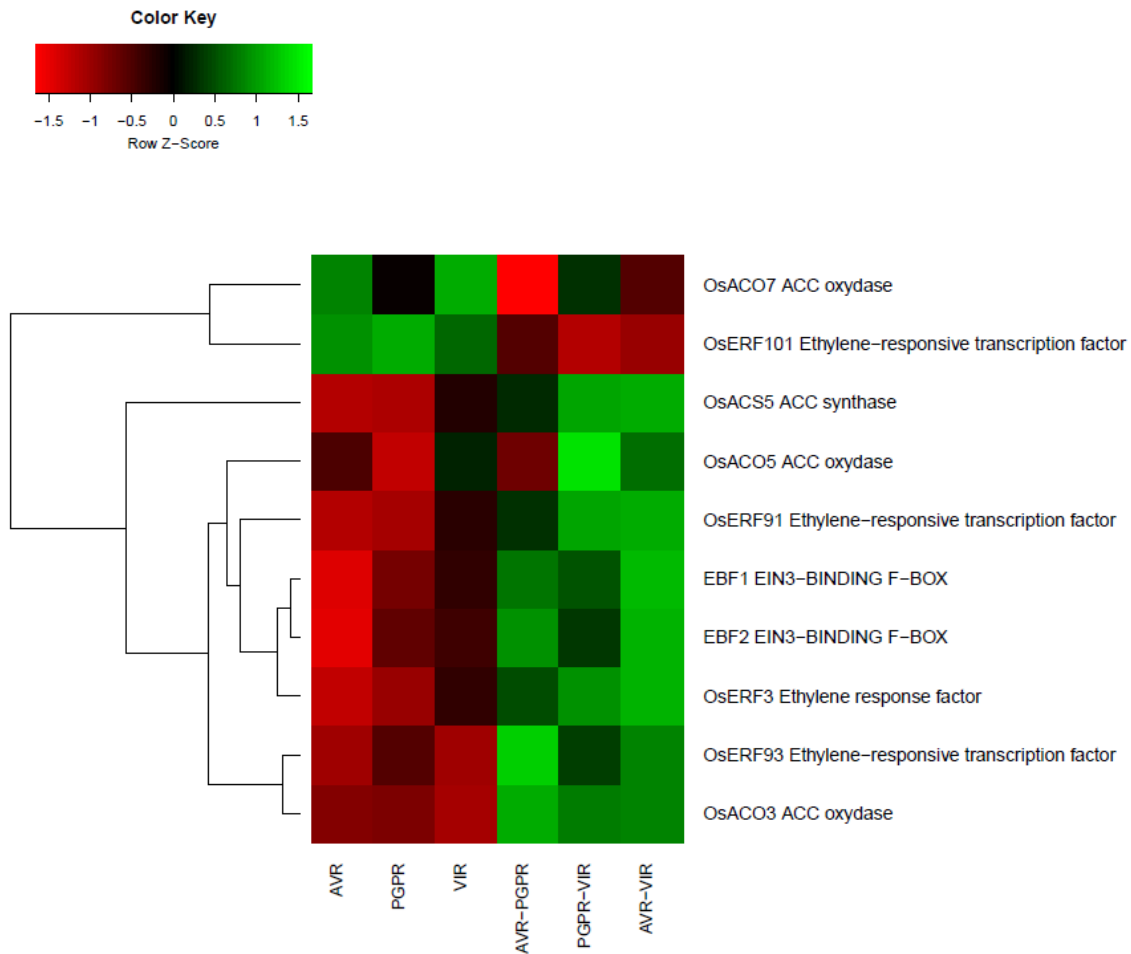


Figura 7. Clusterização e *heat map* da expressão de genes da biossíntese de etileno (ET) e de genes responsivos ao ET modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

Proteínas PR (PRP) possuem atividades antimicrobianas contra uma ampla gama de fitopatógenos, sendo conhecidas dezessete famílias de PRPs. Genes relacionados a patogênese de diferentes famílias foram encontrados (Anexo tabela 5). Um gene da família proteica PR10, com atividade de ribonuclease, foi superexpresso: *OsPR10B* (Os12g36850). *OsPR5* (Os03g45960), pertence a família PR5, que possuem atividade de taumatina e permeabilizam a membrana fúngica, também foi superexpresso (Figura 8; anexo tabela 5). A família PR6, que possuem atividade inibidora de proteínase, é aqui representada pelo gene *OsSci1* (Os12g25090), foi superexpressa e apresentou os maiores valores de FC em PGPR.

β -1,3-Glucanases (GLU) pertence a família PR2 e possuem atividade de β -1,3-glucanases. Sete DEGs membros dessa família foram encontrados em planas tratadas

com *Serratia* sp. Desse total, apenas dois genes foram reprimidos e cinco superexpressos, e um gene (Os03g46666) foi exclusivo dessa condição.

Quitinases (CHI) pertencem a famílias de proteínas PR PR3, 4, 8 e 11. Cinco genes foram DEGs em PGPR, sendo todos eles superexpressos. Estes genes foram modulados diferencialmente também nos outros tratamentos (Figura 8; anexo tabela 5).

PR9 são proteínas PR que possuem atividade de peroxidase (POX). Entre as proteínas PRs que tiveram o nível transcricional avaliados, POX foram as enzimas com maior quantidade de genes diferencialmente expressos: 33 no total. Vinte genes foram superexpressos. Cinco deles foram DEGs exclusivos deste tratamento, sendo 4 reprimidos (Os04g52300, Os07g47990, Os07g48010 e Os08g02110). Apenas dois genes da maquinaria celular de detoxificação de EROs, como ascorbato-peroxidase (*OsAPX8*) e catalase (*OsCATB*), foram encontrados.

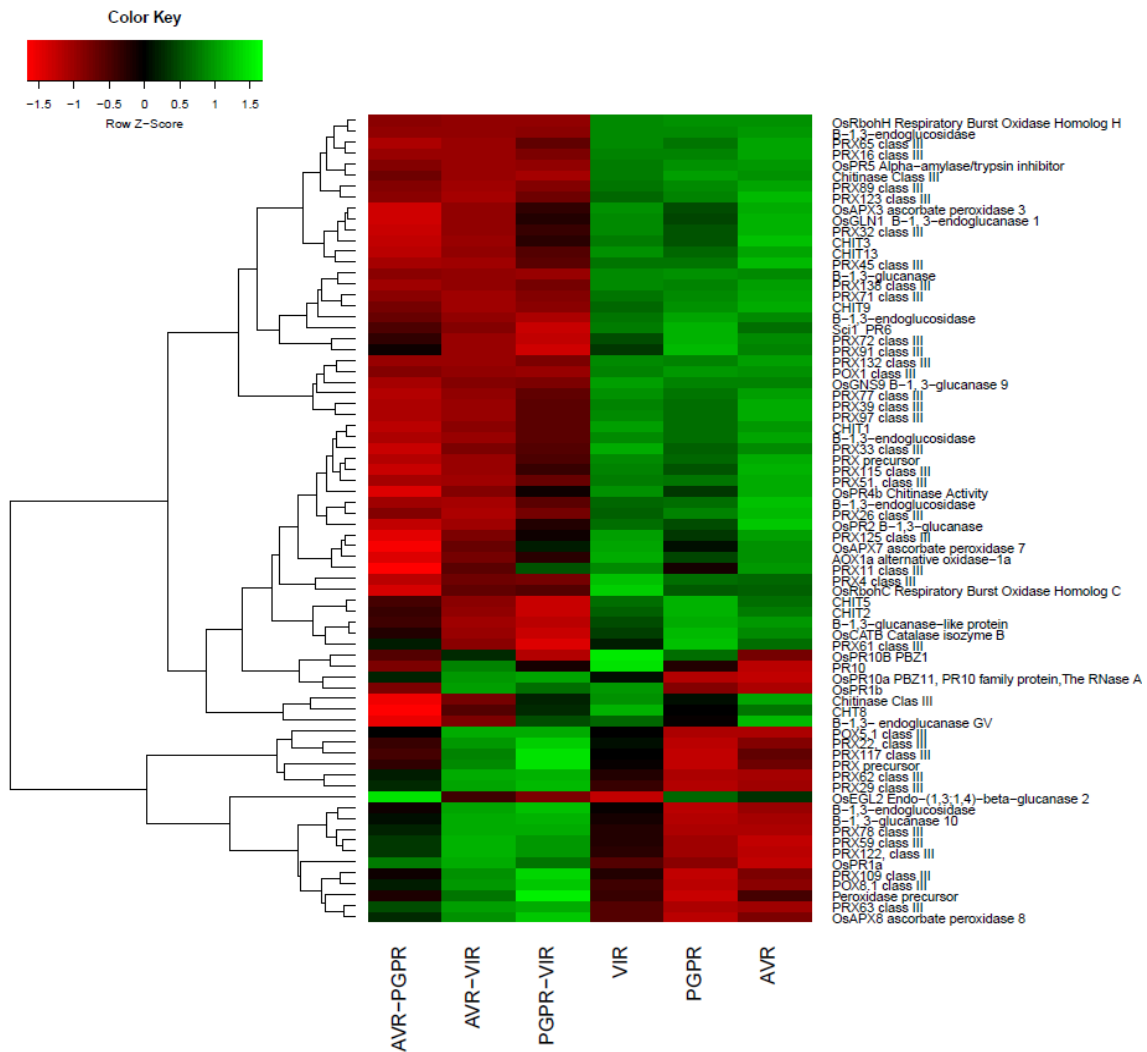


Figura 8. Clusterização e *heat map* da expressão de genes de proteínas relacionadas a patogênese (PRP) modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote *heatmap.2*. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

WRKY são fatores de transcrição relacionados a respostas de defesa. Em plantas tratadas com *Serratia* sp., dez genes foram diferencialmente expressos: oito reprimidos (*WRKY 4, 18, 22, 46, 63, 69, 60 e 61*) e dois superexpressos (*WRKY 17 e 31*). *OsWRKY69* foi diferencialmente expresso apenas em PGPR (Figura 9; anexo tabela 6).

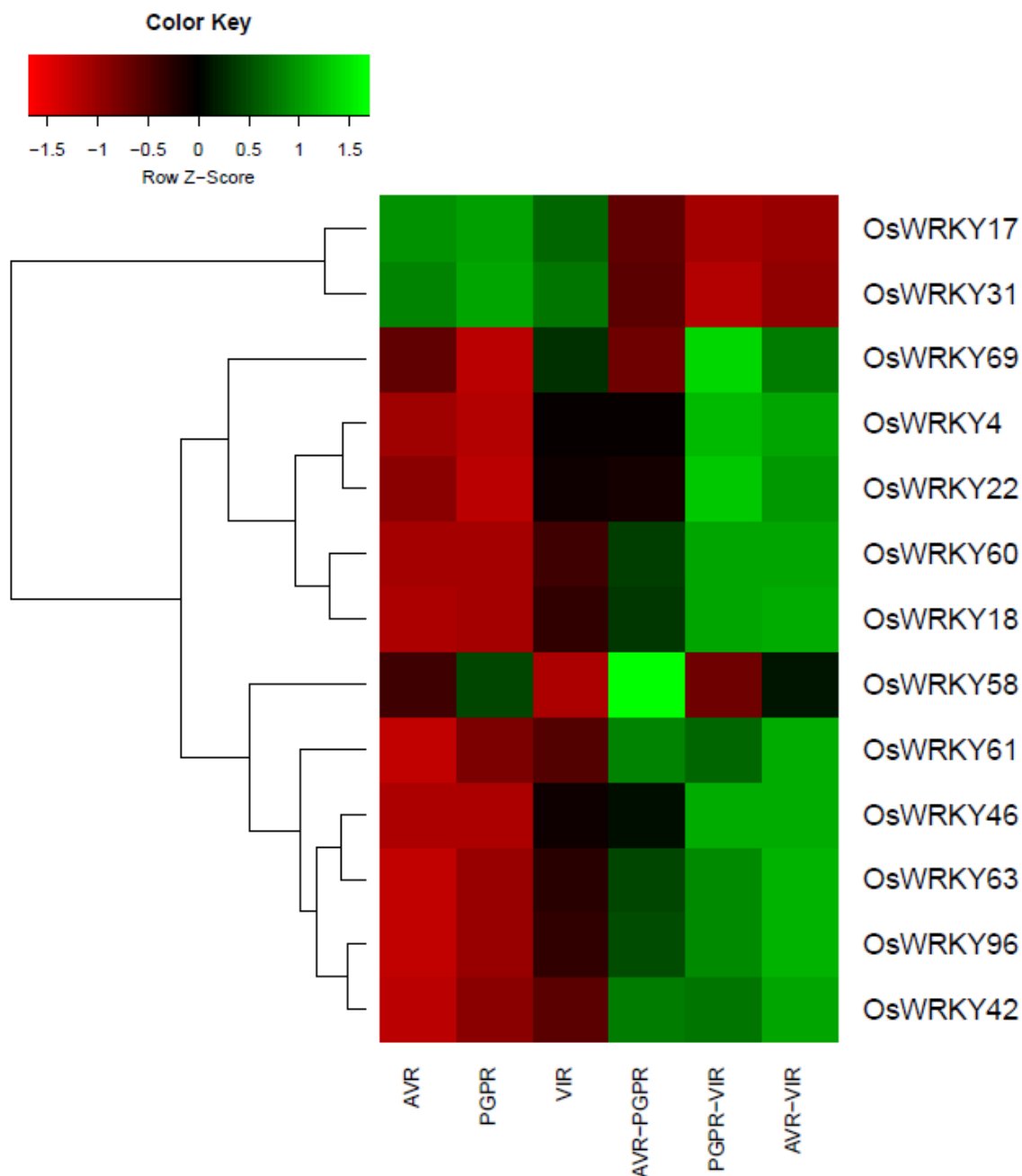


Figura 9. Clusterização e *heat map* da expressão de genes fatores de transcrição WRKY modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote *heatmap.2*. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

Nove genes de proteínas quinases ativadas por mitógenos (*MAPK, MAPKK e MAPKKK*) foram identificados como diferencialmente expressos, três superexpressos e

seis com FC negativo. Os genes que foram DEGs e superexpressos são: *MAPK10* (Os01g43910), *MAPKKK30* (Os02g02780) e *MAPKKK74* (Os01g66860) (Figura 10; anexo tabela 7).

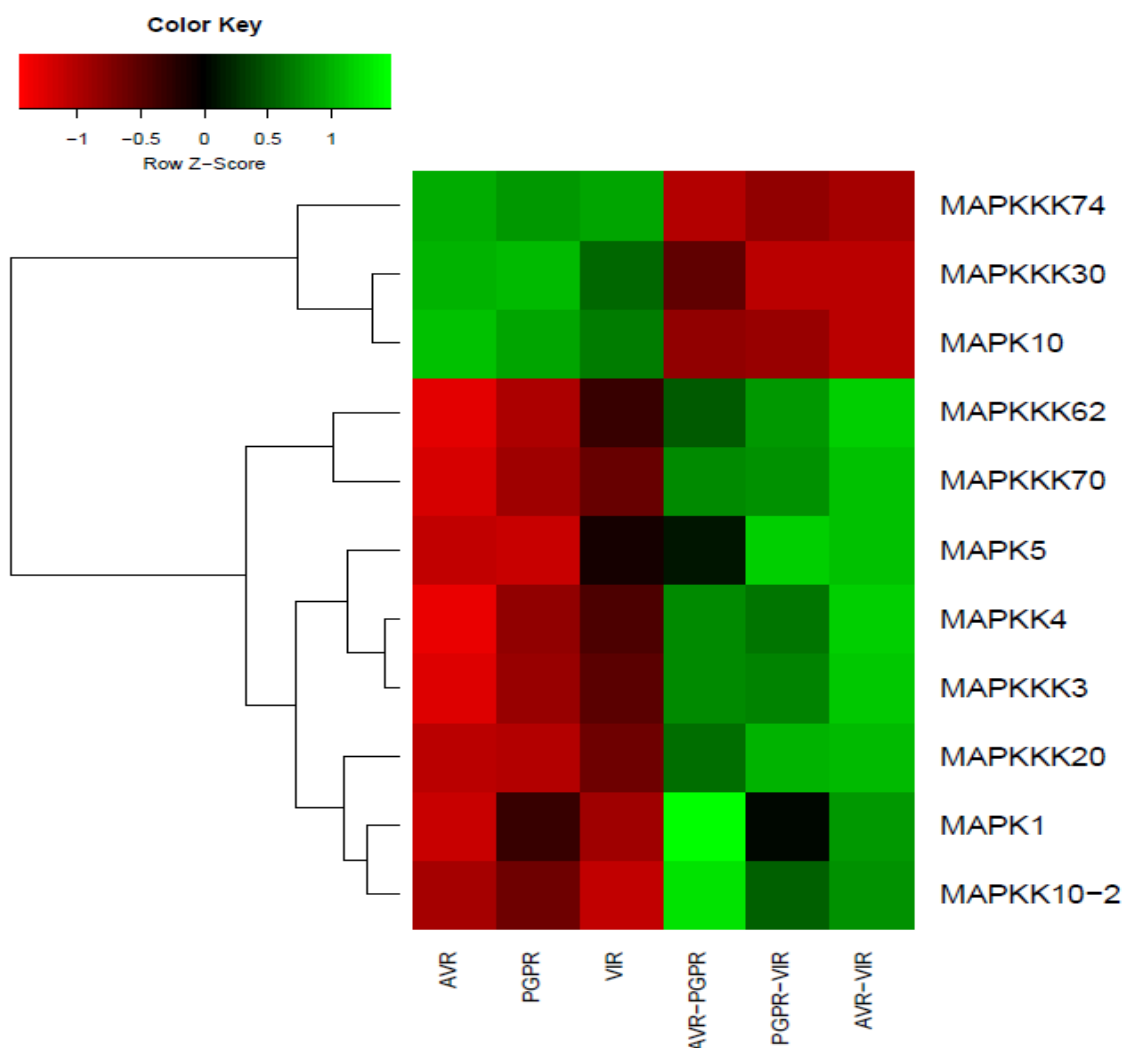


Figura 10. Clusterização e *heat map* da expressão de genes MAP quinases modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

Em plantas de arroz induzidas com *Serratia* sp. sete genes relacionados com fitoalexinas foram superexpressos (Anexo tabela 9). Destes, dois genes relacionados são relacionados com maaquiaina (Os01g01650 e Os01g660), uma fitoalexina do grupo dos isoflavonoides. Dois genes são relacionados com fitocassano e três com momilactonas, duas das fitoalexinas sintetizadas a partir da via metabólica dos fenilpropanoides (Figura 11; anexo tabela 9).

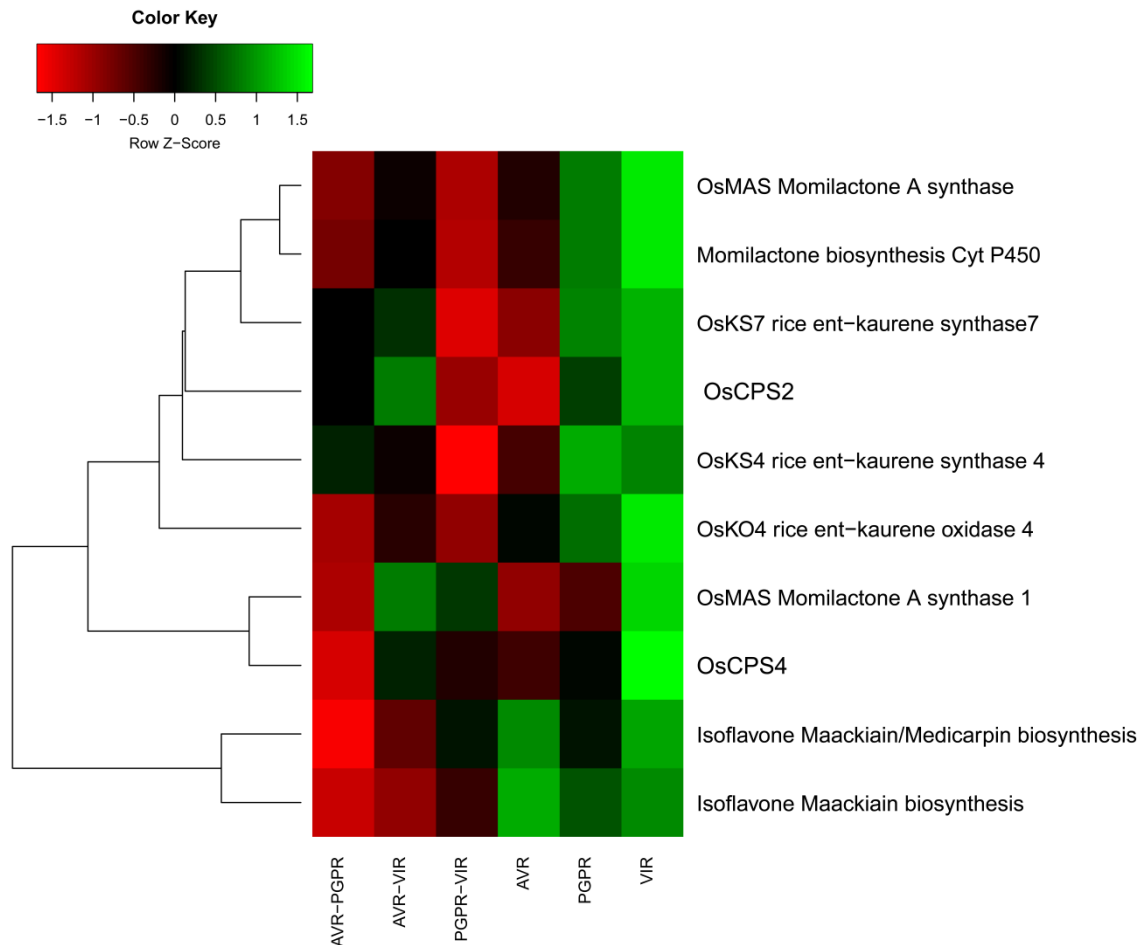


Figura 11. Clusterização e *heat map* da expressão de genes da biossíntese de fitoalexinas modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

P450s é um grupo de enzimas do grupo das monoxigenases envolvidas na catálise da oxidação de diversos substratos por meio da ativação do oxigênio molecular. Elas estão envolvidas no processo metabólico de várias vias de sinalização relacionadas com respostas de defesa da planta, como hormônios vegetais, fitoalexinas e lignina. Vinte e oito genes foram diferencialmente expressos nessa condição, sendo 11 reprimidos e 17 superexpressos. (Anexo tabela 10; Figura 12). Dois desses genes P450, localizados no cromossomo 7 (LOC_OS07g23570 e LOC_OS07g44140), são relacionados com respostas de defesa mas sem função definida, foram superexpressos nas três condições avaliadas.

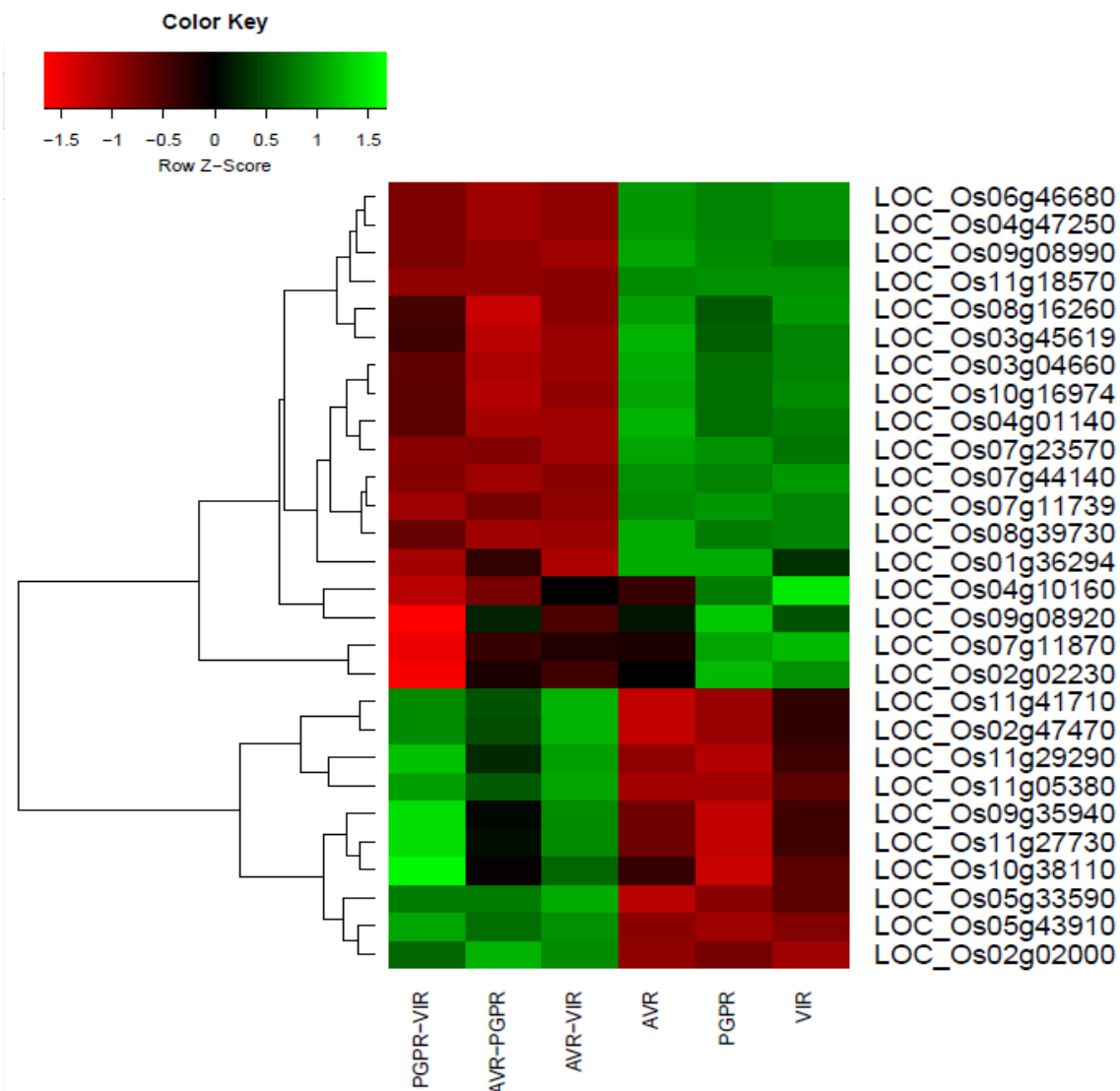


Figura 12. Clusterização e *heat map* da expressão de genes do citocromo P450 modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

Genes de resistência (R).

Sete genes relacionados com resistência contra diversos patógenos foram diferencialmente modulados em planas induzidas com *Serratia* sp. (Figura 13; Anexo tabela 8). Quatro deles foram reprimidos, entre eles o gene Pi2/9 que possui o sítio NBS-LRR e confere resistência à algumas raças de *M. oryzae*. Três genes foram superexpressos, entre eles *OsXB3*, relacionado a resistência de arroz a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

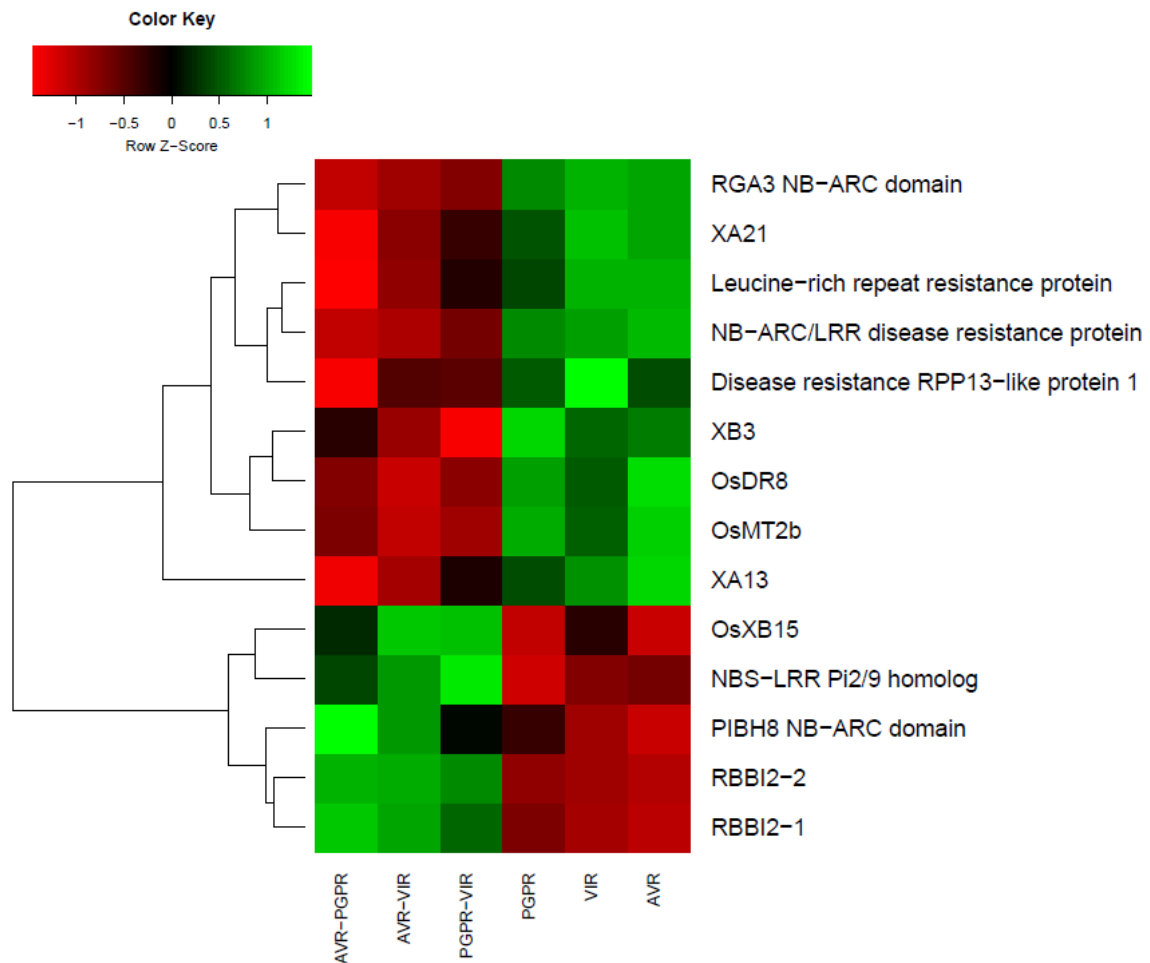


Figura 13. Clusterização e *heat map* da expressão de genes relacionados com resistência (R) modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote heatmap.2. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

Dois genes responsivos a mais de um hormônio de defesa foram encontrados sendo diferencialmente expressos neste trabalho: *OsNPR4* e *OsStr11* (Os02g49680). *OsNPR4*, responsivo a JA e SA, foi reprimido. Quando os valores de expressão (FC) de PGPR foram normalizados com VIR, houve diferença significativa nos níveis de expressão (Figura 14; anexo tabela 11).

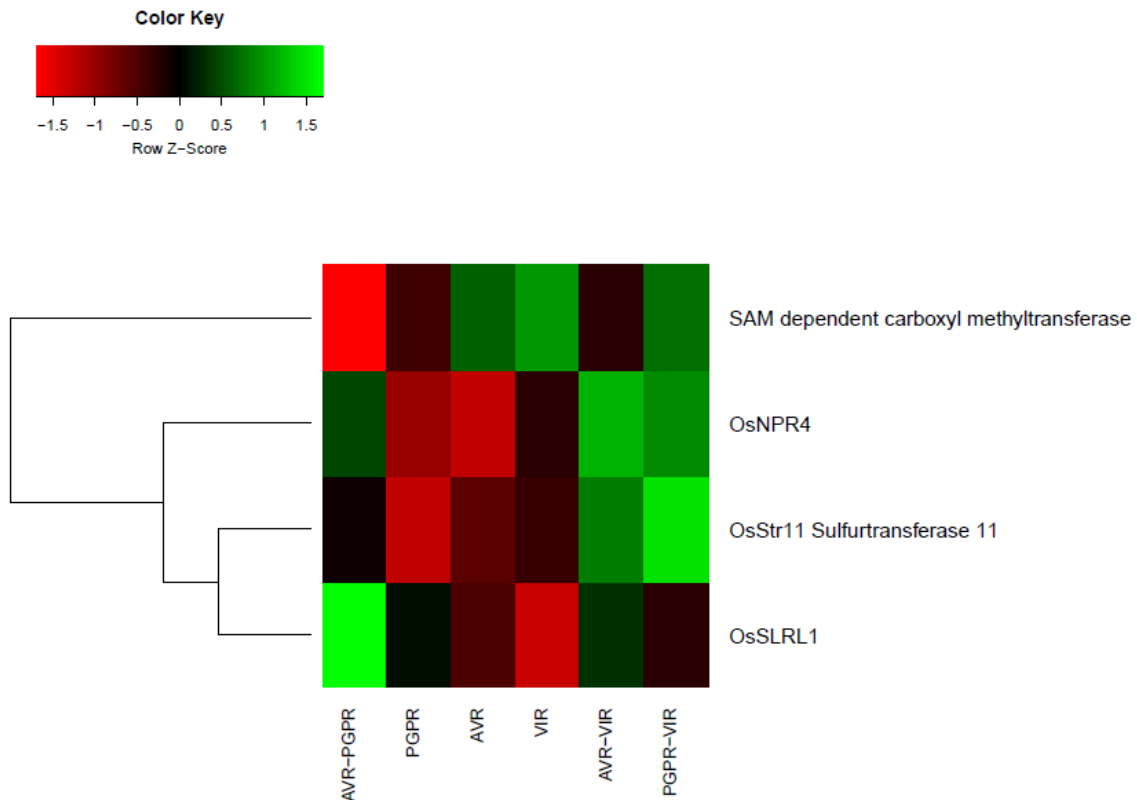


Figura 14. Clusterização e *heat map* da expressão de genes envolvidos na interação de hormônios de defesa e modulados segundo os diferentes tratamentos. A escala de cor indica o valor de expressão. O *heat map* foi gerado no programa R v.3.2.0 utilizando o pacote *heatmap.2*. Análise com distância euclidiana e usando o algoritmo UPGMA. O agrupamento do genes foi baseada na semelhança do padrão de expressão.

3.4. DEGs em plantas induzidas com *M. oryzae* avirulento PY10749.

Para investigar os genes envolvidos com SA, foi avaliada a expressão de genes relacionados com a biossíntese de SA e genes a eles responsivos, bem como a via biossintética de duas vias precursoras ao SA: rota do chiquimato e do triptofano (Figura 5; Anexo tabela 2). No presente trabalho, seis genes relacionados com via do chiquimato foram superexpressos em AVR, sendo o gene *Os10g42700* (uma quinase-chiquimato que transforma 3-dehidro-chiquimato em chiquimato) exclusivo desta condição. Três genes relacionados a biossíntese do triptofano foram DEGs: um reprimido e dois superexpressos. Apenas um gene envolvidos com a síntese de salicilatos foi diferencialmente expresso em AVR: *OsPAL02* foi superexpresso nesta condição (Figura 5; Anexo tabela 2).

Onze genes que fazem parte da biossíntese do JA foram diferencialmente expressos, a maioria reprimido (7 genes) e apenas 4 superexpressos (Figura 6; Anexo tabela 3). Dos sete genes com atividade de Lipoxigenase que foram DEGs, apenas *OsLOX8* foi superexpresso. *OsOPRI* (atua no precursor do isojasmonato), *proteína*

ribossomal L7/L12 (Os01g47330), *OsAOS1* (oxidase do alene) (Os03g55800) e *fosfolipases A2* (Os01g40070 e Os03g50030), genes estes que atuam nas moléculas precursoras do metil-éster ácido jasmônico, também foram DEG nas plantas que receberam *M. oryzae* avirulento. Genes envolvidos na regulação da síntese de JA, como *JAZ* (*Jasmonate Zim Domain*) também foram diferencialmente modulados: todos os cinco foram reprimidos. Genes responsivos a JA também foram diferencialmente modulados. *OsMYC2*, um gene de um fator de transcrição relacionado com ativação de genes responsivos ao JA, foi reprimido. *OsRERJ1*, genes envolvido na acumulação de JA, foi superexpresso (Figura 6; Anexo tabela 3).

Três genes de arroz relacionados com a síntese de ET foram encontrados (Anexo tabela 4). Um gene ACC sintase (*OsACS5* - Os01g09700) foi reprimido. Dois genes ACC oxidase, envolvidos na segunda etapa da biossíntese desse hormônio, *OsACO3* e *OsACO7*, foi reprimido e superexpresso, respectivamente. A transdução de sinal do etileno entre os receptores e o núcleo é governado por produtos dos genes *EBF* (*EIN3-BINDING F-BOX*); estes foram reprimidos apenas neste tratamento apenas AVR (*OsEBF1* e *OsEBF2*). Genes *ERF* regulam a transcrição dos genes envolvidos em resposta ao etileno, deles foram DEGs em AVR (Figura 7; anexo tabela 4).

Genes de proteínas relacionadas a patogênese de diferentes famílias foram encontrados (Anexo tabela 5). O gene *OsPRIa*, cujo produto possui atividade de proteinase, foi reprimido em AVR. Um gene da família PR5 (*OsPR5* - Os03g45960) foi encontrado com valores positivos de FC (Figura 8; anexo tabela 5). O produto do gene *OsSci1*, que pertence à família PR6, possui atividade inibidora de proteinase, também foi superexpresso em AVR. Enzimas com atividade de β -1,3-glucanase pertencem a família PR2. Onze DEGs dessa família foram encontrados neste tratamento. Nove foram superexpressos e apenas 2 foram reprimidos, fazendo deste tratamento (AVR) aquele que mais ativou essas enzimas, inclusive apresentando DEGs exclusivos (Figura 8; anexo tabela 5). A presença de *M. oryzae* avirulento aumentou a expressão de genes que codificam enzimas com atividade de quitinase (CHI). Estas enzimas pertencem a famílias de proteínas PR PR3, 4, 8 e 11. Dez membros dessas famílias foram DEGs em AVR, sendo este tratamento aquele com mais genes CHI que foram DEG, onde todos eles foram superexpressos. Alguns desses DEGs foram exclusivos a esta condição (Figura 8; anexo tabela 5). Trinta e um genes que codificam enzimas com atividade de peroxidase foram DEG. Nove deles foram reprimidos; os outros 22 foram superexpressos. Os03g55420 foi o único DEG presente nas plantas tratadas com *M.*

oryzae, sendo *up-regulated* na condição AVR. Assim como em PGPR, dois DEGs da maquinaria celular de detoxificação de EROs como ascorbato-peroxidase (*OsAPX3*) e catalase (*OsCATB*) foram encontrados (Figura 8; anexo tabela 5).

Onze genes da superfamília de genes *WRKY*, que são fatores de transcrição envolvidos em respostas de defesa, foram diferencialmente expressos neste tratamento. Nove deles foram modulados negativamente, com exceção dos genes *OsWRKY17* e *OsWRKY31*. Deste total, dois foram DEG somente em AVR (*OsWRKY42* e *OsWRKY96*) (Figura 9; anexo tabela 6).

De forma semelhante aos fatores de transcrição mencionados anteriormente, 11 genes pertencentes à família de proteínas quinases ativadas por mitógenos foram encontrados em plantas induzidas com *M. oryzae* avirulento, onde oito deles foram reprimidos (*MAPK 1* e *5*; *MAPKK 4* e *10-2*; *MAPKKK 3*, *20*, *62* e *70*) e apenas três superexpressos (*MAPK 10*; *MAPKKK 30* e *74*) (Figura 10; anexo tabela 7).

Dos genes relacionados com fitoalexinas que foram diferencialmente expressos, apenas três foram encontrados em AVR: um gene relacionado com momilactonas (*OsKO4*), uma fitoalexina sintetizada a partir dos fenilpropanoides, e dois genes relacionados com maaquiaina (*Os01g01650* e *Os01g660*), uma fitoalexina do grupo dos isoflavonoides (Figura 11; anexo tabela 9).

Em plantas de arroz tratadas com *M. oryzae* AVR, encontramos 21 genes que pertencem a essa classe de monooxigenases (Figura 12; anexo tabela 10). O número de DEGs que foram superexpressos foi maior do que aqueles reprimidos, 13 e 8, respectivamente.

Nove genes relacionados com resistência contra diversos patógenos foram diferencialmente modulados nas condições estudadas (Anexo tabela 8). Três deles foram comum a todas as condições. *OsRF2B* (*Os01g03310*), que confere resistência ao vírus RTBV foi reprimido e DEG nos três tratamentos. Dois genes R contra infecção causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* foram DEGs: *OsXA13* (*Os08g42350*) e *OsXA21* (*Os11g35500*) ambos superexpressos. O gene *PIBH8* (*Os08g42700*), que confere resistência à *M. oryzae*, foi reprimido. Genes que codificam as proteínas *RPP13 protein 1* e *RPP13-like protein 1* (*Os10g04090* e *Os03g14900*, respectivamente) e que contém o domínio NB-LRR foram superexpressos em AVR. Outros genes relacionados com resistência à patógenos foram encontrados (Figura 13; anexo tabela 8).

Genes responsivos a mais de um hormônio de defesa foram encontrados sendo diferencialmente expressos neste trabalho. Neste tratamento (AVR), o gene *OsNPR4* foi

e reprimido em AVR. Houve diferença significativa nos níveis de expressão quando os valores de expressão (FC) desses tratamentos foram normalizados com VIR (Figura 14; anexo tabela 11).

3.5. DEGs em plantas induzidas com *M. oryzae* virulento PY10900.

Cinco genes relacionados com via do chiquimato foram diferencialmente expressos nas condições avaliadas, todos *up-regulated*, são eles: *OsDHQDT/OsSDH*, *OsDAHPI*, *OsDAHPS1*, *OsEPSPS5* e *OsSK3*. Apenas dois genes relacionados com a síntese do triptofano foram DEGs em VIR: Anitrilato fosforibosiltransferase e Indol-3-glicerol fosfato-liase. Estes foram superexpresso e reprimido, respectivamente. *OsPAL02* e *OsPAL03*, ambos com atividade de fenilalanina amônio-liase e relacionados com biossíntese de salicilatos, foram superexpressos em plantas tratadas com *M. oryzae* virulento (Figura 5; Anexo tabela 2).

Apenas oito genes envolvidos na biossíntese do JA foram diferencialmente expressos em VIR. Entretanto, diferente de plantas tratadas com *Serratia* sp. e *M. oryzae* AVR onde houve mais DEGs reprimidos do que superexpressos, cinco genes foram positivamente regulando e apenas três apresentaram valores de FC negativos (Figura 6; Anexo tabela 3). Apenas um DEG foi exclusivo desse tratamento: *OsLOX1*. Dois genes das proteínas JAZ (*Jasmonate Zim Domain*) (proteínas reguladoras da ativação da biossíntese de JA) bem como outros genes responsivos ao JA também foram modulados (Figura 6; Anexo tabela 3).

Três genes envolvidos na síntese de ET foram modulados diferencialmente em plantas de arroz neste tratamento (Anexo tabela 4). *OsACS5* (ACC sintase) foi reprimido. *OsACO3* e *OsACO5*, ambos envolvidos na segunda etapa da biossíntese de etileno, foram reprimidos e superexpressos, respectivamente. Apenas dois genes ERFs (regulam a transcrição de genes envolvidos em resposta ao ET) foram DEG: *OsERF93* (reprimido) e *OsERF101* (superexpresso) (Figura 7; anexo tabela 4).

Várias proteínas PR tiveram seus respectivos genes diferencialmente expressos. *OsPR1b*, cujos produtos são inibidores de proteinases, foi DEG exclusivo de VIR, com valor de FC positivo, com valores também significativo quando normalizado com os valores de FC dos demais tratamentos. Dois genes da família proteica PR10, com atividade de ribonuclease foram encontrados: *OsPR10* e *OsPR10B PBZ1*, ambos superexpressos. Assim como em PGPR e AVR, *OsPR5* foi superexpresso (Figura 8;

anexo tabela 5). A família PR6 é aqui representada pelo gene *OsSci1* (Os12g25090), também superexpresso em VIR.

Apenas sete genes relativos a β -1,3-glucanase foram DEGs. *OsEGL2* foi reprimido e DEG exclusivo de AVR. Seis genes com atividade de GLU foram superexpressos. Oito genes com atividade de quitinase (CHI) foram superexpressos em plantas tratadas com *M. oryzae* virulento, quantidade inferior ao observado em AVR mas superior a PGPR.

Dos genes que codificam enzimas com atividade de peroxidase (POX), apenas 20 foram DEG em VIR; menor número dentre os tratamentos deste trabalho. Deste total, somente 1 foi reprimido, a maioria foi superexpresso (19). NADPH oxidase de plantas, aqui representadas pelos genes *OsRbohC* (Os05g45210) e *OsRbohH* (Os12g35610) foram DEGs e superexpressos apenas nas plantas desafiadas com *M. oryzae* virulento. Entre as funções atribuídas a estes genes, estão a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e morte celular programada. DEGs da maquinaria celular de detoxificação de EROs como oxidase-alternativa (*OsAOX1a*) e ascorbato-peroxidase (*OsAPX3* e *OsAPX7*) também foram DEG; diferente das POXs, esses genes foram mais numerosos neste tratamento.

A superfamília de WRKY, fatores de transcrição, possui mais de 100 genes em arroz. Deste total, apenas 5 foram diferencialmente modulados em VIR (Figura 9; anexo tabela 6). Dois apresentaram valores positivos de FC e três genes foram reprimidos. Dentre estes reprimidos, *OsWRKY58* foi exclusivo de plantas tratadas com *M. oryzae* virulento. 13 foram DEG nas condições avaliadas (Figura 9), também apresentando FC significativo quando seus valores de expressão foram normalizados com PGPR.

Plantas tratadas com *M. oryzae* AVR apresentaram sete genes de proteínas quinases ativadas por mitógenos, sendo este o menor número dentre as condições avaliadas. Desse total, quatro foram reprimidos (*MAPK1*, *MAPKK10-2*, *MAPKKK3* e *MAPKKK70*) e três apresentaram valores de FC positivos (*MAPK10*, *MAPKKK30* e *MAPKKK74*) (Figura 10; anexo tabela 7).

Nas condições em que plantas de arroz foram aqui estudadas, 10 genes relacionados com fitoalexinas foram diferencialmente expressos com valores positivos de FC (Anexo tabela 9). A presença do isolado *M. oryzae* virulento PY10900 modulou positivamente esses genes. Todos genes foram DEG e superexpressos em VIR. Desse total, oito DEGs são relacionados com fitocassano e momilactonas, duas das fitoalexinas sintetizadas a partir da via metabólica dos fenilpropanoides e dois genes

relacionados com maaquiaina (Os01g01650 e Os01g660), uma fitoalexina do grupo dos isoflavonoides.

Vinte e dois genes do citocromo P450, um grupo de enzimas envolvidas na catálise da oxidação de diversos substratos por meio da ativação do oxigênio molecular, foram DEG em VIR. Elas estão envolvidas no processo metabólico de várias vias de sinalização relacionadas com respostas de defesa da planta, como hormônios vegetais, fitoalexinas e lignina. A maioria dos genes (16) foram superexpressos e apenas seis foram reprimidos (Figura 12; anexo tabela 10).

Genes relacionados com resistência contra diversos patógenos foram diferencialmente modulados em VIR (Figura 13; anexo tabela 8). Dois genes R contra infecção causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* foram superexpressos (*OsXA13* e *OsXA21*) em AVR e VIR, todos eles superexpressos. O gene *PIBH8* (Os08g42700) bem como o gene homólogo ao Pi2/9 (ambos conferem resistência à *M. oryzae*) foram reprimidos.

Genes responsivos a mais de um hormônio de defesa foram encontrados sendo diferencialmente expressos neste trabalho. O gene SAM (ácido salicílico carboxil metiltransferase, Os06g20960) foi superexpresso. Já o gene *OsSLR1* foi DE e reprimido apenas em VIR (Figura 14; anexo tabela 11).

3.6. Validação dos dados de RNAseq via qRT-PCR

Para validação dos dados do sequenciamento do transcriptoma via RNA-seq, dez DEGs foram selecionados baseados no seu padrão de expressão (FC) para fazer quantificação de expressão também via RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) usando as mesmas amostras utilizadas para RNA-seq. O resultado da expressão fornecida pelo técnica de RNA-seq e aqueles mostrados pela qRT-PCR mostraram concordância entre si (Figura 15), demonstrando similaridade no nível de expressão analisados pelas duas técnicas, fornecendo solidez ao dados de indução aqui apresentados.

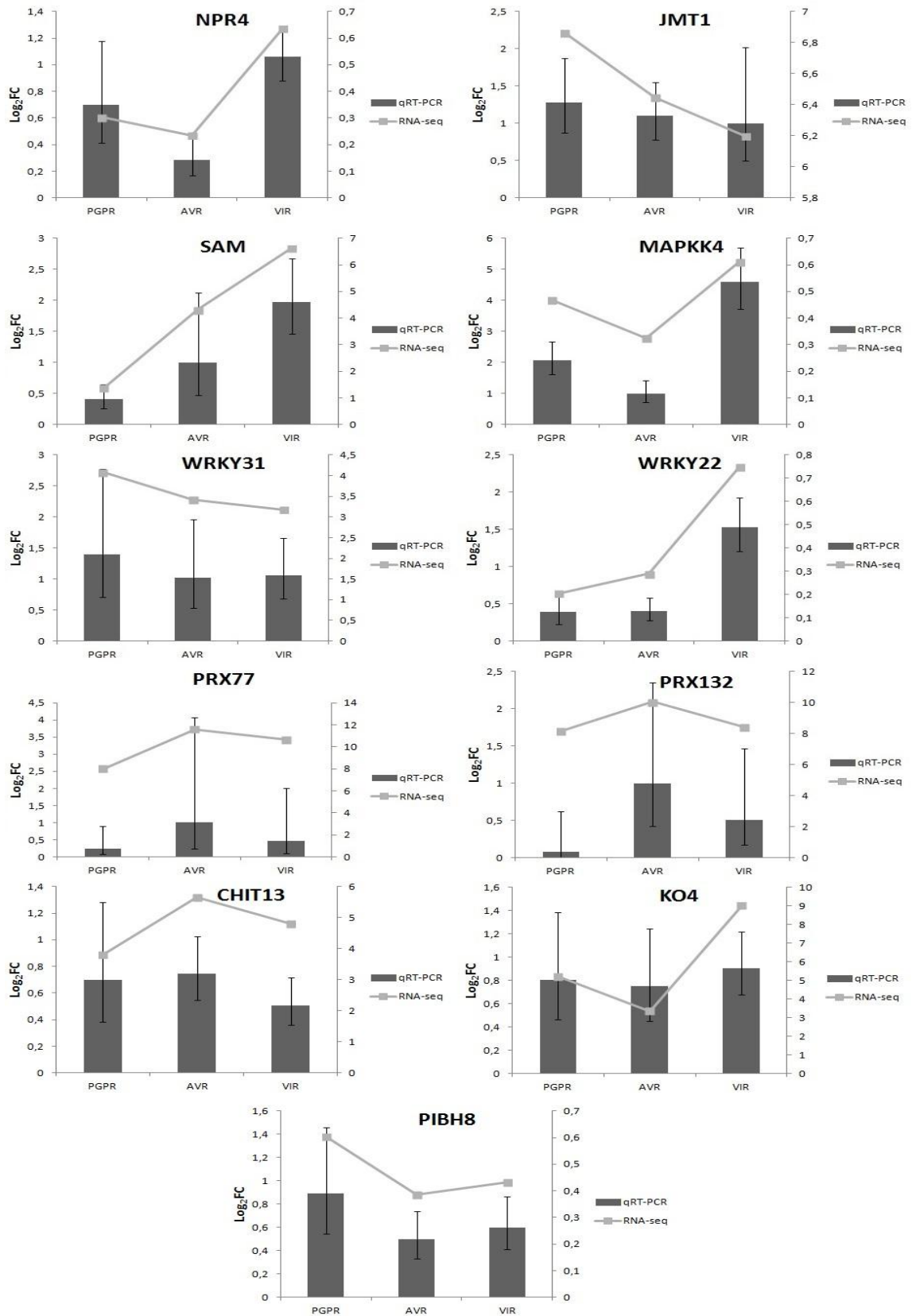


Figura 15 - Validação via qRT-PCR dos dados da expressão relativa do genes obtidos via RNA-seq. Níveis de expressão dos transcritos selecionados estão na barra preta (qRT-PCR) e na linha (RNA-seq). Dois genes, um de actina e outro de ubiquitina foram utilizados para normalização dos dados de qRT-PCR. As barras de erro indicam o desvio padrão para ensaios feitos com duplicata técnica.

4. DISCUSSÃO

É notável que o perfil dos transcritoemas dos três tratamentos foram diferentes (Figura 1). Levando-se em consideração a quantidade de genes modulados de forma diferencial, *M. oryzae* avirulento (AVR) foi o que apresentou o maior número de DEGs, seguido pelo indutor PGPR que pertence ao gênero *Serratia* sp. BRM32114 (PGPR) e *M. oryzae* virulento (VIR) (Figura 3).

A base genética dos componentes envolvidos na transdução de sinal que medeiam a relação entre PGPR e plantas é pouco conhecida com poucas informações relacionadas com a mudança no transcritoema de plantas colonizadas por rizobactérias (Stearns *et al.*, 2012; Poupin *et al.*, 2013). Até onde sabemos, esse é o primeiro relato de estudo relacionado com a mudança global na transcrição de genes em arroz induzido por *Serratia* sp. Os dois isolados de *M. oryzae* foram diferentes em relação ao transcritoema. Levando-se em consideração genes relacionados as resposta de defesa, a mudança no nível de expressão desencadeados na relação *Oryzae sativa*-*M. oryzae* é maior na interação incompatível do que na compatível. Isso sugere que as reações responsivas envolvidas na defesa da planta ao ataque do patógeno são mais ativas na interação incompatível (Kawahara *et al.*, 2012).

O perfil dos genes diferencialmente expressos nas plantas tratadas com os isolados de *M. oryzae* foram semelhantes. A quantidade de genes superexpressos em relação aos genes reprimidos foi maior nos tratamentos com o fungo *M. oryzae* (tanto AVR quanto VIR) do que nas plantas tratadas com PGPR (Figura 2). A quantidade de DEGs em comum entre AVR e VIR pode ser atribuído à natureza dos microrganismos, que apesar da diferença entre a virulência, se trata da mesma espécie de fungo, nada obstante a diferença entre o número de DEG observado em cada uma dessas condições (Figura 4). Apesar de se tratarem de agentes indutores diferentes, AVR e PGPR tiveram uma alta quantidade de DEGs compartilhados. Isso sugere que embora sejam agentes indutores distintos, há semelhanças nos mecanismo por eles são ativados nas plantas, contudo, existem particularidades no perfil gênico ativado em cada um desses tratamentos, como demonstrado pelos DEGs exclusivos em cada um. A alteração na resposta diferencial dos transcritos relacionados a defesa do arroz pode ser atribuída à diferença dos agentes indutores, indicando que fungos fitopatogênicos virulentos e rizobactérias desencadeiam diferentes respostas na planta de arroz. Além daqueles genes envolvidos em vias de sinalização de defesa, PGPRs podem promover o

crescimento e alteram rotas metabólicas envolvidas em outros processos fisiológicos da planta (Stearns *et al.*, 2012).

SA desempenha papel importante na resistência e defesa contra ataque de fitopatógenos. Em plantas induzidas com *Serratia* sp. BRM32114, genes envolvidos na síntese de SA e dos seus precursores, chiquimato e triptofano, foram modulados de forma diferencial. Três genes relacionados ao chiquimato foram superexpressos, bem como dois genes relacionados ao triptofano. Três genes com atividade de PAL também foram superexpressos nesta condição. Isso sugere que há uma modulação desses genes envolvidos com SA em plantas de arroz após a inoculação com *Serratia* sp. Trabalhos com *Azospirillum* também em arroz demonstraram a expressão diferencial de genes envolvidos na síntese de SA (Droque *et al.*, 2014). Estes resultados corroboram com aqueles apresentados neste trabalho no capítulo 1, onde plantas induzidas com *Serratia* sp., quando comparadas com os demais tratamentos, apresentaram maiores concentrações de SA antes e após o desafio com *M. oryzae*. Usa-se o termo SAR para indução de resistência ativada por patógenos ou dependente de SA e para ISR quando a indução de resistência é ativada por microrganismos benéficos (por exemplo: PGPR ou PGPF) de forma independente de SA e dependente de JA/ET (Pieterse *et al.*, 2014). Entretanto, diferente das informações contidas na maioria dos trabalhos, os resultados aqui apresentados indicam que indução de resistência em arroz ativada por rizobactérias aconteça de forma dependente de SA e que este hormônio interfere nas respostas de indução governadas por de JA e ET. Isso sugere que, em algumas situações, o termo SAR possa ser utilizado para induções dependentes de SA ativadas por PGPR ou que ISR englobe esse tipo de situação.

Jasmonato é um fitormônio que desempenha papel fundamental no crescimento de plantas e em respostas de defesa (Liu *et al.*, 2015). No total, 8 genes envolvidos na biossíntese de JA foram DEG em PGPR, porém, a maioria desses genes foram reprimidos. Genes que codificam enzimas com atividade de LOX tiveram valores negativos de FC; o mesmo se deu com genes responsivos a JA. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados no capítulo 1 onde avaliou-se a atividade dessa enzima. Nos primeiros momentos avaliados, a atividade de LOX foi menor nas plantas tratadas com rizobactérias do que nas testemunhas (plantas apenas desafiadas com *M. oryzae*). Esses resultados diferem de alguns trabalhos nos quais verificou-se a superexpressão de genes envolvidos na biossíntese de JA bem como aqueles

responsivos a este hormônio em plantas tratadas com rizobactérias (Pieterse *et al.*, 2014; Kouzai *et al.*, 2016).

Todos os três genes envolvidos na síntese etileno encontrados em PGPR foram reprimidos. O gene *ACC sintase* apresentou um FC negativo (*OsACS5*), (Figura 7; anexo tabela 4). Essa enzima catalisa o primeiro passo da via do etileno clivando o ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor imediato do etileno (Rzewuski, *et al.*, 2008). Os outros dois genes reprimidos foram *OsACO3* e *OsACO7*. ACC oxidase catalisa a segunda etapa da biossíntese deste hormônio. Quando estirpes de *Azospirillum* foram inoculadas em arroz, genes da síntese de ET foram reprimidos (Droque *et al.*, 2012). Quatro genes ERF com modulação diferencial foram encontrados em AVR e PGPR. Genes *OsERF* regulam a transcrição de genes envolvidos em resposta ao etileno (Riechman & Meyerowitz, 1998). PGPRs podem interferir na síntese de etileno nas plantas, diminuindo o nível desse hormônio por ter a capacidade de também produzi-lo (Stearns *et al.*, 2012).

Sete genes da família PR-2 foram DEG em plantas induzidas com *Serratia* sp. BRM32114. Essas enzimas apresentam atividade de β -1,3-glucanase, clivando β -1,3-glucano. A presença da rizobactéria ocasionou a superexpressão de cinco genes e repressão de dois genes desses genes (Figura 8; anexo tabela 5). Diversos trabalhos nos quais foram utilizadas rizobactérias como agentes indutores demonstraram um aumento na atividade de GLU nas plantas tratadas (Filippi *et al.*, 2011; Raj *et al.*, 2012). Assim como GLU, genes que codificam CHI também foram superexpressos, embora a quantidade desses genes tenha sido menor do que nas plantas tratadas com os isolados de *M. oryzae* AVR e VIR. Apenas cinco genes *CHI* foram superexpressos. Essa diferença pode ser atribuída à presença de quitina na parede celular dos fungos e ausente em bactérias (Minic, 2008). O gene *Sci*, similar ao *MPI* encontrado em milho, foi DEG em todas as condições, sendo mais superexpressos em PGPR. O produto desse gene é uma enzima que possui atividade inibidora de proteinase, sendo induzida em respostas a ferimentos causados por herbivoria e em resposta ao ataque de patógenos (Vila *et al.*, 2005). Diferente das outras PRPs aqui citadas, plantas induzidas com *Serratia* sp. apresentaram o maior número de genes *POX* (ou *PRX*) modulados diferencialmente dentre as três condições citadas com 33 representantes: 22 superexpressos e 13 reprimidos., . Embora PGPR também sejam capazes de ativar enzimas relacionadas a estresse oxidativo (García-Cristobal *et al.*, 2015), este foi dentre os tratamentos que teve maior números de genes *POX* reprimidos e maior quantidade de reprimidos. Apenas

dois genes envolvidos com metabolismo antioxidante foram DEG (*OsAPX8* e *OsCATB*). Talvez isso tenha relação com a grande quantidade de genes *POX* reprimidos. O genes *OsPRI0B*, membro da família PR-10, foi superexpresso em plantas induzidas com *Serratia* sp. O produto desses genes possui atividade de ribonuclease e pode desencadear respostas de defesa como a morte celular programada em plantas (Kim *et al.*, 2011). Este é o primeiro relato de rizobactérias induzindo resistência e modulando diferencialmente gene dessa família em arroz.

Dez fatores de transcrição pertencentes à família *WRKY* foram DEGs. A maioria deles foi reprimida (8 genes); apenas *OsWRKY17* e *OsWRKY31* foram superexpressos (Figura 9; anexo tabela 6). A superexpressão do gene *OsWRKY31* pode conferir resistência a brusone do arroz (Zhang *et al.*, 2008). Dentre esses TF, há genes responsivos a hormônios de defesa e ao ataque de patógenos, como o gene *OsWRKY22* apresentou os menores valores de FC em PGPR. Ele está envolvido na resistência de arroz a *M. oryzae* e a outros fungos não-patogênicos ao arroz (Abbruscato *et al.*, 2012). Alguns desses genes permaneceram como DEGs quando seus valores de FC foram normalizados com VIR, candidatando-os como marcadores de indução.

A cascata de MAPK é composta de três proteínas quinases ligadas funcionalmente, onde MAPK é fosforilada e ativada por uma MAPK quinase (MAPKK) que por sua vez é ativada por outra proteína quinase: MAPKK quinase (MAPKKK). *OsMAPKK4* que foi DEG em PGPR, está envolvido nos estágios iniciais da infecção, morte celular e na via dos diterpenóides, tanto em reações compatíveis quanto em incompatíveis (Kawahara *et al.*, 2012). Proteínas quinases são conhecidas também por atuarem no reconhecimento de PAMPs e MAMPs (Kishi-Kaboshi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015).

Pi2/9 (Os06g17970), gene R a brusone, foi DE apenas em PGPR. Esse envolvimento de PGPR na ativação de genes R em arroz já foi relatado (Drogue *et al.*, 2014). *XB3*, gene R relacionados a queima bacteriana, foi superexpresso apenas nas plantas induzidas com a rizobactéria. Isso pode ser atribuído à natureza do agente indutor ser semelhante ao do patógeno.

Genes que codificam fitoalexinas do arroz foram superexpressos em PGPR: dois do grupo dos flavonoides e cinco dos diterpenoides. Um gene que codifica uma isoflavona (Os01g01660) apresentou diferenças significativas em relação às outras condições (Figura 11; tabela anexo 9). Drogue *et al.* (2014) observaram a produção de fitoalexinas em arroz após o contato com rizobactérias.

Os resultados indicam que plantas tratadas com PGPR apresentaram maiores números de DEGs relacionados com P450. Desse total, 28 foram DE em PGPR, 22 em AVR e 22 em VIR. Há na literatura diversos trabalhos relacionados com a expressão diferencial de genes P450 induzida por patógenos (Abbruscato *et al.*, 2012; Matic *et al.*, 2016), entretanto, como aqui observado, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas também possuem essa capacidade (Kurabachew *et al.*, 2013; Drogue *et al.*, 2014), sugerindo que estas também são capazes de modificar genes envolvidos nessa rota metabólica.

Algumas proteínas reguladoras envolvendo o *cross-talk* entre SA e JA em arroz já foram identificadas, dentre elas estão as proteínas NPRs (De Vleeschauwer *et al.*, 2013) que, além desse papel regulador de vias hormonais, também está envolvido em respostas de defesa e indução de resistência (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2013). O gene OsNPR4 foi reprimido em PGPR, apresentando diferença significativa quando o FC desse tratamentos foi normalizado com VIR.

A presença de *M. oryzae* avirulento modulou de forma diferencial alguns genes relacionados com a biossíntese de SA e seus precursores. Na via do chiquimato, seis genes foram superexpressos. Três genes envolvidos na síntese do triptofano foram encontrados com expressão diferenciada, O gene que codifica a enzima anitrilato sintase (*OsASAI*) (Figura 5; anexo tabela 2) foi DEG apenas nas plantas induzidas com *M. oryzae* avirulento. Essa enzima está associada à síntese de compostos de defesa derivados da via do triptofano (Maeda & Dudaeva, 2012). Durante respostas de defesa, muitas plantas usam componentes derivados dos fenilpropanóides para se defender e as enzimas PAL são componentes-chaves nessa via metabólica, participando diretamente da biossíntese de SA (Kouzai *et al.*, 2016). *OsPAL02* apresentou maiores valores de FC em AVR. O aumento da expressão de genes envolvidos nas diferentes etapas de síntese de SA é comum em plantas apresentando SAR (Bagnaresi *et al.*, 2012).

Assim como em PGPR, plantas induzidas com AVR apresentaram um maior número de genes reprimidos da biossíntese de JA do que genes superexpressos. No total foram encontrados 11 DEGs, sete reprimidos e 4 superexpressos (Figura 6; anexo tabela 3). Este é um fitormônio que desempenha papel fundamental em respostas de defesa (Liu *et al.*, 2015) entretanto, em arroz, JA não é eficaz em respostas de defesa nos primeiros momentos da infecção por *M. oryzae*, sendo efetivo apenas na fase necrotrófica da colonização. Outros genes responsivos a JA e envolvidos também em respostas de defesa foram DEG nas condições avaliadas. *OsJAC1* e *OsHPL3* podem

conferir resistência a herbivoria. Estes e outros genes regulam respostas de defesa contra patógenos, como morte celular e, dependendo do nível de expressão, podem conferir resistência ou desencadear suscetibilidade a estresses bióticos (Tong *et al.*, 2012; Ishiga *et al.*, 2013).

A maioria dos DEGs envolvidos na síntese de ET e, principalmente, aqueles responsivos a este hormônio, foram encontrados em AVR. A presença do isolado de *M. oryzae* avirulento reprimiu grande parte desses genes. Genes que codificam componentes de sinalização do etileno como *EBF* foram DEG apenas em AVR (*OsEBF1* e *OsEBF2*), ambos reprimidos. *EBF* são genes envolvidos na transdução de sinal do etileno entre o receptor e o núcleo, ativando cascata de sinais de componentes após a detecção do etileno. Eles agem como proteínas *F-box*, envolvidos na interação proteína-proteína (Rzewuski, *et al.*, 2008). Uma das características de SAR é o acúmulo de SA. Assim como JA, ET também pode ser antagonico ao SA em respostas de defesa de plantas (Pieterse *et al.*, 2014). A repressão dos genes envolvidos com ET aqui encontrada pode devido a planta estar no "modo" SAR, onde suas respostas são mais efetivas contra a fase biotrófica de *M. oryzae*.

O gene *OsPR1a* foi reprimido e DEG apenas nas plantas induzidas com *M. oryzae* avirulento (Figura 8; anexo tabela 5). PR-1 possui atividade antifúngica e é a PRP mais abundante dentre as 17 famílias acumulando de 1 à 2 % do conteúdo proteico total da planta. A expressão de genes PR1 pode ser utilizada com marcador molecular para indicar respostas de defesa da planta (Gordon *et al.*, 1997). A presença do isolado avirulento aumentou a expressão de genes cujo produto são enzimas com atividade de β -1,3-glucanase. Estas são enzimas da família PR-2. A expressão diferencial de genes PR-2 pode indicar a ativação de mecanismos de degradação da parede celular de fungos uma vez que esses fitopatógenos possuem β -1,3-glucana como constituinte dessa estrutura. Bagnaresi *et al.* (2012) encontraram um maior número de genes que codificam β -1,3-glucanase em interações incompatíveis no patossistema *Oryza sativa*-*Magnaporthe oryzae*. Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados no segundo capítulo deste trabalho onde plantas de arroz induzidas com *M. oryzae* avirulento tiveram uma maior atividade de GLU quando comparada com as plantas não induzidas. Quitinases (CHI), outras enzimas envolvidas na degradação de produtos contidos na parede celular de fungos foi DEG nas condições aqui avaliadas. Dez genes que codificam quitinases (CHI) foram encontrados em AVR sendo superexpressos (Figura 8; anexo tabela 5). A presença do fungo avirulento foi mais eficiente na ativação

diferencial desses genes. Assim como observado no presente trabalho, outros artigos relatam a um aumento na quantidade de genes diferencialmente expressos que codificam CHI em plantas, especialmente em interações incompatíveis entre patógeno e hospedeira (Bagnaresi *et al.* 2012; Matic *et al.*, 2016). Quitinases têm representantes em quatro famílias de PRPs: PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11. Essas enzimas hidrolisam a ligação β ,1-4 de cadeias de quitina encontradas na parede de patógenos, produzindo N-acetilglucosamina, constituindo o segundo maior grupo de proteínas antifúngicas (Ferreira *et al.*, 2007). A expressão diferencial de quitinases e glucanases encontradas neste trabalho indicam suas funções mútuas de degradação da parede celular fúngica (Minic, 2008). Sob estresse, a produção de espécies reativas de oxigênio é induzida. O tratamento AVR foi o que apresentou maior número de genes *POX* superexpressos, 22 genes de um total de 31. (Figura 8; anexo tabela 5). Isolados avirulentos de *M. oryzae* são capazes de ativar enzimas relacionadas a estresse oxidativo (Kim *et al.*, 2009). Essa incompatibilidade entre patógeno-hospedeiro tem como uma das respostas o acúmulo de POX. Esses resultados respaldam aqueles encontrados no capítulo 2 onde plantas induzidas com isolado PY10749 AVR apresentaram uma maior atividade de POX, antes e após o desafio com *M. oryzae* virulento.

A maioria dos genes *WRKY* diferencialmente modulados em AVR foram reprimidos. Alguns estudos em arroz indicam a complexidade do papel dos fatores de transcrição *WRKY* desempenham em respostas de defesa, onde a superexpressão de genes *WRKY* como *WRKY96* leva à um aumento na resistência contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e a repressão de *WRKY4* pode ocasionar suscetibilidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Bagnaresi *et al.* (2012) onde vários genes *WRKY* foram modulados negativamente em cultivares de arroz resistentes à *M. oryzae*.

Neste estudo, 11 genes que codificam proteínas quinases foram diferencialmente expressos em AVR: 8 reprimidos e 3 superexpressos. Este foi o tratamento com maior número de DEGs. Todos os genes quinases DE aqui encontrados, com exceção de *OsMAPK1*, estão relacionados diretamente no reconhecimento de patógenos como *X. oryzae* pv. *oyzae* e *M. oryzae* e alguns deles, como *OsMAPK5*, são responsivos também a estresses abióticos (Yang *et al.*, 2015; Chandran *et al.*, 2016). A quantidade de genes *MAPK*, *MAPKK* e *MAPKKK* reprimidos aqui encontrados na interação incompatível foram superior aqueles encontrados em outros trabalhos semelhantes (Bagnaresi *et al.*, 2012).

A maioria dos genes R a diferentes patógenos foram diferencialmente modulados em AVR. *PIBH8* (Os08g42700), gene R a *M. oryzae* foi reprimido e o gene Os03g14900, cujo produto possui uma região NB-ARC/LRR foi DEG e suprexpresso apenas em plantas induzidas com *M. oryzae* avirulento. Identificação de genes de resistência (R) a diversas doenças é a meta do melhoramento genético para as doenças do arroz e o uso de patógenos avirulentos pode ser útil nessa busca (Droque *et al.*, 2014). Genes com estruturas motif relacionadas com genes R como quinases, sítio de ligação de nucleotídeo (NBS), região fica em leucina (LRR) e NBS-LRR. foram DEG (Figura 13; anexo tabela 8).

Dentre os tratamentos aqui utilizados AVR foi aquele com menor número de genes DEG relacionados com fitoalexinas. A presença do patógeno avirulento modulou diferencialmente apenas três desses genes. Dentre esses três, os maiores valores de FC foi observado nos dois genes que codificam isoflavonas redutases (Os01g01650 e Os01g01660), (envolvidos na síntese das maaquiaina e medicarpina) O gene *OsKO4*, envolvido na síntese de momilactona, foi o único DEG em AVR relacionado com fitoalexinas derivadas dos diterpenóides. Esse menor número de genes de fitoalexinas pode ser atribuído a interação incompatível entre planta e patógeno. Fitoalexinas são compostos produzidos após a infecção de plantas por patógenos e neste tratamento não houve infecção (Ahuja *et al.*, 2012).

Algumas proteínas reguladoras envolvendo o *cross-talk* entre SA e JA em arroz já foram identificadas, dentre elas estão as proteínas NPRs (De Vleeschauwer *et al.*, 2013) que, além desse papel regulador de vias hormonais, também está envolvido em respostas de defesa e indução de resistência (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2013). O gene OsNPR4 foi reprimido em PGPR, apresentando diferença significativa quando o FC desse tratamentos foi normalizado com VIR.

O gene OsNPR4 foi DEG e reprimido em PGPR e AVR e quando o FC desses tratamentos eram normalizados com VIR, houve diferença significativa nos níveis de expressão, sugerindo que esses dois agentes indutores ativam a expressão diferencial desse gene. Genes *NPR* codificam proteínas reguladoras envolvendo o *cross-talk* entre SA e JA. Ele também está envolvido no *downstream* de processos de indução de resistência, regulando a evolução de SAR e ISR (Pieterse *et al.*, 2014). No presente trabalho, esse gene foi diferencialmente expressos tanto em ISR (aqui desencadeado por *Serratia* sp.) como em SAR (ativado por *M. oryzae* avirulento PY10749)

Dos nove genes diferencialmente expressos em VIR envolvidos vias precursoras e de biossíntese de SA, a maioria deles estão envolvidos na síntese de chiquimato. Apenas dois envolvidos com triptofano e outros dois com SA. (Figura 5; Anexo tabela 2). Talvez isso seja devido a interferência que o fungo faz na planta, usando seus efetores para modular a expressão de SA a seu favor. *M. oryzae* é um patógeno hemibiotrófico. A colonização inicial dos tecidos da hospedeira ocorre biotroficamente. Nesse estilo de colonização, as respostas da planta de arroz governadas por SA são mais efetivas (Talbot, 2003).

Dentre os tratamentos aqui utilizados, o tratamento VIR, onde plantas de arroz foram desafiadas com *M. oryzae* virulento, foi aquele que apresentou uma maior quantidade de genes superexpressos envolvidos na biossíntese de JA (5) (Figura 6; Anexo tabela 3). A mesma situação se deu com genes DEG responsivos a este hormônio. A maior quantidade de genes dessa classe que foram superexpressos foram encontrados em VIR (Figura 6; Anexo tabela 3). Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados nos capítulos 1 e 3, onde nos momentos iniciais avaliados, a atividade de LOX, uma enzima chave na biossíntese de JA, foi alta nas plantas apenas desafiadas com *M. oryzae* virulento (testemunha). Altas concentrações de jasmonatos no início da infecção favorece a colonização dos tecidos infectados, pois JA atua como antagonista do SA; este último hormônio é essencial nas repostas de defesa da planta nos primeiros eventos da interação planta-patógeno. Alta resistência a patógenos necrotróficos é frequentemente correlacionada com um aumento na suscetibilidade à patógenos biotróficos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Isso sugere que patógenos podem modular os genes da hospedeira a seu favor. Uma vez que *M. oryzae* possui os dois tipos de colonização, portanto um patógeno hemibiotrófico, ele libera efetores que regulam a expressão gênica do arroz de modo a facilitar a colonização (Yi & Valent, 2013).

Quando comparado com os demais tratamentos, VIR apresentou menor quantidade de genes envolvidos na síntese e responsivos a ET (Figura 7; anexo tabela 4). Entretanto, *OsACS5* e *OsACO7*, genes envolvidos na primeira e segunda etapa de biossíntese de ET, apresentaram os maiores de FC em plantas desafiadas com *M. oryzae* virulento. Assim como JA, ET também pode antagonizar SA, favorecendo assim a colonização (Pieterse *et al.*, 2014).

Várias famílias de gene PR foram modulados diferencialmente em VIR. De modo geral, quando comparado aos demais tratamentos, o número de genes foi menor.

OsPR1b (Os01g28450) cujos produtos são inibidores de proteínases foi DEG apenas em plantas desafiadas com *M. oryzae* virulento, com FC muito superior aos demais tratamentos. Essa é uma proteína básica (*Basic PR-1*) considerada marcador de respostas de defesa e encontrada em cereais como arroz (Buchel *et al.*, 1999). Seu gene pode ter sido superexpresso em resposta a infecção de *M. oryzae*. Dois genes da família proteica PR10, com atividade de ribonuclease foram superexpressos em VIR: *OsPR10* (Os12g36860) *OsPR10B* (Os12g36850). Esses genes codificam proteínas em resposta a infecções e possuem papel-chave na morte celular programada (Kim *et al.*, 2011). *OsPR5* (Os03g45960) que possuem atividade de taumatina e permeabilizam a membrana fúngica, e *OsScil1*, que possui atividade inibidora de proteínase também foram superexpressos em VIR (Figura 8; anexo tabela 5). Plantas tratadas com *M. oryzae* virulento foram aqueles que apresentaram menos genes que codificam β -1,3-glucanases. PR-2 apresentam atividade de β -1,3-glucanase, clivando β -1,3-glucano. A presença do isolado virulento do patógeno não foi tão eficiente quando os outros tratamentos em desencadear a modulação diferencial de genes da família PR-2. A expressão diferencial desses genes pode indicar a ativação de mecanismos de degradação da parede celular de fungos uma vez que esses fitopatógenos possuem β -1,3-glucana como constituinte dessa estrutura. Bagnaresi *et al.* (2012) encontraram um menor número de genes que codificam β -1,3-glucanase em interações compatíveis no patossistema *Oryza sativa-Magnaporthe oryzae*. Esses resultados estão de acordo com os resultados de atividade de GLU dos capítulos 2 e 3, onde registrou-se menores atividades dessa enzima nas testemunhas. Outro grupo de genes envolvidos na degradação de produtos contidos na parede celular de fungos foi DEG nas condições aqui avaliadas. Oito genes que codificam quitinases (CHI) foram superexpressos em VIR, entretanto, os seus valores de FC foram menores do que aqueles observados em plantas tratadas com *M. oryzae* avirulento. Resultados semelhantes foram encontrados por Bagnaresi *et al.* (2012) onde o número de genes *CHI* em arroz foram menores em interações compatíveis do que em relações incompatíveis com *M. oryzae*. A presença de *M. oryzae* virulento ativou genes *POX*, entretanto, não foi tão eficiente quanto outros tratamentos, uma vez que o número desses genes foi menor quando comparado aos outros tratamentos (20 genes). A presença do patógeno virulento (VIR) ativou gene de duas enzimas também envolvidas na explosão oxidativa: OsRbohC e OsRbohH. Esses genes codificam enzimas com a atividade de NADPH oxidase. Na interação com patógenos, a invasão dos tecidos das plantas pelo agente patogênico pode desencadear

diferentes respostas de defesa da hospedeira; nesses casos, a falta ou a superexpressão de genes RBHO altera a produção de EROs, o que pode ser determinante para condições de suscetibilidade ou de resistência (Denness *et al.*, 2011). Por outro lado, neste tratamento também foi observado vários genes envolvidos no mecanismo antioxidante sendo superexpressos, como os genes *OsAOX1a*, *OsAPX3* e *OsAPX7*. Uma menor ativação de genes *POX* e ativação da maquinaria antioxidante da célula pode ser resultado de efetores do patógeno, modulando esses genes a seu favor, uma vez que a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas POX gera um efeito dominó, ativando outras respostas de defesa (Camejo *et al.*, 2016).

Fatores de transcrição (TF) são proteínas que podem ativar ou reprimir a transcrição em cascata de genes alvo por se ligarem diretamente aos promotores desses genes de maneira específica. O tratamento VIR foi aquele que apresentou menos genes *WRKY*. Muitos desses genes são genes relacionados a patogênese, envolvidos na indução de diferentes vias sinalizadoras de defesa de plantas e mostram forte respostas transcricional em plantas de arroz sob estresses (Rushton *et al.*, 2010), entretanto os resultados aqui mostrados sugerem que essa família gênica não foi modulada diferencialmente em plantas tratadas com *M. oryzae* virulento.

Proteínas quinases possuem papel importante no reconhecimento e amplificação de sinais e a subsequente ativação de mecanismos de defesa das plantas durante infecções causadas por patógenos. Em VIR, 7 genes que codificam proteínas quinases foram diferencialmente expressos. A maioria desses genes aqui encontrados que foram DE estão relacionados diretamente no reconhecimento de *M. oryzae* e alguns deles, (Yang *et al.*, 2015; Chandran *et al.*, 2016). Proteínas quinases (MAPK, KK e KKK) estão envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), ativando a maquinaria celular de defesa por meio de cascata de sinais (Kishi-Kaboshi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). Um menor número desses genes DEG encontrados em VIR pode levar ao não-ativação de respostas de defesas mais eficientes, facilitando a colonização da planta de arroz por *M. oryzae*.

O gene *PIBH8* (Os08g42700) foi reprimido em VIR. Esse é um gene de resistência a brusone do arroz e a sua repressão pode levar à um aumento da suscetibilidade a *M. oryzae*. Genes R relacionados a queima bacteriana foram superexpressos apenas nas plantas tratadas com *M. oryzae* virulento (Figura 13; anexo tabela 8). Os alelos recessivos de *OsXA13* e *OsXA21* conferem resistência a *X. oryzae* e quando na forma dominante e superexpressos, esses genes conferem suscetibilidade

tanto a *X. oryzae* quanto a *M. oryzae* (Peng *et al.*, 2008; Antony *et al.*, 2010), sugerindo que o patógeno modula a expressão desses genes ao seu favor.

Metabólitos secundários de baixo peso molecular com atividade antimicrobiana e induzíveis por estresses são conhecidos como fitoalexinas, possuem papel importante dentre os componentes de defesa de plantas (Ahuja *et al.*, 2012). Vinte e quatro horas após a aplicação dos indutores, dez genes relativos às fitoalexinas foram superexpressos. As fitoalexinas do arroz pertencem ao grupo dos flavonoides e diterpenoides. Muitos DEGs apresentaram diferenças significativas em relação às outras condições (Figura 11; tabela anexo 9). Fitoalexinas são compostos produzidos majoritariamente após o estabelecimento da infecção (Ahuja *et al.*, 2012; Bagnaresi *et al.*, 2012). Isso suporta os resultados aqui apresentados, onde plantas desafiadas com *M. oryzae* tiveram um maior número de genes DEG envolvidos na síntese de fitoalexinas.

Citocromo P450 (P450) são enzimas universais que, por meio da ativação do oxigênio molecular, catalizam uma ampla gama de substratos. Há na literatura diversos trabalhos relacionados com a expressão diferencial de genes P450 induzida por patógenos (Abbruscato *et al.*, 2012; Matic *et al.*, 2016), assim como observado neste trabalho.

Alguns genes que codificam proteínas reguladoras envolvendo o *cross-talk* entre SA e JA em arroz foram DEG em VIR. *SAM* (ácido salicílico carboxil metiltransferase, Os06g20960) foi diferencialmente expresso em, sendo também DEG quando os FC dos referidos tratamentos foram normalizados com VIR (Figura 14; anexo tabela 11). Ele codifica uma enzima que, além de atuar na conversão de SA em metil-salicilato, também pode agir em outros substratos, como JA, podendo ser um mediador entre as vias desses hormônios (Ogawa *et al.*, 2001). A superexpressão do gene *SLR1* (*DELLA protein Slender Rice 1*) confere resistência ao arroz contra brusone foliar por meio da amplificação e integração das vias sinalizadoras envolvendo SA e JA (De Vleeschauwer *et al.*, 2016). O gene *OsSLR1* foi DEG e reprimido apenas nas plantas desafiadas com *M. oryzae* virulento, sugerindo ter sido modulado pelo patógeno para favorecer a infecção.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou informações inéditas de estudos comparativos entre transcriptomas obtidos de plantas de arroz induzidas por diferentes microrganismos indutores.

O conjunto amplo de genes diferencialmente expressos observados mostrou que há variações nas respostas de defesa da planta quando induzida com diferentes agentes indutores, embora haja semelhanças entre as vias metabólicas por eles ativadas.

A rizobactéria *Serratia* sp. desencadeou ISR modulando de forma diferencial genes da biossíntese de SA e aumento na atividade de várias PRPs. *M. oryzae* avirulento PY10749 ativou SAR principalmente superexpressando genes *POX*, *GLU* e *CHI*. O isolado de *M. oryzae* virulento PY10900 interferiu na expressão diferencial de genes importantes da planta de arroz, modulando-os a seu favor.

Muitos transcritos encontrados neste trabalho podem ser utilizado como marcadores de indução das respostas de defesa associados com seu respectivo agente indutor. Estudos posteriores mais detalhado desses genes podem abastecer os bancos de fontes de resistência do melhoramento de cultivares visando o controle sustentável de diversas doenças dessa cultura.

6. LITERATURA CITADA

- ABBRUSCATO, P.; NEPUSZ, T.; MIZZI, L.; DEL CORVO, M.; MORANDINI, P.; FUMASONI, I.; MICHEL, C.; PACCANARO, A.; GUIDERDONI, E.; SCHAFFRATH, U.; MOREL, JB.; PIFFANELLI, P. & FAIVRE-RAMPANT, O. 2012. OsWRKY22, a monocot WRKY gene, plays a role in the resistance response to blast. *Molecular Plant Pathology* 13:828-841.
- AHUJA, I.; KISSEN, R. & BONES, A.M. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* 17:73-90.
- ANTONY, G.; ZHOU, J.; HUANG, S.; LI, T.; LIU, B.; WHITE, F. & YANG, B. 2010. Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by introduction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *The Plant Cell* 1-13. DOI 10.1105/tpc.110.078964.
- BAGNARESI, P.; BISELLI, C.; ORRÙ, L.; URSO, S.; CRISPINO, L.; ABBRUSCO, P.; PIFFANELLI, P.; LUPOTTO, E.; CATTIVELLI, L. & VALE, G. 2012. Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Plos One* 7:e51609.
- BOLLER, T. & FELIX, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379–406.
- BUHEL, A.S.; BREDERODE, F.T.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J. 1999. Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1 A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Molecular Biology* 40:387-396.
- CAMEJO, D.; GUZMÁN-CEDENO, A. & MORENO, A. 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103:10-23.

- CHANDRAN, A.K.N.; YOO, YH.; CAO, P.; SHARMA, R.; SHARMA, M.; CHRISTOPER, D.; RONALD, P. & JUNG, KH. 2016. Updated Rice Kinase Database RKD 2.0: enabling transcriptome and functional analysis of rice kinase genes. *Rice* 9:40.
- DENNESS, L.; MCKENNA, J.F.; SEGONZAC, C.; WORMIT, A.; MADHOU, P.; BENNETT, M.; MANSFIELD, J.; ZIPFEL, C. & HAMANN, T. 2011. Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156:1364-1374.
- DROGUE, B.; SANGUIN, H.; CHAMAM, A.; MOZAR, M.; LLAURO, C.; PANAUD, O.; PRINGENT-COMBARET, C.; PICAULT, N. & WINIEWSKI-DYE, F. 2014. Plant root transcriptome profiling reveals a strain-dependent response during *Azospirillum*-rice cooperation. *Frontiers in Plant Science* 5:607.
- FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; BORGES, A. & TEIXEIRA, A.R. 2007. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 8:677-700.
- FILIPPI, M.C., PRABHU, A.S., 2001. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36: 27–35.
- FILIPPI, MARTA C.C.; SILVA, GISELE B. & PRABHU, ANNE S. 2007. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. *Fitopatologia Brasileira* 32:387-392.
- FILIPPI, M.C.C.; SILVA; G.B.; SILVA-LOBO, V.L.; CÔRTEZ, M.V.C.B.; MORAES; A.J.G. & PRABHU, A.S., 2011. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, 58:160-166.

- GARCÍA-CRISTOBAL, J.; GARCÍA-VILLARACO, A.; RAMOS, B.; GUTIERREZ-MAÑERO, J.; LUCAS, J.A. 2015. Priming of pathogenesis related-proteins and enzymes related to oxidative stress by plant growth promoting rhizobacteria on rice plants upon abiotic and biotic stress challenge. *Journal of Plant Physiology* 188:72-79.
- GORDON-WEEKS, R.; SUGARS, J.M.; ANTONIUW, J.F. & WHITE, R.F. 1997. Accumulation of novel PR1 proteins in *Nicotiana* leaves in response to virus infection or treatment with salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50:263–273
- ISHIGA, Y.; ISHIGA, T.; UPPALAPATI, S.R. & MYSORE, K.S. 2013. Jasmonate ZIM-Domain (JAZ) protein regulates host and nonhost pathogen-induced cell death in tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Plos One* 8(9):e75728.
- KAWAHARA, Y.; OONO, Y.; KANAMORI, H.; MATSUMOTO, T.; ITOH, T. & MINAMI, E. 2012. Simultaneous rna-seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blas fungus interaction. *Plos One*, 7(11):e49423.
- KHUSH, G.S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* 59:1–6.
- KIM, S.G.; KIM, S.T.; WANG, Y.; YU, S.; CHOI, I.S.; KIM, Y.C.; KIM, W.T.; AGRAWAL, G.J.; RAKWAL, R. & KANG, K.Y. 2011. The RNase activity of rice Probenazole-Induced Protein 1 (PBZ1) plays a key role in cell death in plants. *Molecules and Cells* 31:25-31.
- KIM, S.T.; KANG, Y.H.; WANG, Y.; WU, J.; PARK, Z.Y.; RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; LEE, S.Y. & KANG, K.Y. 2009. Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor. *Proteomics* 9:1302-1313.
- KISHI-KABOSHI, M.; OKADA, K.; KURIMOTO, L.; MURAKAMI, S.; UMEZAWA, T.; SHIBUYA, N.; YAMANE, H.; MIYAO, A.; TAKATSUJI, H.;

- TAKAHASHI, A. & HIROCHIKA, H. 2010. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *The Plant Journal* 63:599-612.
- KOUZAI, Y.; KIMURA, M.; YAMANAKA, Y.; WATANABE, M.; MATSUI, H.; YAMAMOTO, M.; ICHINOSE, Y.; TOYODA, K.; ONDA, Y.; MOCHIDA, K. & NOUTOSHI, Y. 2016. Expression profiling of marker genes responsive to the defense-associated phytohormones salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology* 16:59.
- KURABACHEW, H.; STAHL, F. & WYDRA, K. 2013. Global gene expression of rhizobacteria-silicon mediated induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 84:44-52.
- LIU, Z.; ZHANG, S.; SUN, N.; LIU, H.; ZHAO, Y.; LIANG, Y.; ZHANG, L. & HAN, Y. 2015. Functional diversity of jasmonates in rice. *Rice* 8:5:1-13.
- MAEDA, H. & DUDAREVA, N. 2012. The Shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 63:73-105.
- MATIC, S.; BAGNARESI, P.; BISELLI, C.; ORRU, L.; CARNEIRO, G.A.; SICILIANO, I.; VALE, G.; GULLINO, M.L. & SPADARO, D. 2016. Comparative transcriptome profiling of resistant and susceptible rice genotypes in response to the seedborne pathogen *Fusarium fujikuroi*. *BMC Genomics* 17:608.
- MERSMANN, S.; BOURDAIS, G.; RIETZ, S. & ROBATZEK S. 2010. Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology* 154:391–400.
- MINIC, Z. 2008. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*. 227:723–40.

- MONTEIRO, S.; BARAKAT, M.; PIÇARRA-PEREIRA, M.A.; TEIXEIRA, A.R. & FERREIRA, R.B. 2003. Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*, 93:1505–1512.
- OGAWA, M.; HERAI, Y.; KOIZUMI, N.; KUSANO, T. & SANO, H. 2001. 7-Methylxanthine Methyltransferase of coffee plants. *The Journal of Biological Chemistry* 276:8213-8218.
- PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.M.; EMERINE, D.K. & MUKHTAR, M.S. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in Plant Science* 7:402-411.
- PENG, Y.; BARTLEY, L.E.; CHEN, X.; DARDICK, C.; CHERN, M.; RUAN, R.; CANLAS, P.E. & RONALD, P.C. 2008. OsWRKY62 is a negative regulator of basal and Xa21-mediated defense against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Molecular Plant* 1:446–458.
- PIETERSE, C.M.J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R.L.; WELLER, D.M.; Van WEES, S.C.M. & BAKKER, P.A.H.M. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52:347-375.
- POUPIN, M.J.; TIMMERMANN, T.; VEGA, A.; ZUÑIGA, A. & GONZÁLEZ, B. 2013. Effects of the plant growth-promoting bacteria, *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 8(7):e69435.
- RAJ, S.N.; LAVANYA, S.N.; AMRUTHESH, K.N.; NIRANJANA, S.R.; REDDY, M.S. & SHETTY, H.S. 2012. Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Biological Control*, 60:90-102.
- RIECHMANN, J.M. & MEYEROWITZ, E.M. 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry* 379:633–646.

- ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M. & JONES, J.D.G. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49:317-343.
- RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E.; RINGLER, P. & SHEN, Q.J. 2010. WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15:247–58.
- RZEWUSKI, G. & SAUTER, M. 2008. Ethylene biosynthesis and signaling in rice. *Plant Science* 175:32-42.
- STEARNS, J.C.; WOODY, O.Z.; MCCONKEY, B.J. & GLICK, B.R. 2012. Effects of bacterial ACC deaminase on *Brassica napus* gene expression. *Molecular Plant Microbe Interactions* 25:668-676.
- SCHWESSINGER, B. & ZIPFEL, C. 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:389–395.
- TALBOT, N.J. 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual review of microbiology* 57: 177–202.
- TONG, X.; QI, J.; ZHU, X.; MAO, B.; ZENG, L.; WANG, B.; LI, Q.; ZHOU, G., XU, X.; LOU, Y.; HE, Z. 2012. The rice hydroperoxide lyase OsHPL3 functions in defense responses by modulating the oxylipin pathway. *Plant Journal* 71:763–775.
- VILA, L.; QUILIS, J.; MEYNARD, D.; BREITLER, J.C.; MARFA, V.; MURILLO, I.; VASSAL, J.M.; MESSENGUER, J.; GUIDERDONI, E. & SAN SEGUNDO, E. 2005. Expression of the maize proteinase inhibitor (*mpi*) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology Journal* 3:187-202.

- De VLEESSCHAUWER, D.; GHEYSEN, G. & HOFTE, M. 2013. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in Plant Science* 18:555-565.
- De VLEESSCHAUWER, D.; SEIFI, H.S.; FILIPE, O.; HAECK, A.; HUU, S.N.; DEMEESTERE, K. & HOFTE, M. 2016. The DELLA protein SLR1 integrates and amplifies salicylic acid- and jasmonic acid-dependent innate immunity in rice. *Plant Physiology* 170:1831-1847.
- YANG, Z.; MA, H.; HONG, H.; YAO, W.; XIE, W.; XIAO, J.; LI, X. & WANG, S. 2015. Transcriptome-based analysis of mitogen-activated protein kinase cascades in the rice response to *Xanthomonas oryzae* infection. *Rice* 8:4.
- YI, M.; VALENT, B. 2013. Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. *Annual Review of Phytopathology* 51: 587-611.
- ZHANG J, PENG Y, GUO Z. 2008. Constitutive expression of pathogen-inducible OsWRKY31 enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants. *Cell Research* 18: 508–521

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados foram importantes para descrever como diferentes agentes, bióticos e abióticos, desencadeiam indução de resistência de forma sistêmica. O patossistema *Oryza sativa-Magnaporthe oryzae* é intensamente estudado e considerado um modelo para estudo em interação planta-patógeno, gerando muitas publicações. Entretanto, este trabalho foi o primeiro a comparar as vias de defesa na indução e suas interações.

Nos resultados obtidos foi possível observar a influência dos agentes indutores nas respostas de defesa e a interação entre essas respostas. A rizobactéria *Serratia* sp. BRM32114 promoveu crescimento das plantas de arroz e reduziu o progresso da doença. O balanço das repostas de defesa foi feito pela interação entre ácido salicílico e lipoxigenase (LOX) (enzima envolvida na síntese de ácido jasmônico).

A ativação das defesas da planta por isolado avirulento antes do desafio com *M. oryzae* virulento possibilitou resposta imune efetiva, não permitindo o estabelecimento da infecção. Os resultados indicam que houve um rápido reconhecimento do patógeno pela planta, envolvendo explosão oxidativa seguida do aumento na produção de proteínas relacionadas à patogênese e modificações histológicas que culminaram em respostas de hipersensibilidade (HR).

A aplicação exógena do ativador sintético acibenzolar-S-metil desencadeou respostas de defesa da planta semelhante à resposta ao isolado avirulento de *M. oryzae*, com a formação de sintomas de hipersensibilidade e altos níveis de peroxidase (POX). A aplicação de JA como agente indutor desencadeou uma suscetibilidade sistêmica das plantas de arroz que apresentaram alta severidade de brusone foliar. Esse elevado índice de doença esta relacionada com os altos valores de atividade LOX nas horas iniciais da infecção, uma vez que favoreceu a colonização dos tecidos foliares pelo patógeno. Quando JA e ASM foram aplicados em conjunto, as plantas apresentaram menor SBF do que as plantas que foram tratadas apenas com JA e maior área do que nas plantas induzidas com ASM, indicando o efeito antagônico entre ambos.

Finalmente, como observado nos outros capítulos, os genes que foram modulados diferencialmente nas plantas de arroz mostraram que há diferenças nas vias sinalizadoras bem como nas respostas de defesa desencadeadas por *Serratia* sp. e isolados AVR e VIR de *M. oryzae*.

As informações aqui reveladas demonstram que as interações das respostas imunes não são pontuais, onde muitos "atores" estão envolvidos e são capazes de mediar a comunicação com os indutores e também entre as rotas sinalizadoras. Desvendar o efeito cruzado das vias hormonais e os genes responsivos a elas servirão para determinar suas funções e potencializar os mecanismos envolvidos na relação benéfica entre agentes indutores e plantas.

ANEXOS

Tabela 1. Oligos utilizados na validação dos dados de RNAseq via qRT-PCR.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência	Escala de síntese	Purificação
LOC_Os01g61990_NPR4_F	GCAACTATCTCTGCTCGCTTTTT	25N	Dessalinizado
LOC_Os01g61990_NPR4_R	CACTTGTCGACGCTGATCCA	25N	Dessalinizado
LOC_Os05g01140_JMT1_F	CCGAAGTGTGGTCCAAGCA	25N	Dessalinizado
LOC_Os05g01140_JMT1_R	CCCGCTCATGCCAATCC	25N	Dessalinizado
LOC_Os06g20960_SAM_F	TGCACTATTGCTGGCTCGAA	25N	Dessalinizado
LOC_Os06g20960_SAM_R	CGATGGCCCCACGATACTTTC	25N	Dessalinizado
LOC_Os02g54600_MAPKK4_F_N	CCCACAATTTGCAGAATCCA	25N	Dessalinizado
LOC_Os02g54600_MAPKK4_R_N	GGTGTCCATCTGCTCCAGTTG	25N	Dessalinizado
LOC_Os01g53260_WRKY31_F_N	TCCCAGTTCTAATTAACGACCCATA	25N	Dessalinizado
LOC_Os01g53260_WRKY31_R_N	TGTGTGTTATTGTGTTTGTGTAGTAACTTG	25N	Dessalinizado
LOC_Os01g61080_WRKY22_F_N	CCAGAACTCGCTCTACTGACTGAA	25N	Dessalinizado
LOC_Os01g61080_WRKY22_R_N	ACGTACAAGTACAAAACCCCCCTAA	25N	Dessalinizado
LOC_Os06g16350_PRX77_F	CCAGCTCGAACCCCTTCAG	25N	Dessalinizado
LOC_Os06g16350_PRX77_R	CAGGGTTGCGATGGATCAGT	25N	Dessalinizado
LOC_Os11g10460_PRX132_F	GTTGTTACCTCCGCGTTATTC	25N	Dessalinizado
LOC_Os11g10460_PRX132_R	CCCCGCCCTTGTTTCGT	25N	Dessalinizado
LOC_Os09g32080_CHIT13_F	GTGAGGAGCTGTGGTTTGCA	25N	Dessalinizado
LOC_Os09g32080_CHIT13_R	CAACAAATTTCCCAAATCCATA	25N	Dessalinizado
LOC_Os06g37300_KO4_F	TTCAGTTGAATTGAGCACAAACCA	25N	Dessalinizado
LOC_Os06g37300_KO4_R	GAAGCCTCATCAGACGTTTGC	25N	Dessalinizado
LOC_Os08g42700_PIBH8_F	GGGAAAACCACTCTCGTCAAAA	25N	Dessalinizado
LOC_Os08g42700_PIBH8_R	GCTGGAAAGGACGCAATACAG	25N	Dessalinizado
LOC_Os05g36290_Sim-Actin1_F	GCAAAACCTGCCTTGACCAT	50N	Dessalinizado
LOC_Os05g36290_Sim-Actin1_R	GCCTCGTCAAGCAGAAGCA	50N	Dessalinizado
LOC_Os01g22490_UBQ5_F	AGGTGTTCAAGTTCCAAGGAGACTAG	50N	Dessalinizado
LOC_Os01g22490_UBQ5_R	GGAAGTAAGGAAGGAGGAGGAAAT	50N	Dessalinizado

TABELA 2. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com ácido salicílico (SA).

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR		
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	
Chiquimato	DHQDT/SDH shikimate dehydrogenase	LOC_Os01g27750	yes	1,4955	no	1,0718	yes	1,5790	no	-0,4237	no	0,0836	no	0,5073
	OsDAHPI	LOC_Os07g42960	yes	1,0945	no	0,4260	yes	1,2289	no	-0,6685	no	0,1344	no	0,8029
	OsDAHPS1	LOC_Os03g27230	yes	2,3533	yes	1,8502	yes	2,0133	no	-0,5031	no	-0,3399	no	0,1631
	OsEPSPS 5	LOC_Os06g04280	yes	1,3747	yes	0,9372	yes	1,3753	no	-0,4375	no	0,0005	no	0,4381
	OsSK3 Shikimate kinase	LOC_Os04g54800	yes	1,7678	yes	1,3184	yes	1,3831	no	-0,4494	no	-0,3846	no	0,0647
	Shikimate kinase CS domain	LOC_Os10g42700	yes	1,1290	no	0,3283	no	0,8171	no	-0,8007	no	-0,3119	no	0,4888
Triptofano	Aminodeoxychorismate synthase	LOC_Os06g48620	no	-0,8263	yes	-1,0627	no	-0,5560	no	-0,2363	no	0,2703	no	0,5066
	Anthranilate phosphoribosyltransferase	LOC_Os05g30750	yes	2,3037	yes	1,7243	yes	1,9967	no	-0,5794	no	-0,3070	no	0,2724
	OsASA1 Anthranilate synthase	LOC_Os03g61120	yes	1,2109	no	0,7846	no	0,7243	no	-0,4263	no	-0,4866	no	-0,0603
	Indol-3-glicerol fosfato-liase	LOC_Os03g58320	yes	-1,1204	no	-0,2119	yes	-1,0075	no	0,9086	no	0,1129	no	-0,7957
Ac. Salic.	OsPAL01 Phenylalanine ammonia-lyase	LOC_Os02g41680	no	0,8633	yes	0,8639	no	0,8125	no	0,0006	no	-0,0508	no	-0,0514
	OsPAL02 Phenylalanine ammonia-lyase	LOC_Os04g43760	yes	1,5155	yes	1,3283	yes	1,1447	no	-0,1872	no	-0,3709	no	-0,1836
	OsPAL08 Phenylalanine ammonia-lyase	LOC_Os02g41650	no	1,3061	yes	1,2578	yes	1,0807	no	-0,0484	no	-0,2254	no	-0,1770
	OsSGT salicylic acid glucosyltransferase	LOC_Os09g34250	no	0,8895	yes	1,2049	no	0,8951	no	0,3153	no	0,0055	no	-0,3098

FC: fold change.

TABELA 3. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com ácido jasmônico (JA).

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR		
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	
Biossíntese do Ácido Jasmônico (JA)	Oryzain beta chain precursor	LOC_Os04g57440	no	0,877782	yes	0,932404	no	0,679451	no	0,0546217	no	-0,198331	no	-0,25295
	OsAOS1 Allene oxide synthase	LOC_Os03g55800	yes	-1,7554	yes	-2,02794	yes	-1,26698	no	-0,272533	no	0,488425	no	0,760957
	OsAOS2 Allene oxide synthase	LOC_Os03g12500	no	1,37845	yes	1,51736	yes	1,79591	no	0,138918	no	0,417469	no	0,27855
	OsLOX1 Lipoxygenase	LOC_Os03g49380	no	0,883937	no	0,712633	yes	1,0223	no	-0,171304	no	0,138363	no	0,309668
	LOX Lipoxygenase 2.2	LOC_Os12g37320	yes	-1,97853	no	-1,46404	no	-1,48164	no	0,51449	no	0,496889	no	-0,0176
	OsLOX11 Lipoxygenase	LOC_Os12g37260	yes	-1,93237	no	-1,14921	no	-1,21423	no	0,783159	no	0,718134	no	-0,06502
	OsLOX12 Lipoxygenase	LOC_Os12g37350	yes	-1,82876	yes	-1,09099	yes	-1,2089	no	0,737775	no	0,619867	no	-0,11791
	OsLOX2 Lipoxygenase	LOC_Os08g39840	yes	-1,87369	yes	-1,82077	no	-0,766901	no	0,0529223	yes	1,10679	yes	1,05387
	OsLOX6 Lipoxygenase	LOC_Os04g37430	yes	-1,41429	yes	-1,68323	no	-0,705941	no	-0,268943	no	0,708349	no	0,977293
	OsLOX8 Lipoxygenase	LOC_Os08g39850	yes	1,28537	no	1,12376	yes	1,27643	no	-0,161611	no	-0,00894102	no	0,15267
	OsOPR1	LOC_Os06g11290	yes	1,27143	no	0,623613	yes	1,75194	no	-0,647819	no	0,480512	yes	1,12833
	OsRPL12-2	LOC_Os01g47330	yes	0,996576	no	0,326807	no	0,609515	no	-0,669769	no	-0,387061	no	0,282708
	Phospholipase A2	LOC_Os01g40070	yes	-1,75366	yes	-1,28497	yes	-1,25481	no	0,468682	no	0,498845	no	0,030163
	Phospholipase A2	LOC_Os03g50030	yes	2,12316	yes	1,76966	yes	2,11601	no	-0,353504	no	-0,00714608	no	0,346358
Genes responsivos ao JA	Enoyl-CoA hydratase	LOC_Os01g47350	yes	1,62151	yes	1,16846	yes	1,19091	no	-0,453054	no	-0,430605	no	0,022449
	Lecithin-cholesterol acyltransferase	LOC_Os02g37800	yes	1,9973	yes	1,62653	yes	2,10334	no	-0,370761	no	0,106049	no	0,47681
	OsBHLH148	LOC_Os03g53020	yes	-2,33398	yes	-2,58574	yes	-1,21784	no	-0,251763	yes	1,11614	yes	1,3679
	OsBHLH6, RERJ1	LOC_Os04g23550	yes	-3,19871	yes	-3,25805	yes	-1,72405	no	-0,0593459	yes	1,47465	yes	1,534
	OsFAD7W-3 fatty acid desaturase	LOC_Os03g18070	yes	-1,20056	yes	-2,29879	no	-0,609845	yes	-1,09823	no	0,590717	yes	1,68894
	OsHPL3 Hydroperoxide lyase	LOC_Os02g02000	yes	-1,52089	yes	-1,36349	yes	-1,57421	no	0,157394	no	-0,0533237	no	-0,21072
	OsJAC1 jacalin-related lectin	LOC_Os12g14440	yes	-4,14152	yes	-1,66899	yes	-1,79616	yes	2,47253	yes	2,34536	no	-0,12717
	OsJAZ12	LOC_Os10g25290	yes	-1,42106	yes	-1,60017	no	-0,698766	no	-0,179108	no	0,722295	no	0,901403
	OsJAZ13	LOC_Os10g25230	yes	-5,6665	yes	-5,22021	yes	-2,92285	no	0,446289	yes	2,74365	yes	2,29736
	OsJAZ3	LOC_Os03g08310	yes	-2,15691	yes	-2,07221	no	-0,587665	no	0,084698	yes	1,56924	yes	1,48455

OsJAZ4	LOC_Os03g08330	yes	-3,26719	yes	-3,26477	yes	-1,33316	no	0,00242113	yes	1,93403	yes	1,9316
OsJAZ5	LOC_Os03g28940	yes	-1,056	yes	-1,32533	no	-0,56464	no	-0,269324	no	0,491364	no	0,760688
OsJMT1	LOC_Os05g01140	yes	2,68811	yes	2,77915	yes	2,63175	no	0,0910449	no	-0,0563578	no	-0,1474
OsMYC2	LOC_Os10g42430	yes	-1,17301	yes	-0,986484	no	-0,890457	no	0,186525	no	0,282552	no	0,096027
OsSLRL1	LOC_Os01g45860	yes	1,99366	no	1,64973	no	1,68309	no	-0,343939	no	-0,310578	no	0,033361
OsTHI32 Thionin	LOC_Os09g24350	yes	1,77558	yes	2,24052	no	1,27576	no	0,464937	no	-0,499823	no	-0,96476
phospholipase C	LOC_Os03g30130	yes	1,77609	yes	1,53564	yes	1,62329	no	-0,240458	no	-0,152807	no	0,087651
phospholipase C	LOC_Os05g03610	yes	2,39088	yes	1,89142	yes	1,93933	no	-0,499461	no	-0,451554	no	0,047907
phospholipase C	LOC_Os08g01310	yes	1,67094	yes	1,40877	yes	1,68506	no	-0,262174	no	0,0141139	no	0,276288
RERJ1	LOC_Os01g09620	yes	1,50857	yes	1,70203	no	0,31214	no	0,193454	Yes	-1,19643	yes	-1,38988

FC: fold change.

TABELA 4. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com Etileno (ET).

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR		
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	
Síntese ET	OsACO3 ACC oxydase	LOC_Os09g27750	yes	-1,40637	yes	-1,36816	yes	-1,55895	no	0,03822	no	-0,15258	no	-0,19079
	OsACO5 ACC oxydase	LOC_Os05g05680	no	-0,55325	yes	-1,36026	no	0,18823	no	-0,80702	no	0,74148	yes	1,54850
	OsACO7 ACC oxydase	LOC_Os01g39860	yes	2,15657	no	1,04013	yes	2,52130	no	-1,11644	no	0,36473	yes	1,48117
	OsACS5 ACC synthase	LOC_Os01g09700	yes	-4,07224	yes	-3,94518	yes	-1,38810	no	0,12707	yes	2,68414	yes	2,55708
Etileno-Responsivo	EBF1 EIN3-BINDING F-BOX	LOC_Os06g40360	yes	-1,19616	no	-0,66440	no	-0,30965	no	0,53177	yes	0,88652	no	0,35475
	EBF2 EIN3-BINDING F-BOX	LOC_Os02g10700	yes	-1,32652	no	-0,64020	no	-0,44232	no	0,68632	no	0,88420	no	0,19788
	OsERF3 Ethylene response TF	LOC_Os01g58420	yes	-1,08277	yes	-0,90144	no	-0,40895	no	0,18133	no	0,67382	no	0,49249
	OsERF93 Ethylene-responsive TF	LOC_Os04g46220	yes	-1,36781	yes	-1,02598	yes	-1,38592	no	0,34184	no	-0,01811	no	-0,35994
	OsERF91 Ethylene-responsive TF	LOC_Os02g43790	yes	-2,02052	yes	-1,90522	no	-0,70392	no	0,11529	yes	1,31659	yes	1,20130
	OsERF101 Ethylene-responsive TF	LOC_Os04g32620	yes	1,20858	yes	1,34435	yes	1,01498	no	0,13577	no	-0,19360	no	-0,32937

FC: fold change.

TABELA 5. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados proteínas relacionadas à patogênese (PRP).

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR	
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC
B-1, 3-glucanase 10	LOC_Os01g51570	yes	-1,21035	yes	-1,26831	no	-0,28917	no	-0,05796	no	0,92118	yes	0,97914
B-1,3- endoglucanase GV	LOC_Os01g71810	yes	2,36491	no	0,29159	no	1,48634	yes	-2,07332	no	-0,87857	no	1,19475
B-1,3-endoglucosidase	LOC_Os02g04670	yes	1,39523	no	1,12080	yes	1,24522	no	-0,27443	no	-0,15001	no	0,12442
B-1,3-endoglucosidase	LOC_Os07g32600	yes	1,67937	no	1,18620	no	1,13471	no	-0,49317	no	-0,54467	no	-0,05150
B-1,3-endoglucosidase	LOC_Os07g35560	yes	-1,24801	yes	-1,47356	no	-0,12795	no	-0,22555	yes	1,12006	yes	1,34561
B-1,3-endoglucosidase	LOC_Os09g09980	yes	2,06265	yes	1,96841	yes	1,94231	no	-0,09424	no	-0,12034	no	-0,02610
B-1,3-endoglucosidase	LOC_Os11g36940	yes	2,73427	yes	3,00828	yes	2,55546	no	0,27401	no	-0,17881	no	-0,45282
B-1,3-glucanase	LOC_Os01g71820	yes	2,46108	yes	2,53004	yes	2,47646	no	0,06897	no	0,01538	no	-0,05358
B-1,3-glucanase-like protein	LOC_Os03g46660	no	0,86856	yes	0,96159	no	0,60843	no	0,09303	no	-0,26013	no	-0,35316
OsEGL2 Endo-(1,3;1,4)-beta-glucanase 2	LOC_Os05g31140	no	-0,45585	no	-0,25099	yes	-1,30800	no	0,20486	no	-0,85215	yes	-1,05701
OsGLN1 B-1, 3-endoglucanase 1	LOC_Os01g71474	yes	2,25525	no	1,36849	yes	1,90837	no	-0,88676	no	-0,34687	no	0,53988
OsGNS9 B-1, 3-glucanase 9	LOC_Os01g71830	yes	2,75064	yes	2,70037	yes	3,01429	no	-0,05027	no	0,26365	no	0,31392
OsPR2 B-1,3-glucanase	LOC_Os02g53200	yes	1,29471	no	0,71721	no	0,88491	no	-0,57751	no	-0,40981	no	0,16770
Chitinase Clas III	LOC_Os11g47600	yes	2,52346	no	1,04387	yes	2,31595	yes	-1,47959	no	-0,20752	yes	1,27208
Chitinase Class III	LOC_Os11g47500	yes	1,75465	yes	1,84648	yes	1,60490	no	0,09182	no	-0,14975	no	-0,24158
CHIT1	LOC_Os06g51060	yes	1,33423	yes	1,13065	yes	1,35365	no	-0,20358	no	0,01943	no	0,22300
CHIT2	LOC_Os04g41620	yes	1,32016	yes	1,61988	yes	1,14625	no	0,29972	no	-0,17391	no	-0,47363
CHIT3	LOC_Os06g51050	yes	2,39048	no	1,42739	no	1,79135	no	-0,96308	no	-0,59913	no	0,36396
CHIT5	LOC_Os04g41680	yes	1,31458	yes	1,66361	yes	1,30466	no	0,34903	no	-0,00992	no	-0,35895
CHT8	LOC_Os10g39680	yes	1,66946	no	0,88997	yes	2,04146	no	-0,77949	no	0,37200	yes	1,15149
CHIT9	LOC_Os05g33140	yes	2,80389	no	2,56298	no	2,13050	no	-0,24092	no	-0,67340	no	-0,43248
CHIT13	LOC_Os09g32080	yes	2,50306	yes	1,93080	yes	2,26750	no	-0,57225	no	-0,23556	no	0,33670
OsPR4b Chitinase Activity	LOC_Os11g37960	yes	1,74990	no	1,00966	yes	1,56262	no	-0,74025	no	-0,18728	no	0,55296
OsPR1a	LOC_Os07g03730	yes	-1,00699	no	-0,78533	no	-0,57659	no	0,22166	no	0,43040	no	0,20875
OsPR1b	LOC_Os01g28450	no	-0,01347	no	0,13898	yes	1,13920	no	0,15245	yes	1,15267	yes	1,00022

OsPR5 Alpha-amylase/trypsin inhibitor	LOC_Os03g45960	yes	1,91788	yes	1,89502	yes	1,74998	no	-0,02286	no	-0,16790	no	-0,14504
Scil PR6	LOC_Os12g25090	yes	1,92920	yes	2,45164	yes	2,06427	no	0,52244	no	0,13507	no	-0,38738
PR10	LOC_Os12g36860	no	0,27198	no	0,71556	yes	1,46646	no	0,44358	no	1,19448	no	0,75090
OsPR10a PBZ11	LOC_Os12g36830	no	0,20646	no	0,25120	no	0,87882	yes	0,92972	yes	1,32787	yes	1,36448
OsPR10B PBZ1	LOC_Os12g36850	no	0,55066	yes	1,19672	yes	1,55768	no	0,64605	yes	1,00702	no	0,36097
Peroxidase precursor	LOC_Os04g51300	no	-0,86988	yes	-1,51822	no	-0,78989	no	-0,64834	no	0,07999	no	0,72832
POX1 class III	LOC_Os05g41990	yes	3,06950	yes	3,10051	yes	2,87936	no	0,03102	no	-0,19014	no	-0,22115
PRX4 class III	LOC_Os01g16450	yes	1,59807	yes	1,65068	yes	2,07687	no	0,05260	no	0,47880	no	0,42619
POX5.1 class III	LOC_Os07g48040	yes	-2,30900	yes	-2,32541	no	-0,06553	no	-0,01641	yes	2,24347	yes	2,25989
POX8.1 class III	LOC_Os07g48010	no	-1,46551	yes	-1,78676	no	-0,91988	no	-0,32125	no	0,54564	no	0,86689
PRX precursor	LOC_Os01g22249	yes	-2,21569	yes	-3,53941	no	-0,71512	no	-1,32372	no	1,50057	yes	2,82429
PRX precursor	LOC_Os01g28030	yes	1,73406	yes	1,30314	yes	1,50083	no	-0,43092	no	-0,23323	no	0,19769
PRX11 class III	LOC_Os01g19020	no	0,88525	no	0,22485	no	0,85088	no	-0,66040	no	-0,03437	no	0,62603
PRX16 class III	LOC_Os01g22370	yes	2,05234	yes	1,83084	yes	1,81426	no	-0,22150	no	-0,23807	no	-0,01657
PRX22, class III	LOC_Os01g73200	yes	-1,47434	yes	-2,11782	no	0,12520	no	-0,64348	yes	1,59953	yes	2,24301
PRX26 class III	LOC_Os02g14170	yes	1,60379	yes	1,27485	no	1,04579	no	-0,32894	no	-0,55801	no	-0,22907
PRX29 class III	LOC_Os02g14440	yes	-2,64842	yes	-2,89885	yes	-1,42170	no	-0,25043	yes	1,22672	yes	1,47715
PRX32 class III	LOC_Os02g58720	yes	2,15293	yes	1,45555	yes	1,84618	no	-0,69737	no	-0,30675	no	0,39062
PRX33 class III	LOC_Os03g02920	yes	1,43224	yes	1,21946	yes	1,58275	no	-0,21278	no	0,15052	no	0,36330
PRX39 class III	LOC_Os03g13200	yes	3,31846	yes	2,61974	yes	2,85189	no	-0,69872	no	-0,46657	no	0,23215
PRX45 class III	LOC_Os03g25330	yes	2,57656	yes	1,93024	yes	1,95564	no	-0,64633	no	-0,62093	no	0,02540
PRX51, class III	LOC_Os03g55420	yes	1,58511	no	1,27135	no	1,30470	no	-0,31376	no	-0,28041	no	0,03335
PRX59 class III	LOC_Os04g59150	yes	-1,58544	yes	-1,34419	no	-0,40231	no	0,24125	yes	1,18313	yes	0,94188
PRX61 class III	LOC_Os04g59190	no	0,95913	yes	1,42439	no	0,48421	no	0,46526	no	-0,47492	no	-0,94018
PRX62 class III	LOC_Os04g59200	yes	-2,37540	yes	-2,44490	no	-0,81560	no	-0,06951	yes	1,55980	yes	1,62931
PRX63 class III	LOC_Os04g59210	yes	-1,31645	yes	-1,38543	no	-0,91293	no	-0,06898	no	0,40352	no	0,47250
PRX65 class III	LOC_Os05g04380	yes	2,17184	yes	1,77567	yes	1,91975	no	-0,39617	no	-0,25210	no	0,14407
PRX71 class III	LOC_Os05g04500	yes	2,64029	yes	2,36325	yes	2,16255	no	-0,27704	no	-0,47773	no	-0,20070

PRX72 class III	LOC_Os05g06970	yes	2,38710	yes	2,81913	yes	1,74046	no	0,43202	no	-0,64665	no	-1,07867
PRX77 class III	LOC_Os06g16350	yes	3,53625	yes	3,00207	yes	3,40916	no	-0,53417	no	-0,12709	no	0,40709
PRX78 class III	LOC_Os06g20150	yes	-1,61012	yes	-1,62692	no	-0,57486	no	-0,01680	no	1,03526	no	1,05206
PRX89 class III	LOC_Os06g46799	yes	2,15615	yes	1,94379	yes	1,73216	no	-0,21236	no	-0,42399	no	-0,21163
PRX91 class III	LOC_Os06g48020	yes	2,09201	yes	2,67580	no	1,28043	no	0,58379	no	-0,81158	yes	-1,39536
PRX97 class III	LOC_Os07g01370	yes	2,94031	yes	2,34454	yes	2,57986	no	-0,59577	no	-0,36045	no	0,23531
PRX109 class III	LOC_Os07g47990	no	-1,29978	yes	-1,81951	no	-0,68625	no	-0,51973	no	0,61353	no	1,13326
PRX115 class III	LOC_Os07g48060	yes	1,68838	no	1,10908	yes	1,39910	no	-0,57929	no	-0,28928	no	0,29002
PRX117 class III	LOC_Os08g02110	no	-1,40956	yes	-2,51455	no	-0,33174	no	-1,10499	no	1,07782	yes	2,18281
PRX122, class III	LOC_Os09g29490	yes	-1,41655	yes	-1,25625	no	-0,48565	no	0,16030	no	0,93090	no	0,77060
PRX123 class III	LOC_Os09g32964	yes	2,39489	yes	1,92842	yes	1,70352	no	-0,46648	no	-0,69138	no	-0,22490
PRX125 class III	LOC_Os10g02040	yes	1,08317	no	0,66807	yes	1,07309	no	-0,41510	no	-0,01008	no	0,40503
PRX132 class III	LOC_Os11g10460	yes	3,32826	yes	3,02896	yes	3,07646	no	-0,29930	no	-0,25181	no	0,04750
PRX138 class III	LOC_Os12g34524	yes	2,54376	yes	2,27448	yes	2,36420	no	-0,26928	no	-0,17956	no	0,08972
AOX1a alternative oxidase-1a	LOC_Os04g51150	no	0,83291	no	0,62035	yes	0,92205	no	-0,21256	no	0,08914	no	0,30170
OsAPX3 ascorbate peroxidase 3	LOC_Os04g14680	yes	2,24821	no	1,49133	yes	2,00048	no	-0,75688	no	-0,24774	no	0,50914
OsAPX7 ascorbate peroxidase 7	LOC_Os04g35520	no	0,95422	no	0,48991	yes	1,01581	no	-0,46430	no	0,06159	no	0,52590
OsAPX8 ascorbate peroxidase 8	LOC_Os02g34810	yes	-1,16271	yes	-1,45635	no	-0,93537	no	-0,29364	no	0,22734	no	0,52098
OsCATB Catalase isozyme B	LOC_Os06g51150	no	0,80670	yes	0,96719	no	0,51894	no	0,16048	no	-0,28777	no	-0,44825
OsRbohC Respiratory Burst Oxidase Homolog C	LOC_Os05g45210	no	1,00415	no	0,96806	yes	1,37071	no	-0,03610	no	0,36656	no	0,40266
OsRbohH Respiratory Burst Oxidase Homolog H	LOC_Os12g35610	no	2,09205	no	2,09316	yes	2,05553	no	0,00112	no	-0,03651	No	-0,03763

FC: fold change.

TABELA 6. Genes diferencialmente expressos (DEG) da família de fatores de transcrição WRKY.

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR	
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC
OsWRKY4	LOC_Os06g44010	yes	-1,83049	yes	-2,02189	no	-0,16877	no	-0,19140	yes	1,66172	yes	1,85312
OsWRKY17	LOC_Os02g53100	yes	2,44555	yes	2,59832	yes	2,05925	no	0,15278	no	-0,38629	no	-0,53907
OsWRKY18	LOC_Os02g08440	yes	-2,80103	yes	-2,73397	yes	-1,28228	no	0,06706	yes	1,51875	yes	1,45169
OsWRKY22	LOC_Os01g61080	yes	-1,78758	yes	-2,28387	no	-0,41491	no	-0,49629	yes	1,37267	yes	1,86897
OsWRKY31	LOC_Os01g53260	yes	1,77129	yes	2,03111	yes	1,66821	no	0,25981	no	-0,10308	no	-0,36290
OsWRKY46	LOC_Os05g46020	yes	-1,14194	yes	-1,12337	no	-0,13591	no	0,01858	yes	1,00603	no	0,98746
OsWRKY63	LOC_Os05g09020	yes	-1,45527	yes	-1,17784	no	-0,47963	no	0,27743	yes	0,97564	no	0,69821
OsWRKY69	LOC_Os05g39720	no	-0,56447	yes	-1,22390	no	0,49802	no	-0,65943	yes	1,06250	yes	1,72193
OsWRKY58	LOC_Os09g25060	no	-0,73446	no	-0,22925	yes	-1,16555	no	0,50522	no	-0,43109	yes	-0,93631
OsWRKY42	LOC_Os04g21950	yes	-1,01826	no	-0,81993	no	-0,63394	no	0,19833	no	0,38431	no	0,18598
OsWRKY60	LOC_Os05g50700	yes	-2,27437	yes	-2,27415	no	-1,19011	no	0,00022	no	1,08425	no	1,08403
OsWRKY61	LOC_Os05g27730	yes	-2,01679	yes	-1,48539	yes	-1,13918	no	0,53141	no	0,87761	no	0,34620
OsWRKY96	LOC_Os01g14440	yes	-1,04951	no	-0,87226	no	-0,39531	no	0,17725	no	0,65420	no	0,47695

FC: fold change.

TABELA 7. Genes diferencialmente expressos (DEG) da família proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, MAPKK e MAPKKK).

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR	
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC
MAPK1	LOC_Os08g42700	yes	-1,37432	no	-0,72751	yes	-1,20552	no	0,64681	no	0,16880	no	-0,47801
MAPK5	LOC_Os03g17700	yes	-1,39612	yes	-1,44889	no	-0,32213	no	-0,05277	yes	1,07399	yes	1,12676
MAPK10	LOC_Os01g43910	yes	1,52699	yes	1,37009	yes	1,18199	no	-0,15690	no	-0,34499	no	-0,18809
MAPKK4	LOC_Os02g54600	yes	-1,62786	yes	-1,10022	no	-0,70848	no	0,52764	no	0,91938	no	0,39174
MAPKK10-2	LOC_Os03g12390	yes	-1,30029	yes	-1,10877	yes	-1,41147	no	0,19151	no	-0,11118	no	-0,30270
MAPKKK3	LOC_Os02g32610	yes	-1,61140	yes	-1,22874	yes	-0,87212	no	0,38266	no	0,73928	no	0,35662
MAPKKK20	LOC_Os07g38530	yes	-0,84621	no	-0,84033	no	-0,63282	no	0,00588	no	0,21339	no	0,20751
MAPKKK30	LOC_Os02g02780	yes	1,71473	yes	1,74678	yes	1,22123	no	0,03205	no	-0,49350	no	-0,52555
MAPKKK62	LOC_Os01g50420	yes	-2,93351	yes	-2,29300	no	-0,97435	no	0,64051	yes	1,95916	no	1,31865
MAPKKK70	LOC_Os01g50410	yes	-2,66003	yes	-2,18934	yes	-1,65682	no	0,47069	no	1,00321	no	0,53252
MAPKKK74	LOC_Os01g66860	yes	2,66536	yes	2,50577	yes	2,64350	no	-0,15958	no	-0,02186	no	0,13773

FC: fold change.

TABELA 8. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com genes de resistência (R).

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR	
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC
Disease resistance RPP13-like protein 1	LOC_Os10g04090	no	0,78275	no	0,81283	yes	1,20561	no	0,03008	no	0,42286	no	0,39278
Leucine-rich repeat resistance protein	LOC_Os03g11340	yes	1,27189	no	0,83419	yes	1,27887	no	-0,43770	no	0,00698	no	0,44468
OsDR8	LOC_Os07g34570	yes	1,02973	no	0,81063	no	0,55667	no	-0,21910	no	-0,47306	no	-0,25396
OsMT2b	LOC_Os05g02070	yes	1,58601	yes	1,37504	no	0,97344	no	-0,21097	no	-0,61256	no	-0,40160
OsXB15	LOC_Os03g60650	yes	-1,13752	yes	-1,12879	no	-0,38618	no	0,00873	no	0,75134	no	0,74261
RBB12-1	LOC_Os01g03320	yes	-1,65909	yes	-1,35395	yes	-1,53562	no	0,30514	no	0,12347	no	-0,18167
RBB12-2	LOC_Os01g03310	yes	-1,21261	yes	-1,08628	yes	-1,12591	no	0,12633	no	0,08670	no	-0,03962
NB-ARC/LRR disease resistance protein	LOC_Os03g14900	yes	1,24126	no	1,03509	no	1,11156	no	-0,20617	no	-0,12970	no	0,07647
NBS-LRR Pi2/9 homolog	LOC_Os06g17970	no	-0,69782	yes	-0,91847	no	-0,72778	no	-0,22065	no	-0,02996	no	0,19069
PIBH8 NB-ARC domain	LOC_Os08g42700	yes	-1,37432	no	-0,72751	yes	-1,20552	no	0,64681	no	0,16880	no	-0,47801
RGA3 NB-ARC domain	LOC_Os06g47800	yes	1,86137	yes	1,70733	yes	1,91901	no	-0,15404	no	0,05764	no	0,21168
XA13	LOC_Os08g42350	yes	2,84240	no	1,56029	yes	2,20710	no	-1,28210	no	-0,63529	no	0,64681
XA21	LOC_Os11g35500	yes	1,84396	no	1,37894	yes	1,99502	no	-0,46502	no	0,15106	no	0,61608
XB3	LOC_Os05g02130	no	0,70456	yes	0,96170	no	0,65094	no	0,25714	no	-0,05362	no	-0,31076

FC: fold change.

TABELA 9. Genes diferencialmente expressos (DEG) relacionados com síntese de fitoalexinas.

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR	
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC
Isoflavone Maackiain biosynthesis	LOC_Os01g01650	yes	2,46475	yes	1,68552	yes	2,18617	no	-0,77923	no	-0,27858	no	0,50065
Isoflavone Maackiain/Medicarpin biosynt.	LOC_Os01g01660	yes	2,22962	yes	1,23847	yes	2,50434	no	-0,99116	no	0,27472	yes	1,26587
OsKS7 rice ent-kaurene synthase7	LOC_Os02g36140	no	0,61063	yes	1,83657	yes	2,05357	yes	1,22594	yes	1,44294	no	0,21700
OsCPS2	LOC_Os02g36210	no	0,34444	yes	1,93540	yes	2,63321	no	1,59097	yes	2,28877	no	0,69781
OsCPS4	LOC_Os04g09900	no	0,73976	no	0,97390	yes	1,80346	no	0,23414	yes	1,06371	no	0,82956
OsMAS Momilactone A synthase 1	LOC_Os04g09920	no	0,38628	no	0,66389	yes	1,87037	no	0,27761	no	1,48409	no	1,20647
OsMAS Momilactone A synthase	LOC_Os04g10010	no	1,11962	no	1,83186	yes	2,33691	no	0,71224	no	1,21729	no	0,50505
OsKS4 rice ent-kaurene synthase 4	LOC_Os04g10060	no	1,00031	yes	2,72129	yes	2,41892	yes	1,72097	no	1,41861	no	-0,30236
Momilactone biosynthesis Cyt P450	LOC_Os04g10160	no	0,96044	yes	1,68475	yes	2,13741	no	0,72431	no	1,17697	no	0,45266
OsKO4 rice ent-kaurene oxidase 4	LOC_Os06g37300	yes	1,74238	yes	2,37854	yes	3,17204	no	0,63616	yes	1,42966	no	0,79350

FC: fold change.

TABELA 10. Genes diferencialmente expressos (DEG) do citocromo P450.

Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR	
	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC
LOC_Os01g36294	yes	1,51726	yes	1,48641	no	0,62233	no	-0,03085	no	-0,89493	no	-0,86408
LOC_Os02g02000	yes	-1,52089	yes	-1,36349	yes	-1,57421	no	0,15739	no	-0,05332	no	-0,21072
LOC_Os02g02230	no	2,24210	yes	4,19875	yes	3,80368	no	1,95665	no	1,56158	no	-0,39506
LOC_Os02g47470	yes	-2,68880	yes	-2,22308	yes	-0,95975	no	0,46572	yes	1,72906	yes	1,26333
LOC_Os03g04660	yes	2,17713	yes	1,72261	yes	1,86172	no	-0,45452	no	-0,31540	no	0,13911
LOC_Os03g45619	yes	2,72587	yes	1,89996	yes	2,26166	no	-0,82591	no	-0,46421	no	0,36170
LOC_Os03g55800	yes	-1,75540	yes	-2,02794	yes	-1,26698	no	-0,27253	no	0,48843	no	0,76096
LOC_Os04g01140	yes	1,84209	yes	1,38433	yes	1,45835	no	-0,45776	no	-0,38374	no	0,07402
LOC_Os04g10160	no	0,96044	yes	1,68475	yes	2,13741	no	0,72431	no	1,17697	no	0,45266
LOC_Os04g47250	yes	2,51648	yes	2,36046	yes	2,48782	no	-0,15601	no	-0,02866	no	0,12735
LOC_Os05g33590	yes	-1,36132	yes	-1,11991	no	-0,86649	no	0,24142	no	0,49483	no	0,25342
LOC_Os05g43910	yes	-1,31146	yes	-1,42663	yes	-1,28671	no	-0,11517	no	0,02475	no	0,13992
LOC_Os06g46680	yes	2,73314	yes	2,51642	yes	2,65783	no	-0,21672	no	-0,07531	no	0,14142
LOC_Os07g11739	yes	1,18059	yes	1,23503	yes	1,12857	no	0,05444	no	-0,05202	no	-0,10646
LOC_Os07g11870	no	2,12856	yes	4,02038	yes	4,17219	yes	1,89183	yes	2,04364	no	0,15181
LOC_Os07g23570	yes	1,58880	yes	1,47781	yes	1,32575	no	-0,11100	no	-0,26305	no	-0,15205
LOC_Os07g44140	yes	1,24178	yes	1,20056	yes	1,28458	no	-0,04123	no	0,04280	no	0,08403
LOC_Os08g16260	yes	2,67039	yes	2,04459	yes	2,62220	no	-0,62580	no	-0,04819	no	0,57761
LOC_Os08g39730	yes	1,39358	yes	1,15768	yes	1,18658	no	-0,23591	no	-0,20701	no	0,02890
LOC_Os09g08920	no	0,98877	no	2,10067	no	1,39047	no	1,11189	no	0,40169	no	-0,71020
LOC_Os09g08990	yes	2,70243	yes	2,39998	yes	2,27117	no	-0,30245	no	-0,43126	no	-0,12881
LOC_Os09g35940	no	-1,05281	yes	-1,51425	no	-0,80987	no	-0,46144	no	0,24294	no	0,70438
LOC_Os10g16974	yes	2,03922	yes	1,61848	yes	1,83368	no	-0,42074	no	-0,20554	no	0,21520
LOC_Os10g38110	no	-0,62285	yes	-1,08679	no	-0,72991	no	-0,46394	no	-0,10706	no	0,35688
LOC_Os11g05380	yes	-3,43032	yes	-3,39073	yes	-2,36337	no	0,03959	no	1,06695	no	1,02736

LOC_Os11g18570	yes	2,21784	yes	2,24788	yes	2,28565	no	0,03005	no	0,06782	no	0,03777
LOC_Os11g27730	no	-0,62807	yes	-0,86729	no	-0,47911	no	-0,23922	no	0,14896	no	0,38818
LOC_Os11g29290	yes	-2,45499	yes	-2,83870	yes	-1,49956	no	-0,38371	no	0,95543	no	1,33913
LOC_Os11g41710	yes	-2,42315	yes	-1,93994	no	-0,88482	no	0,48321	yes	1,53833	no	1,05512

FC: fold change.

TABELA 11. Genes diferencialmente expressos (DEG) envolvidos no *crosstalk* das vias hormonais.

Anotação	Gene ID	H2O-AVR		H2O-PGPR		H2O-VIR		AVR-PGPR		AVR-VIR		PGPR-VIR	
		DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC	DEG	FC
OsNPR4	LOC_Os01g61990	yes	-2,08764	yes	-1,72222	no	-0,65187	no	0,36542	yes	1,43577	yes	1,07036
OsStr11 Sulfurtransferase 11	LOC_Os02g49680	no	-0,71391	yes	-1,12920	no	-0,55542	no	-0,41530	no	0,15849	no	0,57379
SAM dependent carboxyl methyltransferase	LOC_Os06g20960	no	2,10950	no	0,46385	yes	2,72871	no	-1,64565	no	0,61921	yes	2,26486
OsSLRL1	LOC_Os07g46920	no	-0,97783	no	-0,63341	yes	-1,46562	no	0,34442	no	-0,48779	no	-0,83221

FC: fold change.