



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

FERNANDA MACHADO CASTANHO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E POLIMORFISMO DE GENES
CANDIDATOS À EFETORES DE *Phakopsora pachyrhizi*

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2017

FERNANDA MACHADO CASTANHO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E POLIMORFISMO DE GENES
CANDIDATOS À EFETORES DE *Phakopsora pachyrhizi***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agronomia da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel como pré-requisito para a obtenção do título de Mestra em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mayra C. C. G. de Carvalho

Coorientadora: Dr^a. Francismar C. Marcelino-Guimarães

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central do Campus Luiz Meneghel da Universidade Estadual do Norte do Paraná.

Castanho, Fernanda Machado

C346c Caracterização estrutural e polimorfismo de genes candidatos à efetores de *Phakopsora pachyrhizi* / Fernanda Machado Castanho. -
- Bandeirantes, 2017.
68f. ilustr.

Orientadora: Prof. Dr^a. Mayra C. C. G. de Carvalho.
Coorientadora Dr^a Francismar C. Marcelino-Guimarães.

Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, 2017.

Banca: Dr^a. Mayra C. C. G. de Carvalho, Dr^a. Aline Vanessa Sauer, Dr^a. Valeria Yukari Abe, Dr. Sandremir de Carvalho, Dr. Leopoldo Sussumo Matsumoto.

1. Ferrugem asiática da soja. 2. SNP. 3. Seleção diversificadora.
4. Isolados. I. Universidade Estadual do Norte do Paraná. II. Título.

CDD – 633.342

FERNANDA MACHADO CASTANHO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E POLIMORFISMO DE GENES
CANDIDATOS À EFETORES DE *Phakopsora pachyrhizi***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte
do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Aprovada em: 30/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª Drª Mayra C. C. G. de Carvalho	UENP
Profª Drª Aline Vanessa Sauer	UNOPAR/UENP
Drª Valeria Yukari Abe	EMBRAPA
Prof. Dr. Sandremir de Carvalho	UENP
Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto	UENP

Profª. Drª. Mayra C. C. G. de Carvalho
Orientadora
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Mengehel

Dedico ao amigo e professor Dr. Sandremir por ter me apresentado a área de pesquisa a qual me apaixonei e pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

À minha família pela compreensão e apoio em minhas decisões;

Ao meu namorado e amigo Ruiz pelo carinho, pela paciência e por estar sempre presente me incentivando e acreditando em mim;

À Prof^a. Dr^a. Mayra pela orientação, paciência, pelos conhecimentos compartilhados e pela oportunidade de desenvolver este projeto;

À Dr^a Francismar pela coorientação, apoio e oportunidade;

Ao pessoal do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa soja, em especial à Alê e a Luana pela amizade e imensa contribuição para a realização deste trabalho;

À Mila pela amizade, incentivo e por estar sempre presente;

À capes pela bolsa concedida;

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

*“Um navio está seguro no porto,
mas ele não foi feito para isso.”
(William Shedd)*

CASTANHO, Fernanda Machado. **Caracterização estrutural e polimorfismos de genes candidatos à efetores de *Phakopsora pachyrhizi***. 2017. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2017.

RESUMO

O fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi* Syd. e P. Syd. é o agente causador da ferrugem asiática da soja (FAS), uma das principais doenças que acomete a cultura da soja (*Glycine max*). Embora já tenham sido descritos *locus* de resistência à ferrugem asiática ou *Rpp* (*Resistance to Phakopsora pachyrhizi*), ainda não existe cultivares de soja completamente resistentes à grande diversidade de raças patogênicas do fungo *P. pachyrhizi*. Durante o processo de infecção, o fungo secreta pequenas proteínas ou SSP (*Small Secreted Protein*) que podem agir como efetores de virulência (*vr*) quando o hospedeiro for suscetível ou avirulência (*Avr*) quando o hospedeiro for resistente. O processo de coevolução entre a soja e o fungo faz com que as interações *Avr-R* permaneçam sob constante pressão de seleção. Assim, constatar o nível de variação genética em genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* poderá permitir a compreensão do processo de seleção atuante, além de auxiliar na identificação dos domínios chave no reconhecimento *R-Avr*. Recentemente, 13 famílias ou tribos gênicas, enriquecidas em candidatos à efetores de *P. pachyrhizi* foram identificadas, e destas, as famílias 1, 2 e 3 foram eleitas como principais. No presente trabalho, a estrutura molecular, a variabilidade genética e a filogenia de sete genes candidatos à efetores, distribuídos nas famílias 1 e 3, foram avaliadas. Com o objetivo de observar possíveis padrões de evolução dos polimorfismos e mecanismos de seleção, três isolados do fungo (FTPY15.1M, LDA13.2M e L.PF02B07) produzidos a partir de materiais coletados em diferentes anos e regiões geográficas foram utilizados. Em geral, todos os candidatos avaliados possuem características comuns à outros efetores descritos na literatura: tamanho reduzido, presença de peptídeo sinal de secreção, motivos conservados e resíduos de cisteína. Os candidatos pertencentes à família 1 apresentaram maiores índices de polimorfismos com total de 160 SNPs e 8 substituições não sinônimas comparado com os candidatos da família 3 com 48 e 1, respectivamente. Os candidatos da família 1 também apresentaram maior diversidade filogenética, sendo o 5849 o único capaz de separar os isolados do mesmo efector em dois *clusters* e o que também demonstrou resultado significativo para seleção positiva, juntamente com o 2238, ambos com ênfase nos motivos RCR conservados encontrados, sugerindo que estes genes possam realmente atuar como efector e ainda este motivo ter um importante papel no reconhecimento pelos genes *R*.

Palavras-chave: SNP. Seleção diversificadora. Isolados. Ferrugem asiática da soja.

CASTANHO, Fernanda Machado. **Structural characterization and genetic polymorphisms of *Phakopsora pachyrhizi* effector candidate genes.** 2017. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2017.

ABSTRACT

Soybean rust (ASR) caused by the obligate biotrophic fungi *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. is the most devastating diseases affecting the culture (*Glycine max*). Although six locus for *Phakopsora pachyrhizi* resistance (Rpp) has been mapped in soybean, there are still no cultivars completely resistant to the great diversity of *P. pachyrhizi* pathogenic races. During the infection process, the fungi secretes small proteins or SSP (Small Secreted Protein) which can act as virulence effectors (vr) when the host is susceptible or avirulence effectors (Avr) when the host is resistant. The coevolution process between soybean and fungus causes the Avr-R interactions to remain under constant selection pressure. Thus, verify the level of genetic variation in candidates to effector genes into *P. pachyrhizi*, will improve our comprehension of the selection process underlying R-Avr coevolution, besides helping to identify the key domains in the R-Avr recognition. Recently, 13 families or gene tribes, enriched in candidates for *P. pachyrhizi* effectors were identified, of these, families 1 to 3 were suggested as the most important. In the present work, the molecular structure, genetic variability and phylogeny of seven effectors candidate genes distributed in families 1 and 3 were evaluated. In order to observe possible evolution patterns of the polymorphs and selection mechanisms, three fungus isolates (FTPY15.1M, LDA13.2M and L.PF02B07) produced from materials collected in different years and geographic regions were used. In general, all evaluated candidates have characteristics common to other effectors described in the literature: reduced size, presence of signal peptide secretion, conserved motifs and cysteine residues. Candidates belonging to family 1 had higher polymorphism indexes with a total of 160 SNPs and 8 non-synonymous substitutions compared to the candidates in family 3 with 48 SNPs and 1 non-synonymous substitution. Family 1 candidates also had greater phylogenetic diversity. 5849 candidate was the only one capable of separating the fungus isolates into two clusters. This candidate and the candidate 2238 showed a significant detection of positive selection, mainly on conserved RCR motifs, suggesting that these genes can probably act as effectors and that the RCR motifs can really plays a role in R-Avr recognition.

Key-words: SNP. Diversifying Selection. Isolated. Soybean rust.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 FERRUGEM DA SOJA	11
2.2 IMUNIDADE VEGETAL.....	13
2.3 GENES EFETORES	16
2.4 POLIMORFISMO GENÉTICO EM FITOPATÓGENOS.....	20
2.5 POLIMORFISMOS EM EFETORES	22
3. ARTIGO	25
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.2.1 SELEÇÃO, OBTENÇÃO E CULTIVO DOS ISOLADOS DE <i>P. pachyrhizi</i>	28
3.2.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	29
3.2.3 SELEÇÃO DOS CANDIDATOS À EFETORES	30
3.2.4 AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS	30
3.2.5 IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS CANDIDATOS À EFETORES ENTRE OS ISOLADOS	32
3.2.6 ANÁLISE ESTRUTURAL.....	34
3.2.7 DIVERSIDADE GENÉTICA	34
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.3.1 ANÁLISE ESTRUTURAL.....	35
3.3.2 POLIMORFISMOS	38
3.3.3 FILOGENIA DOS EFETORES.....	43
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
5. REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE	56

1. INTRODUÇÃO

Phakopsora é um gênero pertencente à Ordem Pucciniales vulgarmente conhecida como a ordem das ferrugens. As ferrugens são causadas por fungos biotróficos obrigatórios, ou seja, que necessitam do hospedeiro vivo para sua sobrevivência e multiplicação. Na cultura da soja, a ferrugem pode ser causada por duas espécies: *Phakopsora pachyrhizi* Syd e P. Syd e *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur, conhecidas como ferrugem asiática da soja (FAS) e ferrugem americana, respectivamente. A FAS causa maior preocupação entre as doenças que afetam as culturas de soja por se tratar de uma doença policíclica com alto poder destrutivo. No Brasil, onde as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento de epidemias, a FAS tem causado grandes impactos econômicos, com ocorrência de perdas de até 100% da produção.

Os danos causados às culturas se devem ao surgimento de novas raças do patógeno, capazes de quebrar a resistência altamente específica adquirida pelo hospedeiro. Na soja, foram descritos até o momento seis *locus* de resistência a ferrugem asiática denominados *Rpp* (Resistance to Phakopsora pachyrhizi): *Rpp1 a Rpp6*, (Hyten *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2015; Hyten *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Monteros, 2007; Meyer *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2008) e *Rpp7* (sob publicação). No entanto, não existe ainda cultivares de soja completamente resistente à ampla gama de raças do fungo. Os inúmeros relatos da ineficácia destes genes quando os genótipos são infectados com isolados do fungo de diferentes localidades ou não contendo o gene de avirulência correspondente, indicam a especificidade da resistência adquirida e a grande diversidade de raças patogênicas existentes.

Efetores são genes que codificam para proteínas com capacidade de promover virulência (quando o hospedeiro for suscetível) ou, têm sua função inibida causando a avirulência se este for resistente. Quando a planta hospedeira resiste ao patógeno, ela o faz por ser capaz de reconhecer as proteínas efetoras de avirulência (Avr) através de seus genes de resistência (R), evitando assim a instalação da doença. Espera-se que os efetores estejam sob pressão de seleção positiva, pois, no decorrer do tempo, a interação entre eles e os genes de reconhecimento correspondentes do hospedeiro leva a uma corrida evolutiva entre ambos, fazendo com que os genes efetores estejam propensos à evoluir mais rapidamente no genoma dos patógenos de forma a proporcionar o escape dos mecanismos de resistência de seus hospedeiros. Este modelo evolutivo já foi observado para efetores da ferrugem do linho (Dodds *et al.*, 2004), mas pouco se sabe ainda sobre os efetores de *Phakopsora* e nenhum efector foi funcionalmente caracterizado até o momento.

Recentemente, foram identificadas 13 famílias gênicas enriquecidas com candidatos à efetores de *P. pachyrhizi*, dentre as quais três foram sugeridas como principais: tribo 1, tribo 2 e tribo 3 (De Carvalho *et al.*, 2016). Alguns genes distribuídos nessas famílias ou tribos foram funcionalmente avaliados em sistema heterólogo, utilizando plantas de tabaco, onde se obteve forte indicativo para função efetora e destes, alguns foram selecionados para o presente estudo.

Constatar o nível de variação genética em genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* em diferentes isolados, permitirá a compreensão do processo de seleção atuante, e principalmente, auxiliará na identificação dos domínios chave no reconhecimento R-Avr. Tais resultados proporcionarão importante avanço no conhecimento da interação soja-*P. pachyrhizi* ao passo que auxiliarão no conhecimento da estrutura proteica dos efetores de *Phakopsora* e poderão ser úteis na identificação das proteínas R da soja. Além disso, uma vez identificados isolados altamente virulentos e agressivos, os mesmos poderão servir como inóculo em programas de melhoramento da resistência a FAS na soja.

Deste modo, este trabalho teve como propósito caracterizar a estrutura e a variabilidade genética de sete candidatos à efetores selecionados a partir das famílias 1 e 3 em três diferentes isolados do fungo através de análises de polimorfismos SNPs e INDELS e avaliar também a ocorrência de seleção positiva (diversificadora) ou negativa (purificadora) nestes genes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FERRUGEM DA SOJA

Os microrganismos causadores de ferrugens compreendem um grande grupo de fungos patogênicos que infectam muitas famílias de plantas (Duplessis *et al.*, 2012). Entre as aproximadamente 7.000 espécies de fungos de ferrugens, vários estão entre os patógenos mais devastadores de culturas, tornando-se uma ameaça constante para sistemas agrícolas e segurança alimentar (Pennisi, 2010).

O gênero *Phakopsora* compreende duas espécies causadoras da ferrugem da Soja, *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur, responsável pela ferrugem americana; endêmica nas Américas, e *Phakopsora pachyrhizi* Syd.e P. Syd., agente da ferrugem asiática; presente nos países asiáticos, Austrália, África e Américas (Ono *et al.*, 1992; Yorinori *et al.*, 2004).

A ferrugem asiática foi inicialmente descrita no Japão em 1902 e Austrália em 1934 e desde então se encontra em todas as áreas de cultivo de soja no mundo (Edwards e Bonde, 2011). No Brasil, a ferrugem americana foi relatada pela primeira vez em 1979, no estado de Minas Gerais (Zambolin, 2006) e a asiática em 2001 no estado do Paraná, espalhando-se por todo país, atingindo 60% de toda área de soja na safra de 2001/2002 (Yorinori, 2005). Desde a sua constatação no território brasileiro, a ferrugem asiática tem causado sérios danos à economia, com um prejuízo já estimado em US\$125,5 milhões. Na última safra (2015/2016), foi registrando 460 focos da doença, sendo os estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul com maiores incidências (Consórcio Antiferrugem, 2016).

O fungo causador da FAS, ao contrário de outros fungos, possui uma ampla gama de hospedeiros, sendo capaz de infectar mais de 30 espécies em 17 gêneros de leguminosas no campo e mais 60 espécies em outros 26 gêneros quando inoculadas artificialmente. Por outro lado, a ferrugem americana infecta mais de 40 espécies em 19 gêneros de leguminosas naturalmente, e 18 espécies em 12 gêneros quando artificialmente infectadas (Ono *et al.*, 1992; Frederick *et al.*, 2002; Goellner *et al.*, 2010). Esta amplitude de hospedeiros, incomum para a maioria das espécies de ferrugens, é provável resultado de genes que contribuem para um complexo padrão de virulência (Hartman *et al.*, 2005).

Os patógenos biotróficos obrigatórios, como os responsáveis pela ferrugem asiática, caracterizam-se por parasitismo específico onde, para completar seu ciclo de vida necessitam

do hospedeiro vivo. Seu ciclo de vida é complexo, havendo a formação de diversas estruturas. Os uredósporos são os esporos mais comumente encontrados nos campos de soja e em hospedeiros alternativos. Estes são produzidos de maneira abundante devido aos ciclos que o patógeno completa durante o período da cultura e são de fácil dispersão pelo vento (Brown e Hovmoller, 2002; Nogueira, 2007; Tremblay *et al.*, 2009). O processo de infecção (Figura 1) pode ser dividido em três fases: fase de penetração, onde o patógeno consegue penetrar no interior do hospedeiro; fase biotrófica, na qual são estabelecidas as relações parasitárias e fase reprodutiva ou de esporulação, quando o fungo se multiplica no tecido infectado (Bromfield *et al.*, 1980; Koch *et al.*, 1983).

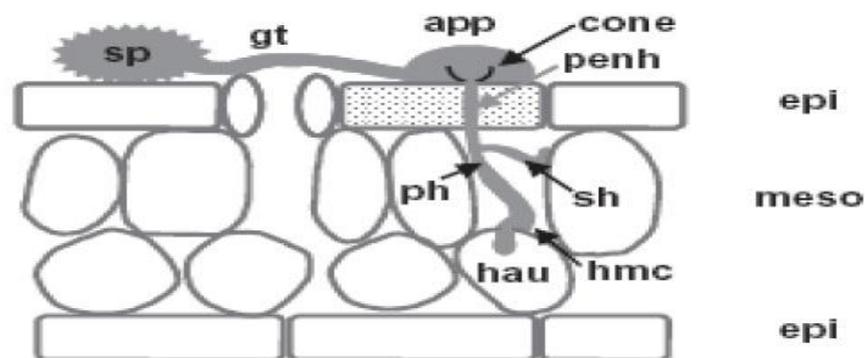


Figura 1: Estágios do desenvolvimento de *Phakopsora pachyhizi* durante a interação com a folha do hospedeiro (Adaptado de Goellner *et al.*, 2010)

A primeira fase se inicia com a germinação dos uredósporos (sp). Em temperaturas ideais que podem variar de 15°C a 28°C e ambiente úmido há a formação do tubo germinativo (gt). O tubo germinativo possui em sua extremidade o apressório (app) que é uma estrutura globosa da qual emerge o cone apressorial (cone) responsável por originar a hifa de penetração (penh), esta, por sua vez, é encarregada pela penetração na célula epidérmica (epi) da planta. Após atravessar os espaços intercelulares, ela se separa em hifa primária (ph), ou hifa de infecção, que se ramifica em várias hifas secundárias (sh). Em contato com as células do mesófilo (meso), a célula mãe do haustório (hmc) é então formada e, ao atingir o espaço intracelular, se diferencia no haustório (hau) (Goellner *et al.*, 2010). Por meio da formação de hifas secundárias, outros haustórios seguem colonizando o mesófilo esponjoso (Koch *et al.*, 1983). Os haustórios constituem o principal sítio de absorção de nutrientes a partir do hospedeiro, sendo determinantes no estabelecimento e manutenção da fase biotrófica, realizando também trocas de informações entre hospedeiro e patógeno (Vieira *et al.*, 2012). Assim, substâncias produzidas pelo haustório devem atravessar a membrana plasmática deste, a matriz extra-haustorial e a membrana plasmática do hospedeiro, para ter acesso ao citoplasma

vegetal. Entre seis e oito dias pós-inoculação (dpi) é possível observar as urédias e seu desenvolvimento pode se estender por até quatro semanas. Após nove a dez dpi novos uredósporos são produzidos e podem ser observados por até três semanas (Marchetti *et al.*, 1975; Zambolim, 2006).

2.2 IMUNIDADE VEGETAL

As plantas possuem o sistema imunológico constituído por duas linhas de defesa, sendo a primeira linha PTI (PTI – “*PAMP-Triggered Immunity*”) ativada por PAMPs (Padrões moleculares associados à patógenos) e a segunda ETI (ETI – *Effector-Triggered Immunity*) desencadeada por efetores.

A PTI baseia-se em interações onde PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) (Shiu e Bleecker, 2001; Altenbach e Robatzek, 2007) presentes na superfície do hospedeiro, na matriz extracelular da planta ou na membrana plasmática (Boller e Felix, 2009) reconhecem os PAMPs, evitando a posterior colonização do hospedeiro. Trata-se de uma defesa basal, conhecida como imunidade desencadeada por PAMPs ou PTI (Nurnberger *et al.*, 2004; Jones e Dangl, 2006; De Wit, 2007).

Os PAMPs são epítomos microbianos e podem ser definidos como moléculas conservadas através de agentes microbianos, considerados essenciais na aptidão de sobrevivência dos patógenos (Medzhitov e Janeway, 1997). Entre eles estão as quitinas fúngicas, lipopolissacarídeos, flagelinas bacterianas, fator de alongação bacteriano Tu, peptidoglicano, β -glucanases e ergosterol. Como os microrganismos não-patogênicos também podem possuir essas moléculas, utiliza-se para estes o termo MAMPs (Padrões Moleculares Associados à Microorganismos (Boller e Felix, 2009).

Durante o processo de infecção, os fitopatógenos secretam um arsenal de proteínas efetoras, que são translocadas para a célula vegetal com função de bloquear a primeira linha de defesa da planta (PTI), causando assim o desenvolvimento da doença (Stergiopoulos e De Wit, 2009), resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (Gohre e Robatzek, 2008). É justamente nesse modelo que apoiam-se as técnicas de avaliação funcional de efetores em sistema heterólogo (Sohn *et al.* 2007). Nas plantas resistentes, a segunda linha de defesa da planta (ETI) é então ativada através da interação direta ou indireta com as proteínas NB-LRR,

que possuem domínio de ligação a nucleotídeos (NB “nucleotide binding”) e repetições de leucina (LRR “leucine rich repeat”), que reconhecem esses efetores (Jones e Dangl, 2006). Ao contrário da PTI, que ocorre em todos os membros de uma determinada espécie de planta, a ETI acontece a nível intraespecífico, onde para cada gene efetor do patógeno, há uma proteína de reconhecimento na planta. O efetor reconhecido é denominado de proteína de avirulência (Avr) e o gene de resistência cognato de gene *R*.

Foi demonstrado no início do século 20 que a imunidade da planta, assim como a capacidade do patógeno de causar doenças, são controladas por pares de genes correspondentes. O fator genético da planta foi então predito como gene de resistência (*R*), enquanto que o fator genético do agente patogênico foi referido como gene de avirulência (*Avr*). A resistência gene-a-gene seria conferida por uma interação direta entre o gene *R* e proteínas *Avr* (Flor, 1942). No entanto, experimentos projetados para mostrar tais interações diretas receptor/ligante frequentemente geraram resultados negativos o que levou a formulação da hipótese guarda, onde o reconhecimento ocorre indiretamente por meio da interação entre efetor e uma segunda proteína denominada *guardie* (Stergiopoulos e De Wit, 2009). Essa interação é percebida quimicamente pela proteína guarda, ativando a resistência do hospedeiro (Głowacki *et al.*, 2011). Assim, de acordo com a hipótese guarda, as proteínas *R* vão atuar monitorando a presença de proteínas efetoras ou de modificações de proteínas alvo no hospedeiro pelos efetores do patógeno.

De forma simplificada, o sistema imunológico da planta pode ser representado pelo modelo “zigue-zague” (Jones e Dangl, 2006) (Figura 2). Na fase 1, os PAMPs (ou MAMPs) são reconhecidos pelos PRRs, resultando na imunidade desencadeada pelos PAMPs (PTI) que pode parar a colonização adicional. Na fase 2, os patógenos bem sucedidos secretam efetores que contribuem para a virulência do patógeno. Os efetores podem interferir na PTI, resultando em suscetibilidade desencadeada pelo efetor (ETS). Na fase 3, um determinado efetor é “especificamente reconhecido” por uma das proteínas NB-LRR, resultando em imunidade provocada por efetores (ETI). O reconhecimento é indireto ou direto através da interação de um efetor. A ETI vai resultar na resistência à doença e, geralmente, uma resposta de hipersensibilidade (HR) com morte celular programada no local da infecção. Na fase 4, fatores de virulência do patógeno podem suprimir a ETI, ou pela diversificação do gene efetor reconhecido, ou pela aquisição de efetores adicionais. A seleção natural resulta em novas especificidades para os genes *R* da planta para que a ETI possa ser acionada novamente.

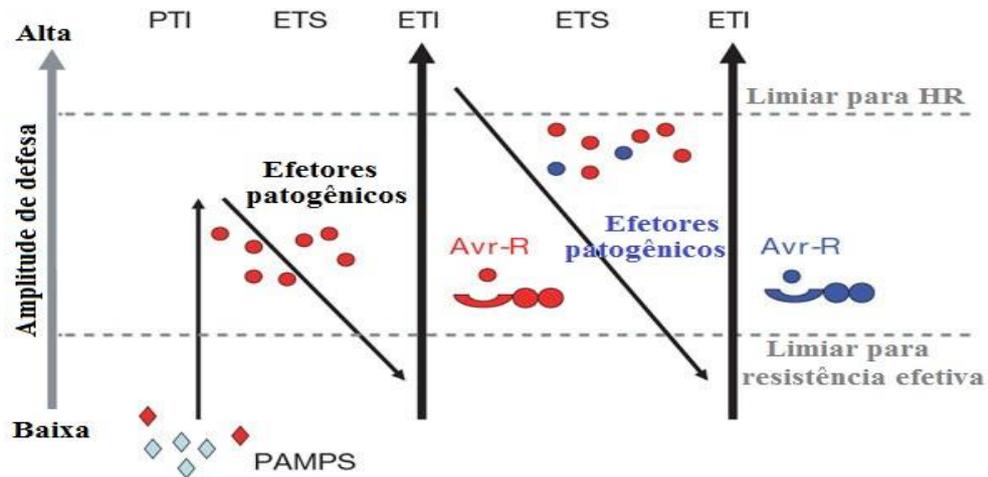


Figura 2: Modelo “zigue-zague” com as etapas do desenvolvimento do sistema imunológico da planta durante a infecção. A amplitude final da resistência ou suscetibilidade é proporcional à [PTI-ETS+ETI]. Na primeira fase, os PAMPs (representados por losangos vermelhos) são reconhecidos pela planta e desencadeia a PTI. Na segunda fase, o patógeno consegue secretar efetores capazes de não serem reconhecidos pela planta (bolinhas vermelhas), desencadeando a suscetibilidade por efetores a ETS. Na terceira fase, um efector é reconhecido (Avr-R), ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), a qual é uma versão ampliada da PTI, que muitas vezes induz a resposta de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase, novos efetores do patógeno surgem através do fluxo horizontal de genes (bolinhas azuis), resultando na supressão da ETI. A seleção de novos alelos pelas plantas, podem reconhecer um dos efetores recém-adquiridos, disparando novamente a ETI (Jones e Dangl, 2006).

Com o tempo, essas interações se tornam uma verdadeira corrida armamentista entre hospedeiro e patógeno (De Wit, 2007). É esperado, portanto, observar que a evolução ocorra mais rapidamente entre os genes efetores quando comparado ao genoma total dos patógenos. Além disso, espera-se também que essa evolução ocorra nas regiões codificantes do gene, principalmente naquelas relacionadas ao escape/reconhecimento pelo hospedeiro, caracterizando a seleção positiva (Pedersen *et al.*, 2012). A evolução das proteínas efetoras quando comparada à das proteínas de resistência é também maior uma vez que o ciclo de vida do fungo é muitas vezes mais rápido que o da soja e é repetido várias vezes na mesma planta. Pedersen *et al.* (2012) sugeriram ainda que a organização genômica dos efetores de *Blumeria graminis* tenha tido papel crucial na diversificação dos mesmos ao longo da evolução. Em *B. graminis* os efetores concentram-se nos mesmos cromossomos e aparecem dentro de regiões altamente repetitivas e flanqueados por elementos retro-transponíveis. Tais características possivelmente tenham favorecido eventos de duplicação e diversificação, conforme sugerido pelos autores. Para o *P. pachyrhizi* tais análises ainda dependem da finalização do sequenciamento genômico, mas já se sabe que o genoma deste fungo apresenta muitas regiões altamente repetitivas (Loehrer, *et al.*, 2014).

A identificação e caracterização de genes efetores e seus genes cognatos R é importante para a compreensão do patossistema a nível modular e consequente desenvolvimento de estratégias de melhoramento convencional e/ou associado à estratégias biotecnológicas para resistência sustentável. Ainda, compreender as interações Avr-receptor é útil para a engenharia genética na tentativa de aprimorar os receptores do hospedeiro para o reconhecimento de efetores comuns em populações (Harris *et al.*, 2013; Segretin *et al.*, 2014.), o que pode também ser útil para o desenvolvimento de uma resistência de amplo espectro e mais duradoura (Dangl *et al.*, 2013).

2.3 GENES EFETORES

Genes efetores são genes que codificam proteínas capazes de alterar a estrutura e função das células do hospedeiro, permitindo a infecção e colonização, e consequentemente desempenhando um papel essencial para a sobrevivência de agentes patogênicos (Kamoun, 2009). Essas proteínas estabelecem condições que permitem aos organismos patogênicos crescerem e se reproduzirem em seus hospedeiros quando atuam como fatores de virulência (vr). Quando o hospedeiro desenvolve a habilidade de reconhecê-los, tais efetores passam a ser denominados de fatores de avirulência (Avr) os quais são reconhecidos pelas proteínas R correspondentes do hospedeiro, ativando as respostas de defesa e impedindo o crescimento do invasor (Dangl *et al.*, 2013).

Os efetores de fungos partilham várias características que são exclusivas, de forma que a maioria deles possuem um sinal de secreção na região N-terminal, são enriquecidos em resíduos de cisteína, demonstram ausência de similaridade nas bases de dados e tamanhos pequenos. Estas características têm sido amplamente utilizadas para determinar conjuntos de efetores candidatos no proteoma, genoma ou transcriptoma conhecido de fungos patogênicos (Lowe e Howlett, 2012; Duplessis *et al.*, 2014; De Carvalho *et al.*, 2016).

Para identificar candidatos a efetores, a genômica tem se tornado uma escolha, principalmente para os fungos biotróficos obrigatórios, onde abordagens funcionais são dificultadas e, até o momento apenas alguns genomas de fungos causadores de ferrugens estão disponíveis (Duplessis, *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Cantu *et al.*, 2013; Nemri *et al.*, 2014).

Estratégias clássicas para a identificação de efetores de fungos incluem clonagens baseadas em mapas genéticos, análise de secretomas fúngicos durante a infecção, a identificação de genes de organismos patogênicos que induzem resposta de hipersensibilidade, mutagênese e análises de sequências expressas (ESTs) (Stergiopoulos e De Wit, 2009). Uma outra abordagem possível é a análise completa do genoma e/ou transcrito de destes fungos associada ao uso de ferramentas de bioinformática para promover o reconhecimento das proteínas secretadas, suas características moleculares e organização genômica (Dodds *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2012; Duplessis, 2014; De Carvalho *et al.*, 2016).

Durante o processo de infecção, na fase onde são estabelecidas as relações patógeno-hospedeiro, os efetores são translocados através do haustório para dentro das células hospedeiras, onde se acumulam no núcleo ou citoplasma (Figura 3). No entanto, ainda é desconhecido como ocorre o translocamento dos efetores e qual sua função em células hospedeiras que possuem proteínas de reconhecimento (Petre *et al.*, 2014).

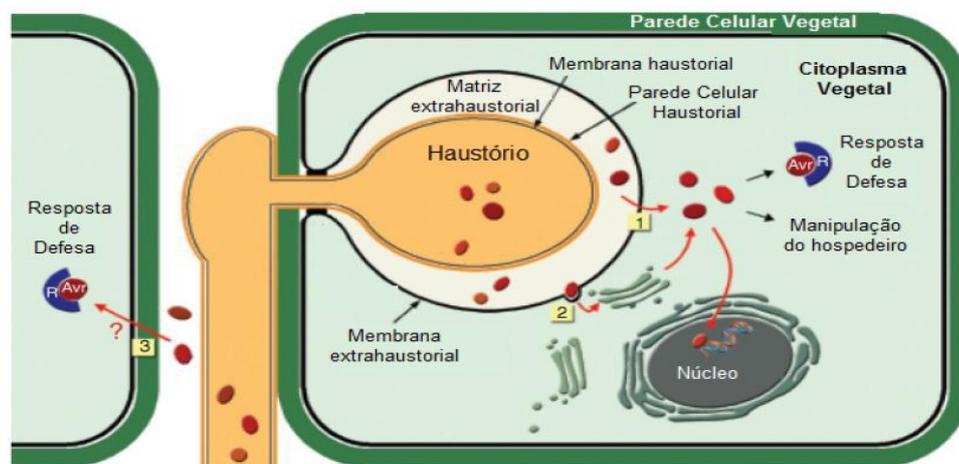


Figura 3: Interface haustório-hospedeiro. Esquema de um haustório dentro de uma célula hospedeira mostrando a membrana extra-haustorial e a matriz extra-haustorial. Proteínas efetoras são secretadas a partir do haustório para a matriz extra-haustorial. Um subconjunto de proteínas é transportado para dentro da célula hospedeira, atravessando diretamente a membrana extra-haustorial (1) ou através de vesículas do sistema de endomembranas do hospedeiro (2). Uma vez dentro do citoplasma do hospedeiro, os efetores podem alterar o metabolismo da planta e suas vias de defesa. As proteínas efetoras que são reconhecidas pelas proteínas de resistência (R) são proteínas de avirulência (Avr). Este reconhecimento desencadeia as respostas de defesa. Outros efetores podem ser direcionados para organelas do hospedeiro, como o núcleo, onde podem alterar a transcrição. Os efetores secretados a partir das hifas podem também entrar nas células do hospedeiro através de um mecanismo ainda

desconhecido (3) e, quando reconhecidos por uma proteína de resistência, podem também desencadear respostas de defesa (Adaptado de Catanzariti *et al.*, 2007).

Embora a ordem das ferrugens, Pucciniales, seja intensamente estudada (Dean *et al.*, 2005), o seu estilo de vida biotrófico obrigatório, juntamente com o fato de não infectarem espécies modelo de plantas, têm se tornado um obstáculo para investigações mais profundas de seus mecanismos biológicos e patogênicos. Como consequência, apenas algumas proteínas efetoras foram validadas até o momento (Petre *et al.*, 2014). As características genômicas relacionadas ao estilo de vida biotrófico obrigatório incluem famílias gênicas específicas, muitas multigênicas, além de um grande repertório de pequenas proteínas efetoras secretadas (Duplessis *et al.*, 2011). Por outro lado, o rápido aumento no número de genomas sequenciados de fungos e oomicetos oferecem a oportunidade para prever por completo um conjunto de proteínas secretadas, ou secretomas. As proteínas secretadas na planta, que são expressas em uma frequência maior durante a infecção, são geralmente candidatos a efetores e há um grande esforço para definir seus papéis na virulência (Ellis *et al.*, 2009).

Em *Phakopsora*, a escassez de informação sobre seu genoma dificulta a compreensão das interações desse patógeno com seu hospedeiro. Até o momento, a maioria dos efetores descritos em ferruges correspondem a fatores de avirulência como AvrL567, AvrP4, AvrP123, e AvrM do fungo da ferrugem do linho *Melampsora lini* (Ravensdale *et al.*, 2011), os quais têm sido extensivamente estudados à nível funcional (Dodds e Rathjen 2010; Duplessis *et al.*, 2011). Outros como o gene PGTAUSPE-10-1, candidato AvrSr22 da ferrugem da haste do trigo causada por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Upadhyaya *et al.*, 2014), permanecem ainda sem conhecimento de seu papel na patogênese, e em *Uromyces fabae*, agente causador da ferrugem do feijão, foi identificada uma proteína efetora, RTP1 (Kemen *et al.*, 2005). Todas essas são proteínas expressas no haustório e sem função bioquímica claramente identificada. Ainda é desconhecido como elas promovem o crescimento do fungo no tecido hospedeiro mas suas propriedades de avirulência (Avr) são melhores compreendidas.

Em folhas de café infectadas com *Hemileia vastatrix*, causadora de ferrugem, foram relatados 454 sequências transcritas. A análise das sequências expressas (ESTs) *in planta* revelou que a maioria (60%) não tinha homologia em bases de dados públicos do genoma, representando potenciais genes específicos de *H. vastatrix*, e que na fase de formação dos uredósporos são expressos genes que codificam proteínas com característica de efetores (Fernandez *et al.*, 2012).

A análise do genoma de *Melampsora larici-populina* revelou um catálogo de 1.184 proteínas pequenas secretadas com menos de 300 aminoácidos e sem domínios transmembrana (Duplessis *et al.*, 2011). Entre essas proteínas, alguns candidatos à efetores tem sido identificados como linhagem-específico, que são expressos durante a fase biotrófica da colonização da folha e com sinais de seleção positiva. (Hacquard *et al.*, 2011; Hacquard *et al.*, 2012; Saunders *et al.*, 2012).

A sequência completa do genoma de *Ustilago maydis*, agente etiológico do carvão do milho, que também é um fungo biotrófico, revelou presença de 12 conjuntos de genes que codificam proteínas secretadas, compreendendo cerca de 20% das proteínas que são em parte co-reguladas e estão envolvidas na patogenicidade, de uma forma semelhante a ilhas de patogenicidade bacterianas. O fato de que a deleção desses blocos gênicos afeta a virulência em cinco casos corrobora a importância das proteínas extracelulares e indica que o foco sobre as proteínas secretadas garante ser um instrumento para o entendimento das estratégias de infecção de fungos fitopatogênicos (Kamper, *et al.*, 2006).

O sequenciamento do genoma e análise de transcriptoma das ferrugens *Melampsora laricis-populina* e *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* possibilitaram a identificação de famílias gênicas expandidas e exclusivas em cada genoma, e posteriormente a identificação de genes expressos durante a infecção bem como das SSP, ou pequenas proteínas secretadas, as quais funcionam potencialmente como proteínas de virulência e avirulência (Duplessis, 2011). Estes estudos foram importantes para elucidar o avanço do conhecimento sobre as características moleculares gerais de genomas de ferrugens e da biologia dos seus estilos de vida biotróficos.

Genes efetores do oídio do trigo foram identificados e clonados (Bourras *et al.*, 2015), assim como genes *Avr* do oídio de cevada de um grande conjunto de isolados provenientes de locais muito dispersos (Lu *et al.*, 2016). Em ambos os casos, tentativas bem sucedidas foram feitas para validar experimentalmente a identidade funcional dos genes candidatos. A expressão dos genes do oídio do trigo induziu uma clara necrose em *Nicotiana benthamiana* quando co-expressa com os genes correspondentes de resistência. Inversamente, as proteínas *Avr* do oídio da cevada determinaram respostas específicas quando expressas em genótipos de cevada portadoras dos genes *R* correspondentes. Em conjunto, estas experiências não só corroboram funcionalmente a identificação de genes, mas também demonstram uma conservação significativa das vias de sinalização fundamentais que sustentam as respostas imunes em plantas.

Em oomicetos existem duas grandes classes de efetores citoplasmáticos, sendo as mais estudadas as que apresentam o motivo RxLR, conservado na região N-terminal. Ao contrário dos motivos RxLR de oomicetos, ainda não foram encontrados motivos ubíquos em ferrugens (Petre e Kamoun, 2014; Sperschneider *et al.*, 2015).

O transcriptoma e secretoma haustorial de *P. pachyrhizi* foi recentemente disponibilizado por Link *et al.*, (2014) e algumas sequências expressas (ESTs) de esporos germinados, apressório e urédias foram geradas (Posada-Buitrago *et al.*, 2005; Tremblay *et al.*, 2009; Stone *et al.*, 2010). Recentemente, De Carvalho *et al.* (2016), realizaram uma análise do transcriptoma *in planta* da interação entre soja e *P. pachyrhizi*, em busca de candidatos a efetores. De 36,350 mil ESTs preditas do fungo, foi possível a identificação de 851 proteínas potencialmente secretadas, que foram distribuídas em famílias de genes com características comuns de efetores. Após comparação destas proteínas secretadas preditas com as demais previamente descritas em espécies de Pucciniales, foi possível a identificação de 33 famílias específicas de *P. pachyrhizi*. A partir das famílias definidas, os autores selecionaram 13 famílias que possuam características consistentes com função de efetor, sendo destacadas as famílias 1, 2 e 3. Membros destas famílias foram avaliados funcionalmente pela expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*, onde foi possível constatar que tais proteínas atuavam como possíveis efetores uma vez que manifestavam a habilidade de suprimir a resposta de defesa basal nesta espécie (De Carvalho *et al.*, 2016).

2.4 POLIMORFISMO GENÉTICO EM FITOPATÓGENOS

Em fungos fitopatogênicos a variabilidade genética ocorre por vários mecanismos, incluindo recombinação sexual, migração, mutação e hibridação somática (McDonald *et al.*, 1989; Burdon e Silk 1997). Em ferrugens, a anastomose de hifas foi relatada em *Puccinia graminis* (Manners e Bampton, 1957), *Puccinia recondita* (Barr *et al.*, 1964), *Puccinia striiformis* (Little e Manners, 1969), e adicionalmente caracterizada em *P. triticina* (Wang e McCallum, 2009). Este fenômeno pode ocorrer em *P. pachyrhizi* durante a reprodução assexuada (Bromfield, 1984; Vittal *et al.*, 2012).

Estudos da diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus*, causador da ferrugem do feijoeiro, revelaram a existência de dois grupos distintos de isolados

correspondentes aos grupos de virulência, sugerindo uma co-evolução patógeno-hospedeiro (Pastor-Corrales, 2006).

A diversidade genética em isolados de *Puccinia hordei*, agente causal da ferrugem da cevada, foi observada com diferentes padrões de virulência e origem geográfica. Mesmo apresentando um baixo nível de diversidade, foi possível a discriminação entre esses isolados (Sun *et al.*, 2007).

Os estudos de variabilidade genética em populações de *P. pachyrhizi* têm sido apresentados ao longo dos anos em vários trabalhos e vem sugerindo que este fungo possua múltiplos genes de avirulência (Freire, 2008). Duas populações do Brasil (BRP-1 e BRP-2) foram comparadas com uma população do Japão (JRP) em 13 genótipos de soja. As populações do Brasil causaram mais reações de virulência nas variedades testadas do que a do Japão, indicando que as populações brasileiras podem apresentar uma alta e variada virulência em relação à população do Japão (Yamanaka *et al.*, 2010).

A diversidade genética e a distribuição geográfica de 59 isolados de *P. pachyrhizi* coletados nos Estados Unidos foram determinadas pela análise das sequências das regiões internas transcritas ITS1 e ITS2 e do gene do Fator de Ribosilação do ADP (ARF). Dentre as regiões analisadas, foram observados 29 sítios polimórficos gerados a partir de 17 polimorfismos de uma única base (SNPs) e 11 inserções/deleções (INDELS). Como reflexo da diversidade das sequências ITS (*Internal Transcribed Spacer*), os isolados se alocaram em cinco grupos diferentes sugerindo a presença de pelo menos cinco genótipos de isolados de *P. pachyrhizi* dentro dos EUA e muitos estados apresentam uma mistura de isolados (Zhang *et al.*, 2012).

Após amplificação de regiões ITS em isolados monouredinais de *P. pachyrhizi* coletados em quatro regiões do Brasil, foi observado uma alta variabilidade do patógeno. A análise da distribuição geográfica destes revelou também que cada localidade apresentava uma mistura de isolados de *P. pachyrhizi*. Ainda, na análise fenotípica, foi revelada a presença de pelo menos seis patótipos distintos presentes nos campos de soja do Brasil até aquela data. Como reflexo dos resultados, pôde ser observado que os isolados do patógeno encontrados no Brasil podem ter sido originados de múltiplos e independentes eventos de dispersão. (Darben, 2013).

Em *P. pachyrhizi* os possíveis mecanismos que podem ocasionar variabilidade são hibridação somática e a migração (Twizeyimana *et al.*, 2011). A hibridação somática envolve uma série de eventos como a anastomose de hifas de homocários de diferentes genótipos, resultando em um micélio heterocariótico, que pode ser seguida por heterocariose, fusão nuclear, recombinação mitótica (“crossing-over” mitótico) ocasionais durante a multiplicação dos núcleos diploides, e o rearranjo de cromossomos, dos quais culminam com ciclo parassexual (Pontecorvo, 1953). A anastomose de tubos germinativos e hifas, além da migração nuclear também foram descritos em *P. pachyrhizi* (Vittal *et al.* 2012), sugerindo que o ciclo parassexual poderia também explicar a diversidade genética encontrada entre as populações do fungo.

2.5 POLIMORFISMOS EM EFETORES

Desde a descoberta do primeiro efector de ferrugem, AvrL567 de *M. lini* (Dodds *et al.*, 2004), sugere-se que existe uma forte seleção positiva diversificadora, promovendo elevados níveis de polimorfismo entre genes *Avr* levando à formação de linhagens expandidas e/ou famílias de genes específicas observadas nos genomas de ferrugem (Duplessis *et al.*, 2011). Alguns autores também relataram que esses genes tendem a apresentar elevado índice de substituições não sinônimas, resultando em alta variabilidade genética devido à pressão de seleção positiva (Cantu *et al.*, 2013; Pedersen *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2012, Sperschneider *et al.*, 2014).

Diversos estudos em oomicetos relataram a ocorrência de polimorfismos nos genes de avirulência, os quais são reconhecidos por genes de resistência do hospedeiro. O oomiceto *Phytophthora infestans* é um dos patógenos que mais causa prejuízos às produções de batata. Múltiplos alinhamentos de proteínas preditas (AVR3a e avr3a) derivadas de alelos virulentos (avr3a) e avirulentos (AVR3a) em 55 isolados de *P. infestans* da Europa e América (Norte e Sul), resultaram na identificação de três SNPs capazes de alterar a sequência de aminoácidos na proteína expressa e conseqüentemente ocasionaram o não reconhecimento pelo gene R cognato, levando ao fenótipo de suscetibilidade. Desses SNPs apenas dois alelos mostraram 100% de correlação com os fenótipos de virulência em genes R3a, gerando substituições não sinônimas de aminoácidos, sugerindo que a seleção positiva atuou sobre este gene (Armstrong *et al.*, 2005).

Ao analisar a interação patógeno-hospedeiro entre oito isolados de *Hyaloperonospora parasitica* que infectam *Arabidopsis thaliana*, cinco apresentaram diferenças entre si, com seis diferentes alelos que codificaram proteínas com altos níveis de polimorfismo a nível de aminoácido. Interessantemente, isolados avirulentos continham sequências de DNA idênticas, enquanto os isolados virulentos apresentaram sequências de DNA altamente divergentes dentro das ORFs dos genes efetores (Rehmany *et al.*, 2005).

Em *P. infestans* foi encontrada evidência de seleção diversificadora na região da proteína madura do gene *scr74* (Liu *et al.*, 2005). A seleção positiva também foi detectada em efetores parálogos de RXLR, atuando nas regiões C-terminais das proteínas (Win *et al.*, 2007) e os genes AvrL567, AvrP123 e AvrP4 de *Melampsora lini* também demonstraram evidências consistente de seleção positiva e altos índices de polimorfismos (Barrett *et al.*, 2009).

A transferência genética horizontal tem se mostrado um importante mecanismo pelo qual ocorrem os polimorfismos em efetores de fungos patogênicos. Em um estudo com *Magnaporthe oryzae* e espécies relacionadas, revelou-se que o efector Avr-Pita foi translocado várias vezes via elementos transponíveis. Os autores sugeriram que translocações múltiplas envolvem deleções e recuperações mediadas via transferência parasexual entre isolados de espécies semelhantes (Chuma *et al.*, 2011). Também foi descoberto que genes de virulência de *Fusarium spp.* ficam alojados em cromossomos específicos, os quais podem ser transferidos assexualmente para linhagens avirulentas tornando-as virulentas (Schmidt *et al.*, 2013). Isolados patogênicos de *Fusarium oxysporum*, possivelmente adquiriram a capacidade patogênica pela aquisição horizontal de regiões linhagem-específica (LS), que são ricas em transposons e genes com perfis evolutivos distintos, mas relacionados com a patogenicidade e virulência (Ma *et al.*, 2010).

Foram identificados quatro alelos diferentes e uma mutação de deleção completa do gene Avr1b-1, responsável pela eficácia do gene de resistência Rps1b em soja, em 34 isolados de *Phytophthora sojae* oriundos da China. A análise molecular de Avr1b-1 revelou que uma sequência de DNA de 8 kb contendo Avr1b-1 foi eliminada e uma sequência de DNA de 12,7 kb foi inserida no mesmo *locus*. O gene “saltitante” foi encontrado e cinco elementos transponíveis foram preditos na sequência inserida, sugerindo que a deleção de Avr1b-1 pode ser atribuída ao movimento dos transposons (Cui *et al.*, 2012).

Nos fungos necrotróficos do trigo *Pyrenophora tritici-repentis* e *Parastagonospora nodoru* foram encontrados dois códons do efector ToxA sob seleção diversificadora

(Stukenbrock e McDonald, 2007). Da mesma forma, prevê-se que quatro códons estejam sob seleção diversificada no efetor necrotrófico Tox1, produzido por *Parastagonospora nodorum* (Liu *et al.*, 2012).

Seis genes que codificam enzimas degradantes da parede celular em *Zymoseptoria tritici* também se mostraram estar sob uma seleção positiva, quer na adaptação do hospedeiro quer nos processos de evasão do hospedeiro (Brunner *et al.*, 2013).

Em populações do ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, analisou-se a variação alélica dentro de quatro genes efetores (MfAvr4, MfEcp2, MfEcp2-2 e MfEcp2-3) e verificou-se o impacto sobre o reconhecimento por genes de resistência Cf-4 e Cf-ECP2 de tomate. Os autores reportaram elevado número de polimorfismos que pode refletir na co-evolução entre o hospedeiro e o patógeno, sugerindo que tanto a seleção positiva quanto a recombinação intragênica moldaram a evolução de efetores de *M. fijiensis* (Stergiopoulos *et al.*, 2014).

Para a ferrugem do milho, causada pelo fungo *Puccinia striiformis* f. sp. tritici (PST), de 2.999 proteínas secretadas, foram identificados cinco candidatos efetores que exibiram substituições não sinônimas especificamente entre os dois isolados UK PST-87/7 e PST-21/08, os quais diferiram na virulência em duas variedades de trigo (Cantu *et al.*, 2013).

Os vários exemplos dos polimorfismos nos genes são importantes para a compreensão de como a seleção influencia evolutivamente alterações específicas, estes que conduzem para a diversificação de efetores promotores da virulência (Selin *et al.*, 2016).

3. ARTIGO

Caracterização e polimorfismos de genes candidatos à efetores de *Phakopsora pachyrhizi*

RESUMO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das doenças mais devastadoras de soja na América. Sabe-se que durante a interação, o fungo secreta pequenas proteínas ou SSPs (*Secreted Small Proteins*), as quais podem agir como efetores de virulência (vr) ou avirulência (Avr). Recentemente, foram identificadas 13 famílias gênicas enriquecidas com candidatos à efetores de *P.pachyrhizi*, dentre as quais três foram sugeridas como principais e alguns genes distribuídos nessas famílias foram funcionalmente avaliados em sistema heterólogo, onde se obteve indicativo para função efetora. Contudo, não se sabe ainda sobre a evolução desses genes em diferentes genótipos de ferrugem. Dessa forma, foram analisados sete candidatos à efetores em isolados obtidos de diferentes anos e regiões. Através do sequenciamento desses genes, foram realizadas análises estruturais, análises para detecção de polimorfismos SNPs e INDELS, além de prever através de um software a seleção atuante sobre eles. Os resultados permitiram detectar a presença de estruturas conservadas entre os genes e a ocorrência de resíduos de cisteína ao longo dos exons. A análise filogenética demonstrou elevada diversidade entre os isolados do fungo, especialmente para os candidatos da família 1 que também apresentaram elevados índices de polimorfismos. A comparação entre os níveis de substituição sinônimas e não sinônimas, revelaram que a região C-terminal dos candidatos à efetores 2238 e 5849 se encontram sobre seleção diversificadora. Por outro lado, as regiões N-terminal, assim como os demais candidatos apresentaram seleção purificadora.

Palavras-chave: Ferrugem asiática da soja, efetores, interação patógeno-hospedeiro.

Characterization and polymorphisms of *Phakopsora pachyrhizi* effector candidate genes

ABSTRACT

Asian soybean rust, caused by the obligatory biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi*, is one of the most devastating soybean diseases in America. It is known that during the interaction, the fungus secretes small proteins or SSPs (Secreted Small Proteins), which can act as effectors of virulence (vr) or avirulence (Avr). Recently, 13 gene families enriched with *P.pachyrhizi* effector candidates have been identified, among which three were suggested as main and some genes distributed in these families were functionally evaluated in a heterologous system, where indicative for effector function was obtained. However, it is not yet known about the evolution of these genes in different genotypes of rust. Thus, seven candidates for effectors in isolates obtained from different years and regions were analyzed. Through the sequencing of these genes, structural analyzes, analyzes for the detection of polymorphisms, SNPs and INDELS were performed, besides predicting through a software the selection acting on them. The results allowed to detect the presence of conserved structures between the genes and the occurrence of cysteine residues along the exons. Phylogenetic analysis showed high diversity among the isolates of the fungus, especially for the candidates of the family 1 that also presented high indexes of polymorphisms. Comparison between the synonymous and non-synonymous substitution levels revealed that the C-terminal region of the 2238 and 5849 effector candidates are on diversification selection. On the other hand, the N-terminal regions, as well as the other candidates presented purifying selection.

Keywords: Soybean rust, effector, Plantt-pathogen interaction.

3.1 INTRODUÇÃO

Phakopsora pachyrhizi é um fungo biotrófico obrigatório responsável pela ferrugem asiática da soja (FAS). Entre as aproximadamente 7.000 espécies de fungos de ferrugens, vários estão entre os patógenos mais devastadores de culturas, tornando-se uma ameaça constante para sistemas agrícolas e segurança alimentar (Pennisi, 2010). Desde a sua detecção no território brasileiro, a ferrugem asiática tem causado sérios danos à economia, com um prejuízo já estimado em US\$125,5 milhões. Na última safra (2015/2016), foram registrados 460 focos da doença, sendo os estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul com maiores incidências (Consórcio Antiferrugem, 2016). Isto se deve à sua ampla gama de hospedeiros e elevada diversidade genética que contribuem para um complexo padrão de virulência (Hartman *et al.*, 2005).

O sucesso da infecção destes organismos se dá pela secreção de proteínas efetoras no citoplasma de seus hospedeiros, as quais podem suplantam os mecanismos de defesa da planta. Estas proteínas podem atuar como fatores de virulência (vr) quando não reconhecidas pelo hospedeiro ou avirulência (Avr) quando o hospedeiro possui genes R correspondentes capazes de reconhecê-las, ativando assim a imunidade desencadeada por efetores (ETI) (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones e Dangl, 2006).

Os efetores de fungos partilham várias características que têm sido amplamente utilizadas para identificar conjuntos de candidatos à efetores no proteoma, genoma ou transcriptoma dos fungos patogênicos. A maior parte têm um sinal de secreção N-terminal, são enriquecidos em resíduos de cisteína, demonstram ausência de similaridade nas bases de dados de proteínas comuns e possuem tamanhos pequenos. (Lowe e Howlett, 2012; Duplessis *et al.*, 2014; De Carvalho *et al.*, 2016). Em *Phakopsora*, a escassez de informações sobre seu genoma dificulta a compreensão das interações desse patógeno com seu hospedeiro. Recentemente, foram identificadas 13 famílias gênicas enriquecidas em candidatos à efetores de *P. pachyrhizi*, dentre as quais três foram sugeridas como principais (Tribo 1, 2 e 3). Seis genes distribuídos nessas famílias ou tribos foram funcionalmente avaliados em sistema heterólogo, utilizando plantas de tabaco, onde se obteve forte indicativo para função efetora. A partir destes dados, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de sete genes candidatos à efetores selecionados a partir das famílias 1 e 3 em sete isolados do fungo, produzidos a partir de materiais coletados em anos e regiões distintas. Identificar e compreender essas proteínas é um importante passo para avançar no entendimento da interação soja-*P. pachyrhizi* ao passo que auxiliarão no conhecimento da estrutura proteica dos efetores de *Phakopsora* e poderão ser

úteis na identificação das proteínas R da soja. E, constatar o nível de variação genética nesses genes, permitirá a compreensão do processo de seleção atuante, e principalmente, auxiliará na identificação dos domínios chave no reconhecimento R-Avr. Além disso, uma vez identificados isolados altamente virulentos e agressivos, os mesmos podem servir como inóculo em programas de melhoramento da resistência a FAS na soja.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 SELEÇÃO, OBTENÇÃO E CULTIVO DOS ISOLADOS DE *P. pachyrhizi*

Os isolados monourediniais (Darben, 2013) e monospóricos foram cedidos pela Embrapa Soja para a condução do presente estudo. Os isolados utilizados foram selecionados de acordo com o local e ano de coleta, priorizando a seleção de materiais de locais e anos de coleta distintos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Dados dos isolados de *Phakopsora pachyrhizi* utilizados no trabalho.

Código do Isolado	Local Coleta	Ano Coleta
LPF02B07	Passo Fundo – RS - BR	2007
LDA13.2M	Londrina – PR - BR	2013
FTPY15.1M	Fortuna - Paraguai	2015

Para a obtenção dos isolados monourediniais, esporos de uma única urédia foram coletados de folhas infectadas com o auxílio de uma agulha fina esterilizada sob lupa estereoscópica e transferidos para folha destacada sadia previamente preparada (Darben, 2013). A fim de garantir a pureza dos isolados monourediniais, o mesmo procedimento foi realizado durante três ciclos.

Para a obtenção do isolado monospórico, os esporos foram coletados de folhas infectadas, transferidos para um microtubo acrescido de 0,2mL de água ultrapura e 0,01% de Tween 20 para a dispersão dos esporos. 0,1mL da solução foi transferida para placa de *petri* contendo meio ágar-água a 2%. Com o auxílio de microscópio óptico, apenas um esporo foi selecionado e com o auxílio de agulha fina esterilizada, foi posteriormente transferido para folha sadia previamente preparada.

As folhas inoculadas foram transferidas para placas de *petri* contendo meio ágar-água 1% e armazenadas em caixas plásticas mantidas em câmara de crescimento, com temperatura

de 21°C, 60% de umidade e 14 horas de fotoperíodo por aproximadamente 15 dias, para produção de novos esporos.

Para obtenção de quantidade suficiente de esporos (5mg) para extração do DNA genômico, foram realizadas sucessivas etapas de multiplicação em folhas sadias do genótipo suscetível COODETEC 219 RR (CD219 RR). As folhas foram coletadas em estágio V3 da planta e transferidas para um recipiente contendo água destilada para o transporte até o laboratório, onde foram lavadas uma a uma em água corrente e deixadas de molho em água destilada por uma hora para hidratação. Para a inoculação de cada isolado, utilizou-se uma solução de esporos ($\pm 0,5$ mL de água destilada + Tween 20) que foram borrifadas na parte abaxial das folhas. Após a inoculação, as folhas foram transferidas para placa de petri contendo meio ágar-água 1% para manutenção de umidade, e em seguida mantidas em câmara de crescimento com 14 horas de fotoperíodo e temperatura de aproximadamente 23°C. Após aproximadamente 15 dias, novas esporulações ocorreram e parte dos esporos foi utilizada para multiplicação e parte coletada em microtubo de 2mL. Os microtubos contendo os esporos foram desidratados em dessecador e então armazenados em freezer a -80°C. Após a coleta, as folhas foram novamente mantidas, por mais duas semanas, em câmara de crescimento para novo ciclo de esporulação e nova coleta de esporos até obtenção suficiente para a extração.

3.2.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração foi baseada no protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983), com modificações, onde utilizou-se aproximadamente 5mg de esporos de cada isolado. Após pesagem, os esporos foram colocados em microtubos de 2mL com duas esferas de metal (*beads*) para romper a parede celular do esporo. Para a quebra d, os microtubos foram mergulhados no nitrogênio (N₂) líquido e em seguida foram submetidos ao vórtex. Esse procedimento foi realizado alternadamente durante dez minutos. Após a quebra mecânica da parede do esporo, foram adicionados 0,5mL de tampão de extração (SDS10%; Tris-HCl 1M pH8,0; NaCl 5M; EDTA 0,5M e 1%de -mercaptoetanol) seguido de incubação em banho-maria a 65°C por 60 minutos, invertendo-se os tubos a cada 15 minutos.

Após o banho-maria, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 6.000rpm e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo com igual volume de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por meio de suaves inversões durante cinco minutos. Em

seguida, foram centrifugadas novamente e a fase superior foi transferida para um novo microtubo.

Para a precipitação dos ácidos nucleicos foram adicionados ½ volume de acetato de sódio 3M e 1 volume de isopropanol gelado, e os tubos foram armazenados por 2 horas a -20°C. Para a formação do *pellet*, os microtubos foram centrifugados por 30 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 0,5mL de etanol 70% e as amostras foram novamente centrifugadas por cinco minutos à 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os microtubos invertidos permaneceram sobre a bancada à temperatura ambiente até o precipitado secar totalmente. O material foi ressuscitado em 30µL de água ultrapura, acrescida de RNase A (40µg/mL) e incubado a 37°C por cerca de 30 minutos. Finalizada a extração, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

Após a extração, o DNA foi quantificado em NanoDrop® ND-1000 UVis e sua integridade verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%. Por fim, as amostras foram diluídas para se obter uma concentração final de 10ng/µL.

3.2.3 SELEÇÃO DOS CANDIDATOS À EFETORES

Dos genes candidatos à efetores de *P. pachyrhizi* identificados por De Carvalho *et al.* (2016), sete (de_novo_1784, de_novo_2238, de_novo_3939, de_novo_5370, de_novo_5381, de_novo_5849 e de_novo_7164) foram selecionados para caracterização de sua variabilidade molecular nos isolados LPF02B07, LDA13.2M e FTPY15.1M. Yokoyama (2016) sequenciou e caracterizou molecularmente estes sete candidatos nos isolados monourediniais L.UB112, L.LCV107 e L.LD5511 cuja informação foi incluída no presente trabalho para fins de comparação.

3.2.4 AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS

Os sete conjunto de *primers* utilizados para as reações de amplificação (Tabela 3.2) foram desenhados pelo software *primer Express* baseando-se na sequência do transcrito obtido por De Carvalho *et al.* (2016) (códigos de acesso no NCBI: KT247010.1, KT247059.1, KT246719.1, KT246785.1, KT247237.1, KT246795.1 e KT247288.1). Para verificar a especificidade dos *primers*, foi realizado ampliações com DNA de soja e do *Phakopsora*

pachyrhizi, onde foi esperado a amplificação somente com o DNA correspondente do fungo e com o tamanho do fragmento esperado (Dados não apresentados).

Tabela 3.2: Sequências dos pares de *primers*, temperatura de anelamento (TA) e tamanho aproximado do fragmento amplificado de cada efetor.

Efetor	Conjunto de <i>primers</i> (F e R)	TA (°C)	Tamanho (pb)
2238	F 5'- CACGGTGTATTACTTCAGTT -3' R 5'- GCTGTTACCCAAGCAAAGTAG -3'	56	850
1784	F 5'- CATGGACTCATCACAGGTG -3' R 5'- CGTCACCCAAGCCAAGTAA -3'	60	850
5370	F 5'- AGATTCGTAATCCCCAGATT -3' R 5'- GCCAAACCTTGACAAATTAA -3'	54	650
7164	F 5'- AGACTCTCAGCTCTTAAACCAG -3' R 5'- GCCAGACCTCCAAAAATTAG -3'	58	650
5381	F 5'- ATGCACGGTGTATTACTTCAGTTG -3' R 5'- TCATTCTGACTTTTCCGTCA -3'	60	400
5849	F 5'- CACGGTGTATCACTTCAGTTGAGGG -3' R 5'- CTAGTTTGCTTGGGAACAGCAACACATC -3'	60	700
3939	F 5'- CAAGAACAGAGGTCCTGC -3' R 5'- ATGTCAAGCTAGGTCCTAA -3'	55	600

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas utilizando a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* e conduzidas em termocicladores *Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler* para todos os sete candidatos a efetores nos diferentes isolados.

Após a amplificação, realizou-se a eletroforese em gel de agarose a 1,0% com tampão SB 1X e corrida a 100V por aproximadamente uma hora para a separação dos fragmentos. Para verificar o tamanho dos fragmentos gerados, o marcador de tamanho molecular de 1 kb *Plus* (Invitrogen®) foi utilizado como guia. O resultado pôde ser visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema de foto documentação *L.PIX-Molecular Imaging (Loccus Biotechnology)*.

As bandas específicas e com os tamanhos desejados visualizadas no gel de agarose foram recortadas com auxílio de um bisturi e os amplicons foram purificados utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

O DNA purificado foi ligado direto ao vetor de clonagem *pCR®2.1-TOPO* (Invitrogen®), o qual não necessita de enzimas de restrição, utilizando o *TOPO® TA Cloning®*

Kit (Invitrogen®). Para isso, a reação de ligação foi preparada com o vetor, solução salina (1,2M NaCl, 0,6M MgCl₂), o produto purificado e água ultrapura para completar o volume final de 6µL. A reação foi mantida *overnight* à 4°C.

A transformação foi realizada por choque térmico utilizando células quimiocompetentes de *Escherichia coli* (DH5α). A reação de ligação foi adicionada aos microtubos contendo as células quimiocompetentes e incubadas por 30 minutos em gelo. O microtubo foi transferido para banho-maria à temperatura de 42°C por 40 segundos e imediatamente inserido no gelo por 2 minutos. Após esse período, acrescentou-se meio SOC para neutralizar o choque térmico sofrido pela bactéria. Em seguida, as células foram incubadas em tubo Falcon em agitador a 220 rpm durante 1 hora, a 37°C.

Após o período de incubação, as células foram cultivadas no meio LB-ágar 1% contendo o antibiótico Kanamicina, X-gal e IPTG e incubadas em B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio) a 37 °C *overnight*.

Através da coloração, os clones recombinantes brancos foram repicados em meio LB sólido e foram incubados em tubo Falcon contendo meio CG e Kanamicina durante 22 horas a 37°C, sob agitação de 220 rpm. Com o crescimento das bactérias, os plasmídeos recombinantes foram extraídos utilizando o Kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega)* seguindo as instruções do fabricante.

O produto purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UVis. Para confirmar a presença do inserto no vetor, foi realizada a digestão com a enzima EcoRI. As amostras foram diluídas para uma concentração final de 200ng/µL.

3.2.5 IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS CANDIDATOS À EFETORES ENTRE OS ISOLADOS

Para identificar os polimorfismos (SNPs, INDELS), três clones de cada efetor para cada isolado foram sequenciados pelo método de Sanger utilizando o iniciador universal M13 presente no vetor para o sequenciamento nas direções *forward* e *reverse*. As sequências obtidas foram inseridas e editadas no programa BioEdit 7.0.5.3 e a sequência consenso, ou *contig*, de cada isolado foi gerada por meio de inspeção visual. Esta sequência foi utilizada para

alinhamentos múltiplos realizados pelo mesmo programa, para identificação das variações entre os isolados.

Para as avaliações de polimorfismos foram incluídas nas análises as sequências dos mesmos candidatos à efetores dos isolados monourediniais sequenciados por Yokoyama (2016) L.UB112, L.CV107 e L.LD5511, coletados em Uberlândia-MG no ano de 2012; Campo Verde-MT em 2007 e Londrina-PR em 2011, além das sequências dos respectivos candidatos identificados no secretoma descrito por De Carvalho *et al* (2016), que utilizou em seu trabalho uma amostra populacional de *P. pachyrhizi* obtida em Londrina no ano de 2009, bem como sequências correspondentes que apresentaram elevada similaridade ($p < 0.05$) presentes no transcrito haustorial descrito por Link *et al* (2014), que trabalhou com o isolado Thai1 (coleção do laboratório da Universidade de Constança), e por fim, o isolado GA-05 (Georgia, 2005) da patente US20140283207 Dupont (2014) (Kunjeti *et al.*, 2016) (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Sequências gênicas de *P. pachyrhizi* utilizados. Nas colunas que compreendem as sequências inseridas nas análises estão os códigos de acesso do genbank (ncbi) de cada sequência similar ao efector correspondente na linha.

	Efetores	Códigos das sequências inseridas nas análises		
		Carvalho <i>et al</i> (2016)	Londrina população (2009)	GA-05 Georgia (2005)
Família 1	1784	KT247010.1	-	-
	2238	KT247059.1	Dupont_126	Pp_contig06191 (GACM01000882.1)
	5381	KT247237.1	-	Pp_contig06191 (GACM01000882.1)
	5849	KT246795.1	Dupont_126	Pp_contig06191 (GACM01000882.1)
Família 3	3939	KT246719.1	Dupont_144	-
	5370	KT246785.1	-	-
	7164	KT247288.1	-	-

Para detectar o tipo de seleção atuante: positiva (diversificadora) ou negativa (purificadora) utilizou-se o método baseado nas mutações sinônimas e não sinônimas dos códons, proposto por Nielsen e Yang (NY). Para isto, o servidor Selecton server (Doron-Faigenboim *et al.*, 2005; Stern *et al.*, 2007- <http://selecton.tau.ac.il>) foi empregado o qual utiliza inferência Bayesiana. O modelo utilizado foi o M8 (Yang *et al.*, 2000)

3.2.6 ANÁLISE ESTRUTURAL

Para a identificação dos íntrons nas sequências do DNA, os *contigs* gerados após o sequenciamento foram alinhados com as sequências de cDNA correspondentes do banco de dados de nucleotídeos do NCBI. Realizou-se a busca das regiões flanqueadoras GU...AG na intersecção de cada intron/exon. As estruturas foram visualizadas pelo *Gene Structure Display Server* (BO HU *et al.*, 2015. <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>).

As sequências das proteínas preditas como putativos efetores dos seis isolados de *P. pachyrhizi* em conjunto com as proteínas da família 1 e 3 (De Carvalho *et al.*, 2016) foram submetidas a identificação de motivos conservados através do programa MEME (Bailey *et al.*, 2009). Os critérios de busca dos locais dos motivos distribuídos nas sequências foram baseados em qualquer número de repetições e o número máximo de motivos buscados foram 10.

3.2.7 DIVERSIDADE GENÉTICA

Para estimar a diversidade genética, foi realizado o alinhamento de aminoácidos das sequências dos sete candidatos à efetores dos três isolados FTPY15.1M, LDA13.2M e LPF02B07 somando as sequências dos efetores dos isolados L.UB112, L.LCV107 e L.LD5511 estudados por Yokoyama (2016) e acrescidos ainda com as sequências de *outgroup* encontradas para cada candidato através de BLASTx no NCBI e as sequências das Famílias obtidas por De Carvalho *et al* (2016) a qual cada efector pertence. Tais famílias foram obtidas pela análise de clusterização de sequências do secretoma predito de diferentes membros da ordem Pucciniales: 612 proteínas de *U. appendiculatus* (Puthoff *et al.*, 2008); 61 EST's do haustório de *U. fabae* (Jakupovic *et al.*, 2006); 156 proteínas haustoriais de *P. pachyrhizi* (Link *al.*, 2014); 1931 e 643 proteínas de *P. graminis* e *M. larici-populina* (FSD); 21 sequências de *M. lini* (Catanzariti *et al.*, 2006); e 851 contigs de candidatos a efetores de de *P. pachyrhizi* obtidas de lesões de folhas soja por microdissecção a laser seguida de sequenciamento de alto desempenho (De Carvalho *et al*, 2016), com o auxílio do software Tribe MCL (Enright *et 27 al.*, 2002). Após o alinhamento das sequências, o programa MEGA 7.0 foi utilizado para gerar as árvores filogenéticas de cada candidato, através do método *Neighbor-Joining*. O suporte estatístico para o agrupamento filogenético foi obtido com as análises de *bootstrap*, utilizando 1000 repetições.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 ANÁLISE ESTRUTURAL

Os genes candidatos à efetores analisados apresentaram tamanho pequeno, variando de 403 pares de bases (pb) para o efector 5381, sendo este reduzido para 243pb após a retirada dos íntrons; até 1002 e 878pb para os candidatos 1784 e 2238 respectivamente, apresentando ambos 546pb sem íntrons (Tabela 3.4). O maior candidato a efector não ultrapassou 190 aminoácidos, o que corrobora com o fato de que a maioria das SSPs apresentam menos de 250 aminoácidos (Duplessis, 2011). Uma das características que têm sido amplamente utilizada para determinar conjuntos de candidatos à efetores no proteoma conhecido de fungos patogênicos e os quais são referência de genomas já sequenciados, é justamente apresentar tamanho reduzido (Lowe e Howlett, 2012; Duplessis *et al.*, 2014).

Tabela 3.4: Tamanho dos candidatos à efetores em pares de bases(pb) com e sem íntrons e em aminoácidos (aa); números de exons e íntrons.

Candidato Efector	Tamanho (pb) com íntron	Tamanho (pb) sem íntron	Número de éxons	Número de íntrons	Tamanho da proteína predita (aa)
1784	1002	546	6	5	182
2238	878	546	6	5	182
5381	403	243	3	2	81
5849	878	468	5	4	156
3939	652	291	5	4	97
5370	720	320	5	4	106
7164	720	320	5	4	106

Outras características de efetores, como a presença do peptídeo sinal de secreção localizado na região N-terminal, entre os aminoácidos 1 a 22 para os candidatos da família 1, e do 1 a 24 para os da família 3 foram observadas. Além disso, todos apresentaram proteínas com cerca de 6 a 10 resíduos de cisteína (Figura 3.1), os quais podem auxiliar na estabilidade da proteína efetora no meio extracelular através da formação de pontes dissulfídicas intramoleculares (Templeton *et al.* 1994; Rep 2005). Essas pontes dissulfeto mostraram ser importantes para a estabilidade e atividade das proteínas de avirulência Avr4 e Avr9 de *Cladosporium fulvum*, fungo causador da mancha-de-cladospório no tomateiro (Stergiopoulos e De Wit, 2009).

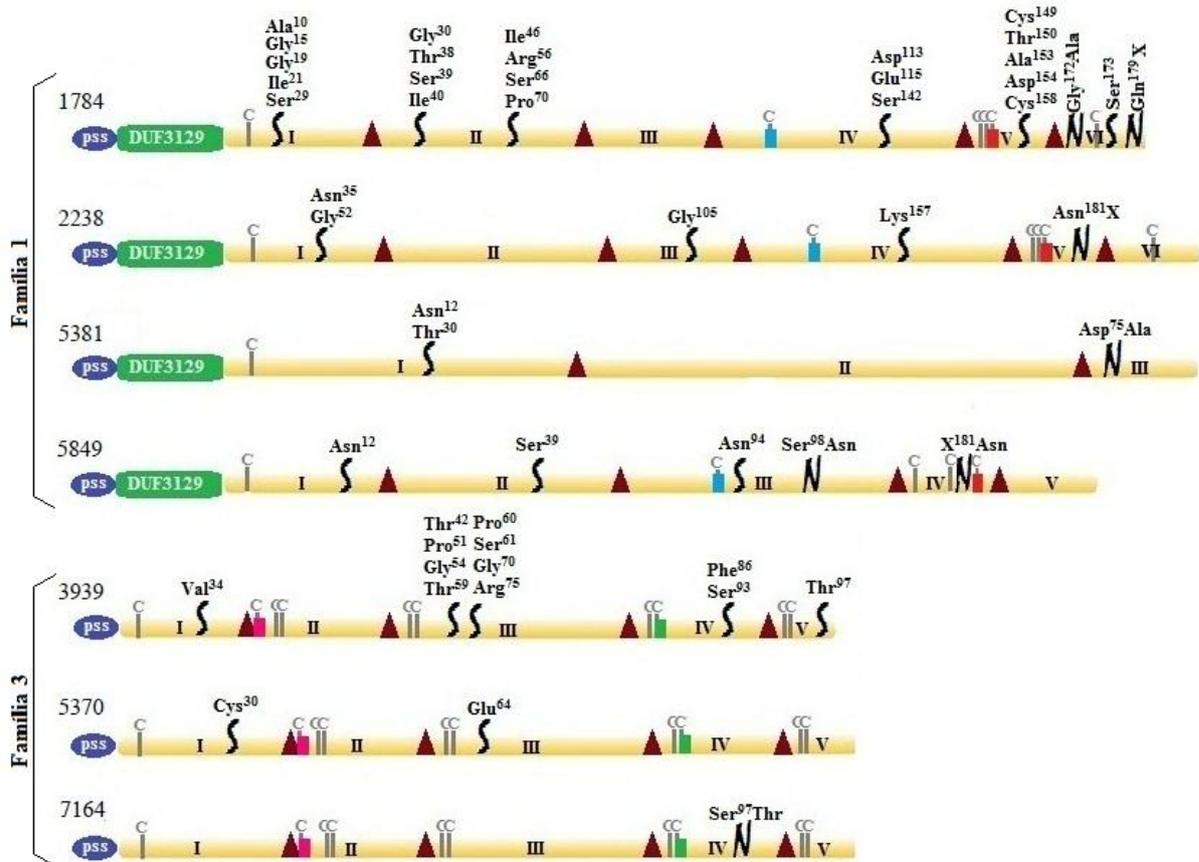


Figura 3.1: Estrutura da proteína predita para os sete candidatos à efetores de *P. pachyrhizi*. A faixa amarela representa as regiões codificadas com os exons identificados com números romanos e os triângulos marrons, as regiões de íntron. O círculo azul com “pss” representa o peptídeo sinal de secreção. A caixa verde “DUF3129” representa o domínio com função desconhecida presente nos candidatos da Família 1. Os locais contendo os resíduos de cisteína estão representados em cinza com um “c”. Os motivos conservados estão representados através dos blocos azul ([YFM][ST]C) e vermelho e (RCR) para os candidatos da Família 1 e rosa ([FY]xC) e verde ([AFY]xC) para os da Família 3. “S” são as substituições sinônimas e “N” as não sinônimas geradas pelos polimorfismos. Arg: Arginina; Asn: Asparagina; Asp: Ácido aspártico; Glu: Ácido glutâmico; Gly: Glicina; Lys: Lisina; Phe: Fenilalanina; Pro: Prolina; Ser: Serina; Thr: Threonina; Val: Valina.

Motivos ricos em cisteína também foram identificados em abundância no secretoma de *M. larici-populina* e *P. graminis* f. sp. *tritici*, o que corrobora que esses motivos são características importantes para os efetores de fungos biotróficos (Duplessis *et al.* 2011; Saunders *et al.* 2012). Em *Blumeria graminis*, estudos revelaram que estes resíduos de cisteínas apresentaram número par, o que pode ser observado também para os candidatos das duas famílias estudadas neste trabalho (Pedersen *et al.*, 2012).

Para todos os candidatos da família 1 foi possível identificar o domínio conservado DUF3129 (Figura 3.1), ainda sem função conhecida descrita (De Carvalho, *et al* 2016), mas reportado anteriormente em outras sequências de candidatos à efetores de fungos, como

Puccinia graminis f. sp. *tritici*, *Melampsora larici-populina* (Duplessis *et al.*, 2011; Saunders *et al.*, 2012).

Motivos conservados foram também identificados para ambas as famílias. Foram encontrados oito para todos os candidatos da família 1, com exceção do candidato 5381 (Figura 3.1). Dentre estes motivos, dois motivos conservados ricos em cisteína [YFM][ST]C e RCR foram previamente identificados (De Carvalho *et al.*, 2016) no segundo e quinto resíduo de cisteína, respectivamente.

Para a família 3, foram encontrados 6 motivos conservados, sendo dois contendo resíduos de cisteínas: os motivos [FY]xC e [AFY]xC (Figura 3.1). Estes motivos foram previamente identificados por De Carvalho *et al.* (2016) e Link *et al.* (2014) e permaneceram conservados neste trabalho após o sequenciamento dos efetores em novos isolados do fungo. O motivo [FY]xC foi comum entre os candidatos efetores de ferrugens tais como *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Duplessis *et al.*, 2011), *Melampsora larici-populina* (Saunders *et al.*, 2012; Hacquard *et al.*, 2012) e *P. striiformis* f.sp. *tritici* (Cantu *et al.*, 2013).

Os motivos são frequentemente utilizados para identificar regiões funcionais e, quando compartilham um ancestral comum, são úteis para a classificação da família proteica correspondente. Em oomicetos existem duas grandes classes de efetores citoplasmáticos, sendo as mais estudadas as que apresentam o motivo RxLR, que possuem um motivo Arg-X-Leu-Arg (em que “X” representa qualquer aminoácido) conservado na região N-terminal. Em *Phytophthora infestans*, o sequenciamento do genoma revelou a presença de 563 genes que codificam proteínas secretadas que contém esse motivo (Haas, 2009). Dos 18 genes *Avr* clonados em oomicetos até agora, 17 pertencem à classe RxLR (Jiang e Tyler, 2012). Vários efetores com o motivo RxLR têm um segundo motivo dEER [aspartato (menos conservado), glutamato, glutamato e arginina] localizado em distâncias variáveis ao primeiro motivo (Jiang *et al.*, 2008). Os motivos RxLR e dEER são importantes para translocação dos efetores para dentro da célula da planta (Whisson *et al.*, 2007). Os motivos [YFM][ST]C, RCR, [AFY]xC, [FY]xC, [AFS]IC, NCxK, GC[FS] e [TS]xC foram descritos como possivelmente importantes entre candidatos a efetores do fungo (De Carvalho *et al.*, 2016; Link *et al.*, 2012), sendo os domínios [YFM][ST]C, RCR predominantes das famílias 1 e [AFY]xC, [FY]xC na família 3.

3.3.2 POLIMORFISMOS

A tabela 3.5 apresenta o número total de polimorfismos identificados, assim como sua localização e tipo de substituição na comparação entre as sequências dos diferentes candidatos à efetores.

Tabela 3.5: Número de polimorfismos identificados entre os isolados dos genes candidatos à efetores de *P. pachyrhizi*.

	Efector	Exon	Íntron	Subst. Sinônima	Subst. Não Sinônima	Substituição do aminoácido	Total
Família 1	1784	28	103	24	4	Gly/Ala ⁽¹⁷²⁾ L.CV107	131
						Ala/Val ⁽¹⁷⁶⁾ LPF02B07	
						Gln/Arg ⁽¹⁷⁹⁾ FTPY15.1M	
						LPF02B07	
						Gln/X ⁽¹⁷⁹⁾ L.UB112	
2238	5	9	4	1	Asn/X ⁽¹⁸¹⁾ Contig06191	14	
5849	5	6	3	2	Ser/Asn ⁽⁹⁸⁾ L.LD5511	11	
					X/Asn ⁽¹³³⁾ Contig06191		
	5381	3	4	2	1	Asp/Ala ⁽⁷⁵⁾ L.CV107	7
						LPF02B07	
						de_novo_5381	
Família 3	7164	12	33	12	0	-	45
	5370	1	0	0	1	Ser/Thr ⁽⁹⁷⁾ de_novo_5370	1
	3939	2	0	2	0	-	2

O candidato a efector 1784 foi o que mais apresentou polimorfismos, com um total de 131 incluindo substituições, inserções e deleções (Tabela 5). Os isolados LDA14.2M e L.CV107 juntamente com a amostra populacional “de_novo_1784” exibiram a maior parte do polimorfismo e demonstraram ser praticamente idênticos. Apesar da alta taxa de substituições, apenas quatro foram não sinônimas para os isolados LPF02B07, L.UB112 e L.CV107, este último, apresentou uma mudança radical de acordo com as propriedades físico-químicas do aminoácido, potencialmente capazes de alterar a estrutura da proteína (Tabela 3.5).

Foi possível detectar 12 substituições entre as sequências correspondentes ao candidato a efector 2238, apenas uma deleção e uma inserção de base, sendo o isolado L.LD5511 o mais polimórfico com cinco substituições, seguido do LPF02B07 com duas substituições e uma deleção. A sequência contig06191 apresentou uma inserção na posição 181 da proteína predita, gerando um códon, alterando todo o quadro de leitura da região C-terminal.

O efetor 5381 apresentou 7 SNPs no total, todos presentes nos isolados LPF02B07 e L.CV107 e dois na sequência populacional de_novo_5381 (Tabela 3.5). Os demais isolados se apresentaram idênticos. Na predição da proteína, houve mutação *missense*, onde o aminoácido ácido aspártico, carregado negativamente, esteve presente para os candidatos dos isolados LPF02B07, L.CV107 e a amostra populacional de_novo_5381, enquanto para o restante dos isolados avaliados foi encontrado na posição correspondente o aminoácido apolar hidrofóbico alanina (Figura 3.1, Tabela 3.5).

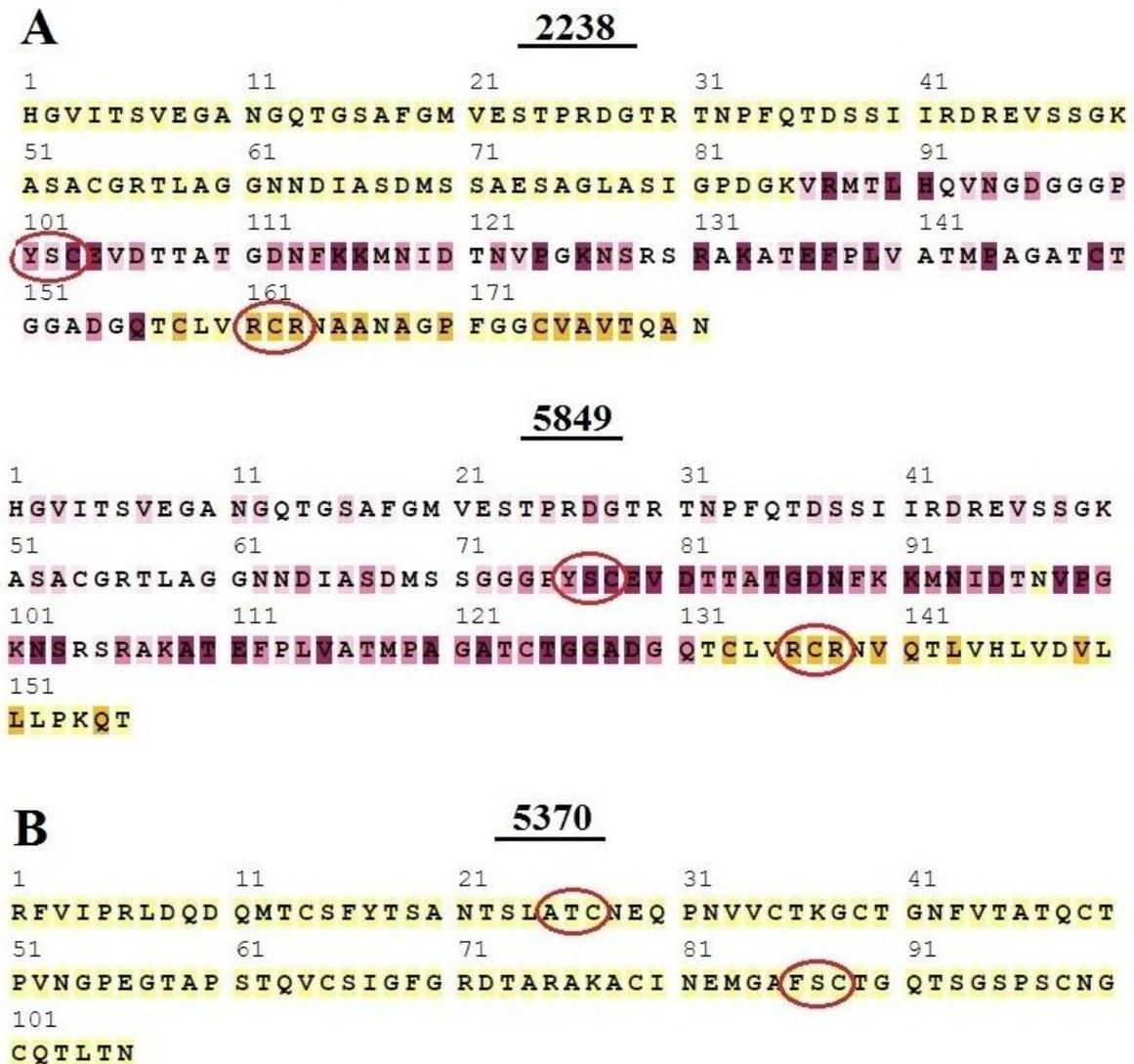
Os SNPs encontrados para o efetor 5849 foram 7 no total e apresentaram 3 deleções e uma inserção. O isolado que mais apresentou polimorfismos foi o L.LD5511 com duas substituições e duas deleções, seguido da amostra populacional de_novo_5849 com três substituições. Os isolados LPF02B07, L.CV107, LDA14.2M seguiram com apenas uma substituição, sendo o LDA14.2M com uma deleção também. O FTPY15.1M apresentou apenas uma deleção. O Contig06191 com aquela inserção de nucleotídeo adenina resultou na alteração da predição da proteína na região C-terminal (Figura 3.1, Tabela 3.5).

O efetor 7164, membro da família 3, apresentou maior nível de polimorfismo após o 1784, com 40 substituições de base, 3 deleções e 2 inserções. Para esse efetor, novamente o isolado L.CV107 foi o que mais se diferenciou quando comparado aos demais isolados. Apesar de apresentar muitas substituições de base, tais alterações não foram capazes de alterar a proteína predita (Tabela 3.5).

Para o efetor 5370, também membro da família 3 a substituição na sequência nucleotídica foi de uma mudança na base G/C na posição 586 da sequência, sendo que os seis isolados apresentaram a base G e o “de_novo_5370” (De Carvalho, *et al.*, 2016), apresentou a base C. Foi gerado um único SNP capaz de alterar o códon do aminoácido na posição 97, porém, a variação do aminoácido foi neutra, ambos pertencentes ao grupo R polar (Figura 3.1, Tabela 3.5). Estes dois aminoácidos são frequentemente encontrados em grupos funcionais de proteínas, tais como sítios catalíticos ativos de muitas enzimas, sugerindo que o efetor 5370 pode estar envolvido em interações proteína-proteína (Hacquard *et al.*, 2012).

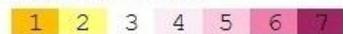
Dois polimorfismos foram encontrados para o candidato à efetor 3939 (Tabela 3.5). Eles foram observados na sequência Dupont_144, a qual se diferenciou dos demais isolados. As substituições geradas por tais polimorfismos foram sinônimas, resultando na mesma sequência proteica.

De acordo com a análise global dos códons das sequências codificadoras (Figura 3.2) realizada pela proporção de substituições sinônimas e não sinônimas, para detectar a pressão de seleção, positiva ou purificadora, foi possível observar a ocorrência de seleção positiva para os candidatos 5849 e 2238, ambos da família 1, com ênfase para a seleção nos motivos RCR conservados para a família.



Legend:

The selection scale:



Positive selection Purifying selection

Figura 3.2: Distribuição dos códons sob seleção positiva ou purificadora dos candidatos da Família 1 (A) e 3 (B) que apresentaram resultado para seleção positiva. Os códons foram coloridos de acordo com os valores calculados de Ka/Ks através do servidor Selecton server (<http://selecton.tau.ac.il/>) (Stern, *et al*, 2002). Em amarelo estão representados os que estão sob seleção positiva diversificadora. No tom 1 de amarelo foi significativo e em tom 2, não

significativa. Em branco ou tons de roxo (3 a 7) os que estão sob seleção purificadora. Os círculos em vermelho representam os motivos conservados de cada família [YFM][ST]C, RCR e [AFY]xC, FxC (Carvalho *et al* 2016; Link *et al*, 2014) 1 e 3, respectivamente.

A alta significância do teste encontrada na região C-terminal dos dois candidatos da família 1, provavelmente tenha sido alcançada pela inserção da sequência contig06191, advinda do isolado Tha1, a qual possui uma inserção de base que promoveu alteração do quadro de leitura na região C-terminal da proteína predita. Torna-se portanto importante destacar que o acréscimo de informação de sequência advindas de outros isolados será crucial para a detecção de regiões de seleção positiva e identificação de domínios importantes entre os efetores de *P. pachyrhizi*. Por exemplo, o estudo dos candidatos 5370, 7164 e 1784 em outras fontes poderá ainda revelar polimorfismos desconhecidos.

Dos sete candidatos à efetores analisados, dois da família 1 (2238 e 5849) apresentaram resultado significativo para seleção positiva, e em um (5370) da família 3 foi detectado seleção positiva porém não foi estatisticamente significativo (Tabela 3.6).

Tabela 3.6: Resultado do *Selecton Server* (Modelo Nielsen e Yang) baseado na inferência Bayesiana para todos os candidatos à efetores.

Candidatos a efetores	Número de membros	Códons sob seleção diversificadora**	Modelo M8 versus M8a p-values	Média Ka/Ks values
1784	4	2/181*	Não significativo	0,088
2238	6	110/181**	0,001	1,260
3939	5	0/97*	Não testado	0,236
5370	4	106/106**	Não significativo	2,717
5381	4	0/80*	Não testado	0,213
5849	5	26/156**	0,001	1,035
7164	4	0/106*	Não testado	0,053

*Seleção purificadora **Seleção diversificadora.

† A seleção pode ser medida pela proporção das taxas de substituições sinônimas (ks) e não-sinônimas (ka) indicada pela razão ômega $\omega = ka/ks$, onde $\omega \geq 1$ indica seleção positiva, $\omega < 1$ seleção neutra ou purificadora. Quando detectado seleção positiva, o modelo M8 versus M8a é aplicado, podendo resultar em significativo ou não significativo. E quando não houve seleção positiva, este modelo não foi aplicado (não testado).

A ocorrência de seleção positiva diversificadora pode sugerir que os genes 2238 e 5849 possam realmente atuar como efetores de *P. pachyrhizi*. Os mesmos candidatos à efetores

analisados em número menor de isolados, foi observado uma mudança na detecção da atuação da seleção positiva, sendo inicialmente apenas possível detectá-la para um pequeno número de códons (Yokoyama, 2016). Destaca-se ainda que os pontos principais nos quais a seleção positiva foi significativamente detectada nos membros da família 1 abrangeram o motivo conservado RCR, nas duas sequências (Figura 3.2). Possivelmente esses motivos estejam relacionados com o reconhecimento pelo hospedeiro durante a interação planta-patógeno, o que justificaria a atuação da seleção positiva.

A análise de polimorfismos em 10 isolados de *P. pachyrhizi* geograficamente distintos, revelou que sequências de nucleotídeos e aminoácidos codificados pelo candidato à efetor PpEC23 foram mantidas nos diversos isolados. De 10 SNPs detectados, apenas dois alteraram o aminoácido. Essas duas mudanças foram testadas a fim de avaliar a supressão da HR induzida por Pst DC3000. Ambas mudanças em PpEC23 mantiveram a sua capacidade para suprimir a HR, demonstrando que as alterações dos aminoácidos não afetaram esta função. Assim, possivelmente os efetores de *P. pachyrhizi* possam apresentar em sua estrutura um ou mais domínios conservados que desempenhem papéis relacionados ao transporte e estabilidade da proteína efetora na célula hospedeira, além dos domínios propriamente envolvidos na interação R x Avr, para os quais se espera grande diversificação (Minghsheng *et al.*, 2016).

No entanto, nos resultados apresentados para os genes efetores AvrL567A, B e C da ferrugem do linho, um total de nove mudanças de aminoácidos distribuídas ao longo dos 450pb de toda a região codante foram encontradas entre o alelo AvrL567 C em relação aos outros dois (Dodds *et al.*, 2006). Tais alterações possibilitaram que a proteína AvrL567 C não fosse mais reconhecida pelas proteínas de resistência do linho, ao passo que AvrL567A e AvL567B são reconhecidas. É importante destacar que tais alterações não estiveram concentradas em uma ou outra região, mas apresentaram-se espaçadas ao longo da proteína. Sendo assim, nesse caso, possivelmente a alteração de um único aminoácido possa ter promovido o escape da proteína AvrL567 C no hospedeiro. Assim, a capacidade de escapar ao reconhecimento do hospedeiro é a fonte mais provável da pressão de seleção que conduz à evolução. O reconhecimento por uma interação direta da proteína R-Avr fornece uma base molecular alternativa que pode explicar uma “queda de braço” evolutiva, levando esses genes à diversificação.

A maioria dos polimorfismos observados nos genes *Avr* de *Cladosporium fulvum* foram deleções, mutações pontuais ou inserções de elementos transponíveis que estão associados com transições de avirulência para virulência, indicando a evolução adaptativa desses genes

conhecidos do patógeno que foram implementados em linhas comerciais de tomate. Também observaram grandes diferenças nos tipos de polimorfismos entre os genes Avr, indicando que a pressão de seleção favorece diferentes tipos de adaptação (Stergiopoulos *et al.*, 2007).

3.3.3 FILOGENIA DOS EFETORES

Para estudar a filogenia dos efetores, uma árvore para cada candidato foi gerada através do programa MEGA 6.0 (2013), pelo método Neighbor-Joining com 1000 *bootstraps*. Para isto, foi realizado o alinhamento das sequências de aminoácidos de cada candidato à efetor dos seis isolados; dos membros da sua respectiva família (Carvalho *et al.*, 2016); de seu *outgroup* encontrado através do BLASTx (NCBI) mais as sequências de Dupont 126, Dupont 144 (Kunjeti *et al.*, 2016).

Para ilustrar, foram selecionadas apenas duas árvores (Figura 3.3) uma para o candidato a efetor 5849 pertencente à família 1 e outra para o candidato 5370, pertencente à família 3.

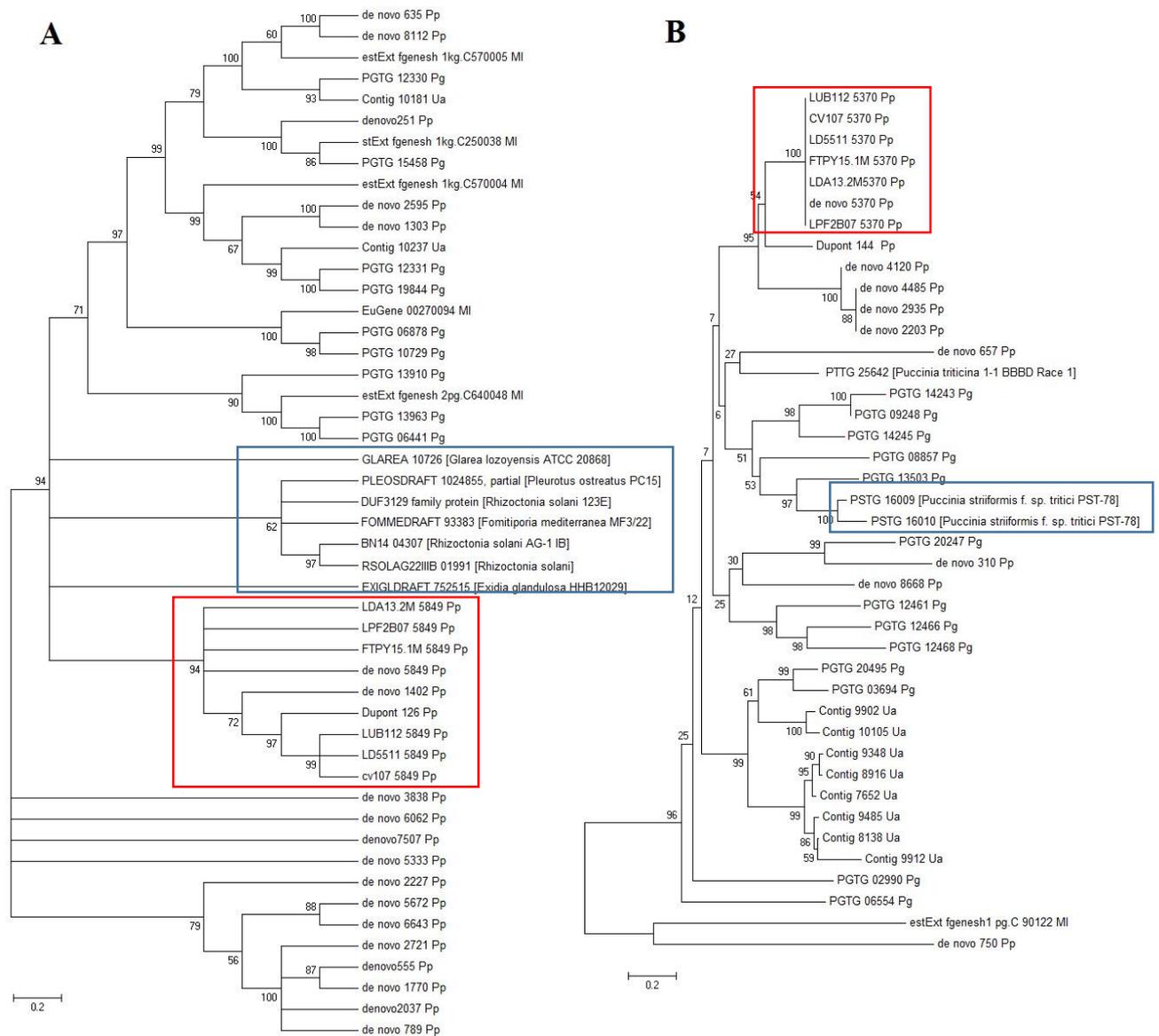


Figura 3.3: Árvores Filogenéticas obtidas para os candidatos à efetores 5849(A) e 5370(B), pertencentes à família 1 e 3 respectivamente. Nas caixas em vermelho estão os isolados analisados e em azul o *outgroup* correspondente ao efetor. Pp: *Phakopsora pachyrizhi*, Ua: *Uromyces appendiculatus*, Pg: *Puccinia graminis*, ML: *Melampsora larici-populina*

Como *outgroup* do candidato 5849 foram encontradas as sequências de *Glarea lozoyensis*, *Pleurotus ostreatus*, *Rhizoctonia solani*, *Fomitiporia mediterranea* e *Exidia granulosa*. Como *outgroup* do candidato 5370 foram utilizadas as sequências de *Puccinia triticina*, e *Puccinia strictiformis*.

Na árvore gerada para o candidato 5849 da família 1, foi possível observar que as sequências dos isolados se agruparam mais próximas ao *outgroup* do que com o restante da

própria família (Figura 3.3). Esse resultado é interessante porque indica maior diferenciação dentro desta família e consequente maior taxa de evolução, característica comum de efetores. Se observarmos novamente a figura 3.5 que traz a distribuição de códons, o candidato 5849 foi o que demonstrou o resultado mais significativo para seleção positiva diversificadora, principalmente no códon onde se encontra o motivo conservado RCR (De Carvalho *et al.*, 2016). Em conjunto, tais resultados sugerem que a proteína possui função efetora e ainda sugerem que o domínio RCR seja potencialmente importante no reconhecimento pelo hospedeiro. Em análises futuras, seria interessante testar funcionalmente a deleção deste domínio para observar como a planta responderia à infecção. O candidato 5849 foi ainda o único a proporcionar a distribuição dos isolados testados em *clusters* distintos, o que seria esperado para sequências efetoras. A árvore filogenética construída separou os isolados em dois grupos: um contendo os isolados LDA13.2M coletado em Londrina (PR) durante a safra de 2013, LPF02B07 de Passo Fundo (RS) em 2007 e FTPY15.1M do Paraguai, 2015; e o outro com os isolados L.UB112 de Uberlândia (MG) coletado em 2012, L.LD5511 de Londrina (PR) em 2011 e L.LCV107 de Campo Verde (MT) em 2007. Separando os dois grupos, encontra-se as amostras populacionais obtidas por De Carvalho *et al* 2009 em Londrina PR dos candidatos de_novo_5849, de_novo1402 e mais a sequência da patente Dupont 126.

Já na árvore gerada para o candidato 5370, representando a família 3, os isolados se agruparam em um único *cluster* e apresentaram maior similaridade com *Puccinia* e menor com *Uromyces* e *Melampsora*, característica observada de forma geral para todos os candidatos avaliados (Figura 3.3). Porém, também é possível observar uma diversidade dentro da família, já que outros candidatos estão distribuídos em diferentes *clusters*. Esta diversidade também pode ser suportada pelos resultados obtidos para o teste de seleção positiva, onde este candidato a efector apresentou resultado significativo para seleção positiva.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma geral, as características estruturais dos sete candidatos a efetores avaliados nos diferentes isolados mantiveram-se como previamente descritas: o tamanho das sequências expressas preditas obtidas foram pequenas, não ultrapassando 200 aminoácidos. Foi possível detectar resíduos de cisteína ao longo dos exons. Os domínios conservados descritos por Link *et al.* 2014 e De Carvalho *et al.*, 2016, [YFM][ST]C e RCR foram identificados nos candidatos da família 1, e os [FY]xC e [AFY]xC estiveram presentes na família 3.

Os candidatos da família 1 apresentaram maior diversidade tanto com base na análise filogenética, quanto à nível de polimorfismos, com altos índices de substituições, inserções e deleções.

Dos sete efetores analisados, foi possível afirmar que os candidatos 2238 e 5849, pertencentes à família 1, estão sob seleção positiva diversificadora. Curiosamente, o 5849 foi o único candidato capaz de separar os isolados em dois *clusters* e adicionalmente, este candidato foi o que apresentou resultado mais significativo principalmente no códon onde se encontra o motivo conservado RCR, sugerindo para a função efetora da proteína codificada por esse gene e ainda um potencial papel deste domínio na interação RxAvr.

A análise filogenética demonstrou a existência de grande diversidade dentro das famílias, separando membros da mesma família em grupos distintos, ou até mesmo sequências do mesmo gene em isolados distintos, o que suporta a ideia de que tais famílias sejam realmente expandidas em *P. pachyrhizhi*, característica também encontrada em famílias de efetores.

Aumentar a quantidade de isolados para os testes de seleção provavelmente influenciará para melhor detecção de seleção positiva e dos domínios alvo da evolução nessas proteínas.

Futuramente, a realização de análises funcionais *in vivo* das proteínas codificadas pelos candidatos a efetores avaliados, como por exemplo a partir da deleção dos domínios sugeridos aqui como alvo de seleção positiva, serão fundamentais para validar os possíveis papéis dos polimorfismos encontrados e a função efetora de tais proteínas.

5. REFERÊNCIAS

ALTENBACH, D.; ROBATZEK, S. **Pattern Recognition Receptors: from the Cell Surface to Intracellular Dynamics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 1031-1039. 2007.**

ARMSTRONG, M. R *et al.* An ancestral oomycete *locus* contains late blight avirulence gene that is recognized in the host cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, 2005.

BAILEY, T. *et al.* "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching", **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. W202-W208, 2009.

BARR, R.; CALDWELL, R. M.; AMACHER, R. H. An examination of vegetative recombination of urediniospore color and virulence in mixtures of certain races of *Puccinia recondita*. **Phytopathology**, v. 54, p. 104-109, 1964.

BARRETT, L. G., THRALL, P. H., DODDS, P. N., VAN DER MERWE, M., LINDE, C. C., LAWRENCE, G. J., *et al.* Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini*. **Molecular Biology and Evolution** 26, 2499–2513. 2009.

BO, HU. *et al* GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics**, v. 31, n. 8, p.1296-1297, 2015.

BOLLER, T., FELIX, G. 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. 2009

BOURRAS, S. *et al.* 2015. Multiple avirulence loci and allele-specific effector recognition control the Pm3 race-specific resistance of wheat to powdery mildew. **Plant Cell** 27: 2991–3012.

BROMFIELD K. R. e HARTWIG E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254–255, 1980.

BROMFIELD, K. R. Soybean Rust. Monograph N°. 11. St. Paul, **American Phytopathological Society**, 1984.

BROWN, J. K.; HOVMOLLER, M. S. **Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease.** *Science*, v.297, p.537-541, 2002.

BRUNNER, P. C., TORRIANI, S. F., CROLL, D., STUKENBROCK, E. H., AND MCDONALD, B. A. Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. **Molecular Biology and Evolution** 30, 1337–1347, 2013.

BURDON, J.J. e SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology** 87:664-669. 1997

CANTU, D. *et al.* Genome Analyses of the Wheat Yellow (Stripe) Rust Pathogen *Puccinia striiformis f. sp. tritici* Reveal Polymorphic and Haustorial Expressed Secreted Proteins as Candidate effectors. **BMC Genomics**, v. 14, n. 270, p.1-18, 2013.

CATANZARITI, A. M. *et al.* Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **Plant Cell**, v. 18, p. 243-256, 2006.

CATANZARITI, A. M.; DODDS, P. N.; ELLIS, J. G. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters**. v.269, p.181–88, 2007.

CHUMA, I. *et al.* Multiple translocation of the *AVR-Pita* effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. **PLoS Pathog**, 7, e1002147, 2011.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. **Parceria público privada no combate à ferrugem asiática da soja**. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/>>. Acesso: 09.Jan.2017.

CUI, L. *et al.* Analysis of polymorphism and transcription of the effector gene *Avr1b* in *Phytophthora sojae* isolates from China virulent to *Rps1b*. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 2, p. 114-122, 2012.

DANGL, J. L. Pivoting the Plant Immune System. **Science**, v. 341, p. 745–751, 2013.

DARBEN, L. M. **Obtenção e caracterização molecular e fenotípica de isolados monourediniais de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões do Brasil**. Maringá, PR, 99p. Tese de Doutorado – Doutorado em genética e melhoramento. Universidade Estadual de Maringá, 2013.

DE CARVALHO, M. C. *et al.* Prediction of the in planta *P. pachyrhizi* secretome and potential effector families. **Molecular plant pathology**, Accepted Article, 2016.

DE WIT, P.J.G. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64, p.2726-2732, 2007.

DEAN, RA. *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature** 434:980–986, 2005.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1:19-20, 1983.

DODDS, P.N. *et al.* The *Melampsora lini* *AvrL567* avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **Plant Cell** 16 755–768, 2004.

DODDS, P.N., LAWRENCE, G.J., CATANZARITI, A.M., *et al.* Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 103, 8888-8893, 2006.

DODDS P. N., RATHJEN J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**. 11, 539–548 10.1038/nrg2812, 2010.

DORON-FAIGENBOIM A, STERN A, BACHARACH E, PUPKO T: Selecton: a server for detecting evolutionary forces at a single amino-acid site. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2101–2103, 2005.

DUPLESSIS, SÉBASTIEN. Obligate Biotrophy Features Unraveled by the Genomic Analysis of Rust Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108 (22): 1–23, 2011.

DUPLESSIS, S. *et al.* *Melampsora Larici-Populina* Transcript Profiling during Germination and Timecourse Infection of Poplar Leaves Reveals Dynamic Expression Patterns Associated with Virulence and Biotrophy. **Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI** 24 (7): 808–18. doi:10.1094/MPMI-01-11-0006, 2011.

DUPLESSIS, S., JOLY, D. J., and DODDS, P. N. Rust Effectors, in **Effectors in Plant-Microbe Interactions**, 1st Edn, eds F. Martin and S. Kamoun (Chichester: John Wiley and Sons, Ltd), 155–193, 2012.

DUPLESSIS S., BAKKEREN G., HAMELIN R. Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics. **Advances in Botanical Research**. 70 173–209 10.1016/B978-0-12-397940-7.00006-9, 2014.

EDWARDS, H. H. AND BONDE, M. R. Penetration and Establishment of *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean Leaves as Observed by Transmission Electron Microscopy. **Phytopathology**. v. 101, p. 894-900, 2011.

ELLIS, J. G., RAFIQI, M., GAN, P., CHAKRABARTI, A., AND DODDS, P. N. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. **Current Opinion in Plant Biology** 12:399-405, 2009.

ENRIGHT, A.J., VAN DONGEN, S., and OUZOUNIS, C.A. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1575–1584, 2002.

FERNANDEZ, D. *et al.* .454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals *in planta* expressed pathogen secreted proteins and plant functions expressed in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology** 13, 17–37 10.1111/j.1364-3703.2011.00723.x, 2012.

FLOR H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology** 32:653-669, 1942.

FREDERICK, R.D.; SYNDER, C.L.; PETERSON, G.L.; BONDE, M.R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, 92:217-227, 2002.

FREIRE M.C.M. *et al.* Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. **Genetics and Molecular Biology** 31:920-931, 2008.

- GARCIA, A. *et al.* Molecular mapping of soybean (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of novel *locus* and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, p.545-553, 2008.
- GLOWACKI S., MACIOSZEK V. K., KONONOWICZ A. K. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. **Cellular and Molecular Biology Letters** 16 1–24 10.2478/s11658-010-0024-2, 2011.
- GOELLNER, K. *et al.* *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, 11:169–177, 2010.
- GÖHRE, V. AND ROBATZEK, S. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual Review Phytopathology** 46: 189-215, 2008.
- HAAS, B.J. *et al.* Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature** 461(7262): 393-398, 2009.
- HACQUARD S. *et al.* The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics. **J. Pathog.** 2011
- HACQUARD S. *et al.* A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar Leaf Rust). **Mol. Plant Microbe Interact.** 25, 279–293, 2012.
- HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. Breeding for Resistance to Soybean Rust. **Plant Disease**, 89:664-666, 2005.
- HARRIS, C. J. *et al.* Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** 110: 21189–21194. 2013.
- HYTEN DL, *et al.* Map location of the *Rpp1 locus* that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science** 47: 835-838, 2007.
- HYTEN DL, *et al.* Bulked segregant analysis using the GoldenGate assay to locate the *Rpp3 locus* that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science** 49:265–271, 2009.
- JAKUPOVIC, M. *et al.* Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. **Fungal Genetics and Biology** 43: 8–19, 2006.
- JIANG RHY, TRIPATHY S, GOVERS F, TYLER BM. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105(12): 4874-4879, 2008.
- JIANG RHY, TYLER BM. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. **Annual Review of Phytopathology** 50: 295-318, 2012.
- JONES, J. D. E DANGL J. L. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.

KAMOON, S. The secretome of plant-associated fungi and Oomycetes. In: DEISING, H. **Plant Relationships**. 2 nd Ed. Berlin: Springer-Verlag, pp. 173–180, 2009.

KAMPER, J. *et al.* Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature**, v.444, p.97-101, 2006.

KEMEN E. *et al.* Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 18(11): 1130-1139, 2005.

KIM KS, *et al.* Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 and SNP haplotype analysis of the Rpp1 region in diverse germplasm. **Theoretical and Applied Genetics** 125: 1339-1352, 2012.

KOCH, E.; EBRAHIMNESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. **Phytopathology**, v. 106, p. 302–320, 1983.

KUNJETI SG, *et al.* Identification of *Phakopsora pachyrhizi* Candidate Effectors with Virulence Activity in a Distantly Related Pathosystem. **Frontiers in Plant Science**. 7:269. doi:10.3389/fpls.2016.00269, 2016.

LI S, Smith JR, Ray JD, Frederick RD. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 125: 133-142, 2012.

LINK, T.I. *et al.* The Haustorial Transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and Their Candidate Effector Families. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, p. 379–393, 2014.

LITTLE, R. e MANNERS, J.G. Somatic recombination in yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*): I. The production and possible origin of two new physiologic races. **Transactions of the British Mycological Society** Volume 53, Issue 2, Pages 251-258, 1969.

LIU, Z., *et al.* Patterns of diversifying selection in the phytotoxin-like scr74 gene family of *Phytophthora infestans*. **Molecular Biology and Evolution** 22, 659–672, 2005.

LIU Z., *et al.*, The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring Snn1. **PLoS Pathogens**. 8: 1002467, 2012.

LOEHRER M., *et al.* On the current status of *Phakopsora pachyrhizi* genome sequencing. **Frontiers in Plant Science**. 5:377. doi: 10.3389/fpls.2014.00377, 2014.

LOWE R. G., HOWLETT B. J. Indifferent, affectionate, or deceitful: lifestyles and secretomes of fungi. **PLoS Pathogens**. 8:e1002515 10.1371/journal.ppat.1002515, 2012.

LU, X. *et al.* Allelic barley MLA immune receptors recognize sequence-unrelated avirulence effectors of the powdery mildew pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 113: E6486–E6495, 2016.

- MA L-J, *et al.* Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature** 464: 367–373, 2010.
- MANNERS e BAMPTON. Fusion Of Uredospore Germ Tubes in *Puccinia graminis*. **Nature** 179, 483 – 484, 1957.
- MARCHETTI, M.A.; UECKER, F.A.; BROMFIELD, K.R. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Phytopathology**, 65:822-823, 1975.
- MCDONALD, B. A. *et al.* Coevolution of host and pathogen populations in the *Hordeum vulgare*–*Rhynchosporium secalis* pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 3924–3927, 1989.
- MEDZHITOV, R. AND JANEWAY, C.A., JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell** 91:295-298, 1997.
- MEYER J. D. F., *et al.* Identification and analyses of candidate genes for Rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. **Plant Physiology**. 150 295–307. 10.1104/pp.108.134551, 2009.
- MINGSHENG, Q.I., *et al.* A Small Cysteine-Rich Protein from the Asian Soybean Rust Fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, Suppresses Plant Immunity. **PLoS Pathogens** 12(9): e1005827. doi:10.1371/journal.ppat.1005827. 2016.
- MONTEROS, M. J.; *et al.*, Mapping and confirmation of the ‘Hyuuga’ redbrown lesion resistance gene for asian soybean rust. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. 2, p. 829-834, Mar-Apr 2007.
- NEMRI A. *et al.* The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. **Frontiers in Plant Science**. 5:98 10.3389/fpls.2014.00098. 2014.
- NOGUEIRA, S. R. **Resistência de plantas hospedeiras e identificação de genes diferencialmente expressos na interação soja – *Phakopsora pachyrhizi***. Viçosa, MG, 98p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- NURNBERGER, T. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249-266, Apr 2004.
- ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN, J.F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycological Research**, 96:825-850, 1992.
- PASTOR-CORRALES, M.A. Diversity of the rust pathogen and common bean guides gene deployment for development of bean cultivars with durable rust resistance. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, 49:51–52, 2006.
- PEDERSEN, C. *et al.* Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. **Bmc Genomics**. 13:694. 2012.
- PENNISI, E. Armed and dangerous. **Science** 327:804-805. 2010.

- PETRE B., KAMOUN S. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? **PLoS Biology**. 12:e1001801. 10.1371/journal.pbio. 2014.
- PETRE, B., JOLY, D.L., AND DUPLESSIS, S. Effector proteins of rust fungi. 828 **Frontiers in Plant Science**. 20:416. 2014.
- PONTECORVO, G., **Nature**, 170, 204, 1953.
- POSADA-BUITRAGO, M.L. AND FREDERICK, R.D. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics and Biology** 42, 949–962. 2005.
- PUTHOFF, D.P. *et al.* Analysis of expressed sequence tags from *Uromyces appendiculatus* hyphae and haustoria and their comparison to sequences from other rust fungi. **Phytopathology**, 98, 1126–1135. 2008.
- RAVENSDALE, M. *et al.* Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. **Molecular Plant Pathology** 12, 93–102 10.1111/j.1364-3703.2010.00657. 2011.
- REHMANY, A.P. *et al.* Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. **Plant Cell** 17 1839–1850. 2005
- REP M. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. **FEMS Microbiology Letters** 253(1): 19-27. 2005
- SAUNDERS, D.G. *et al.* Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. **Plos one**. 7:e29847. 2012.
- SCHIMIDT, S. M. *et al.* MITES in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. **BMC Genomics** 14:119 2013
- SEGRETIN, M. E. *et al.* Single amino acid mutations in the potato immune receptor R3a expand response to *Phytophthora* effectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 27: 624–637. 2014.
- SELIN, CARRIE *et al.* Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: Progress and Challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- SHIU, S.H; BLEECKER, A.B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function and signaling. Science's STKE, http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans_2001/113/re22. 2001
- SILVA, D.; *et al.*, Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, p.57-63, 2008.
- SOHN, K.H.; LEI, R.; NEMRI, A.; JONES, J.D.G. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR3 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v.19, p.4077-4090, 2007.

SPERSCHNEIDER J, *et al.* Diversifying Selection in the Wheat Stem Rust Fungus Acts Predominantly on Pathogen-Associated Gene Families and Reveals Candidate Effectors. **Frontiers in Plant Science** 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00372. 2014

SPERSCHNEIDER J., DODDS P. N., GARDINER D. M., MANNERS J. M., SINGH K. B., TAYLOR J. M. Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. **PLoS Pathology**. 11:e1004806. 10.1371/journal.ppat.1004806. 2015.

STERGIOPOULOS I e DE WIT PJ. Fungal effector proteins. **Annual Review Phytopathology** 47: 233–263. 2009.

STERGIOPOULOS, I. *et al.* Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different model of adaptive evolution. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 20:1271-1283. 2009.

STERGIOPOULOS, I., *et al.* Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. **Molecular Plant Pathology**, 15: 447–460. doi:10.1111/mpp.12104. 2014.

STERN, A. *et al.* Selecton Advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. **Nucleic Acid Research**, v. 35, p. W506–W511, 2007.

STONE, C. L. *et al.* Analysis of the complete mitochondrial genome sequences of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Mycologia** 102, 887–897. doi: 10.3852/09-198. 2010.

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. Geographical variation and positive diversifying selection in the host-specific toxin SnToxA. *Mol. Plant Pathology* 8, 321–332, 2007.

SUN, Y. *et al.* Amplified fragment length polymorphism and virulence polymorphism in *Puccinia hordei*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 29:25-34, 2007.

TEMPLETON MD, RIKKERINK EHA, BEEVER R. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 7: 320-325, 1994

TREMBLAY, A., LI, S., SCHEFFLER, B. AND MATTHEWS, B.F. Laser capture microdissection and expressed sequence tag analysis of uredinia formed by *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Physiology and Molecular Plant Pathology** 73, 163–174, 2009.

TWIZEYIMANA, M. *et al.* Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. **Plant Pathology**, 60:719-729, 2011.

UPADHYAYA N. M. *et al.* A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 27 255–264 10.1094/MPMI-07-13-0187-FI, 2014.

- VITTAL, R.; YANG, H.C.; HARTMAN, G. L. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. **European Journal Plant Pathology**, 132:163–167, 2012.
- VIEIRA, A. *et al.* Expression profiling of genes involved in biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. **European Journal of Plant Pathology**, 133:261-277, 2012.
- WANG, X. B. e MCCALLUM, B. Fusion body formation, germ tube anastomosis, and nuclear migration during the germination of urediniospores of the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*. **Phytopathology**, v. 99, p. 1355-1364, 2009.
- WHISSON, S.C. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. **Nature** 450(7166): 115, 2007.
- WIN, J., *et al.* Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Cell* 19, 2349–2369, 2007.
- YAMANAKA, N. *et al.* Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, 35:153–162, 2010.
- YANG, Z.H. *et al.* Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. **Genetics**, v. 155, n.1, p.431–449, 2000.
- YOKOYAMA, A. **Caracterização estrutural, diversidade genética e perfil transcricional de candidatos a efetores de *Phakopsora pachyrhizi***. Londrina, PR, 73p. Dissertação de Mestrado – Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina, 2016.
- YORINORI, J.T.; JUNIOR, J.N.; LAZZAROTTO, J.J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância, economia e controle. **Documentos** 247, 36p, 2004.
- YORINORI, J.T. *et al.* Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, 89:675-677, 2005.
- YU N, *et al.* Fine mapping of the Asian soybean rust resistance gene *Rpp2* from soybean PI 230970. **Theoretical and Applied Genetics** 128:387–396, 2015.
- ZAMBOLIM, L. **Ferrugem asiática soja**. Viçosa MG: Suprema, 2006, 140p
- ZHANG, X.X. *et al.* Genetic diversity and origins of *Phakopsora pachyrhizi* isolates in the United States. **Asian Journal of Plant Pathology**, ISSN 1819-1541/ DOI: 10.3923/ajppaj.2012.

APÊNDICE

POLIMORFISMOS DOS CANDIDATOS À EFETORES PERTENCENTES À FAMÍLIA 1

POLIMORFISMOS CANDIDATO À EFETOR 1784

Código SNP	Posição	Variação do Nucleotideo	Região	Efeito no aminoácido	Isolado						Carvalho
					L.UB112	L.LD5511	L.CV107	L.PF02B07	LDA13.2M	FTPY15.1M	de_novo_1784
1701	30	G>A	Exon 1	Ala10=MS	G	G	A	G	A	G	G
1702	45	C>A	Exon 1	Gly15=MS	C	A	C	C	C	C	C
1703	57	T>C	Exon 1	Gly19=MS	T	T	C	T	C	T	C
1704	63	C>T	Exon 1	Ile21=MS	C	C	T	C	T	C	T
1705	87	T>A	Exon 1	Ser29=MS	T	T	A	T	A	T	A
1706	107	C> -	Íntron 1	não trad	C	C	-	C	-	C	
1707	115	T>C	Íntron 1	não trad	T	T	C	T	C	T	
1708	116	T>C	Íntron 1	não trad	T	T	C	T	C	T	
1709	134	T>C	Íntron 1	não trad	T	T	C	T	C	T	
1710	140	T>A	Íntron 1	não trad	T	T	A	T	A	T	
1711	147	T>C	Íntron 1	não trad	T	T	C	T	C	T	
1712	149	ins. G	Íntron 1	não trad	-	-	G	-	G	-	
1713	168	T>C	Íntron 1	não trad	T	T	C	T	C	T	
1714	170	A>C	Íntron 1	não trad	A	A	C	A	C	A	
1715	176	G>T	Íntron 1	não trad	G	G	T	G	T	G	
1716	177	A>T	Íntron 1	não trad	A	A	T	A	T	A	
1717	178	C>T	Íntron 1	não trad	C	C	T	C	T	C	
1718	183	C>T	Íntron 1	não trad	C	C	T	C	T	C	
1719	186	A>G	Exon 2	Gly30=MS	A	A	G	A	G	A	G
1720	210	C>T	Exon 2	Thr38=MS	C	C	T	C	T	C	T
1721	213	G>A	Exon 2	Ser39=MS	G	G	A	G	A	G	A
1722	216	T>C	Exon 2	Ile39=MS	T	T	C	T	C	T	C
1723	234	T>C	Exon 2	Ile46=MS	T	T	C	T	C	T	C

1724	264	T>A	Exon 2	Arg56=MS	T	T	A	T	A	T	A
1725	294	A>C	Exon 2	Ser66=MS	A	A	C	A	C	A	A
1726	306	A>T	Exon 2	Pro70=MS	A	A	C	A	C	A	A
1727	319	T>G	Íntron 2	não trad	T	T	G	T	G	T	
1728	342	A>G	Íntron 2	não trad	A	A	G	A	G	A	
1729	343	C>T	Íntron 2	não trad	C	C	T	C	T	C	
1730	351	A>G	Íntron 2	não trad	A	A	G	A	G	A	
1731	358	T>C	Íntron 2	não trad	T	T	C	T	C	T	
1732	362	T>C	Íntron 2	não trad	T	T	C	T	C	T	
1733	379	A>T	Íntron 2	não trad	A	A	T	A	T	A	
1734	380	A>G	Íntron 2	não trad	A	A	G	A	G	A	
1735	385	C>T	Íntron 2	não trad	A	A	A	A	G	A	
1736	489	T>C	Íntron 3	não trad	T	T	C	T	C	T	
1737	490	T>A	Íntron 3	não trad	T	T	A	T	A	T	
1738	502	C>T	Íntron 3	não trad	C	C	T	C	T	C	
1739	509	T>G	Íntron 3	não trad	T	T	G	T	G	T	
1740	510	T>A	Íntron 3	não trad	T	T	A	T	A	T	
1741	515	C>T	Íntron 3	não trad	C	C	T	C	T	C	
1742	520	T>C	Íntron 3	não trad	T	T	C	T	C	T	
1743	529	A>T	Íntron 3	não trad	A	A	T	A	T	A	
1744	532	A>C>-	Íntron 3	não trad	A	-	C	A	C	A	
1745	546	C>T	Íntron 3	não trad	T	T	C	T	C	T	
1746	548	C>T	Íntron 3	não trad	T	T	C	T	C	T	
1747 - 1763	551>567	GAAATGAAAA AAAAAAA > -	Íntron 3	não trad	-	-	GAAATGAAA AAAAAAA	-	GAAATGAAA AAAAAAA	-	
1764	579	A>-	Íntron 3	não trad	A	A	A	A	A	-	
1765	580	A>-	Íntron 3	não trad	-	A	A	A	A	-	
1766	581	C>A	Íntron 3	não trad	A	A	C	A	C	A	
1767	582	A>-	Íntron 3	não trad	A	A	A	A	-	A	

1768	583	C>T	Íntron 3	não trad	C	C	A	C	A	C	
1769	635	C>T	Exon 4	Asp113=MS	C	C	T	C	T	C	T
1770	641	G>A	Exon 4	Glu115=MS	G	G	A	G	A	G	A
1771	722	C>A	Exon 4	Ser142=MS	C	C	A	C	A	C	A
1772	749	T>A	Íntron 4	não trad	T	T	A	T	A	T	
1773	750	C>-	Íntron 4	não trad	C	C	-	C	-	C	
1774	753	T>G	Íntron 4	não trad	T	T	G	T	G	T	
1775	755	C>T	Íntron 4	não trad	C	C	T	C	T	C	
1776	764	T>C>-	Íntron 4	não trad	T	T	C	T	-	T	
1777	766	T>A>C	Íntron 4	não trad	T	T	A	T	C	T	
1778	768	A>T	Íntron 4	não trad	A	A	T	A	A	A	
1779	769	T>A	Íntron 4	não trad	T	T	A	T	T	T	
1780	770	T>G	Íntron 4	não trad	T	T	G	T	G	T	
1781	771	C>G	Íntron 4	não trad	C	C	C	C	G	C	
1782	772	T>C	Íntron 4	não trad	T	T	T	T	C	T	
1783	779	T>-	Íntron 4	não trad	-	-	T	T	T	T	
1784	780	G>T>-	Íntron 4	não trad	G	G	-	G	T	G	
1785	788	T>A	Íntron 4	não trad	T	T	A	T	A	T	
1786	789	T>G	Íntron 4	não trad	T	T	G	T	G	T	
1787- 1789	791-793	->AAT	Íntron 4	não trad	-	-	AAT	-	AAT	-	
1790	798	T>C	Íntron 4	não trad	T	T	C	T	C	T	
1791	801	G>C	Íntron 4	não trad	G	G	C	G	C	G	
1792	807	T>-	Íntron 4	não trad	T	T	T	-	T	T	
1793	816	A>-	Íntron 4	não trad	A	A	A	-	A	A	
1794	819	T>C	Exon 5	Cys149=MS	T	T	C	T	C	T	T
1795	822	T>C	Exon 5	Thr150=MS	T	T	C	T	C	T	C
1796	831	T>C	Exon 5	Ala153=MS	T	T	C	T	C	T	C
1797	834	T>C	Exon 5	Asp154=MS	T	T	C	T	C	T	C

1798	846	C>T	Exon 5	Cys158=MS	C	C	T	C	T	C	T
1799	867	G>A	Íntron 5	não trad	G	G	A	G	A	G	
17100	872	A>-	Íntron 5	não trad	A	A	A	-	A	A	
17101	876	A>G	Íntron 5	não trad	A	A	G	A	G	A	
17102	878	A>T	Íntron 5	não trad	A	A	T	A	T	A	
17103	882	A>T	Íntron 5	não trad	A	A	T	A	T	A	
17104	885	A>G	Íntron 5	não trad	A	A	G	A	G	A	
17105	886	A>-	Íntron 5	não trad	A	A	A	-	A	A	
17106	894	G>A	Íntron 5	não trad	G	G	A	G	A	G	
17107	902	T>-	Íntron 5	não trad	T	T	T	-	T	T	
17108	903	A>-	Íntron 5	não trad	A	A	A	-	A	A	
17109	910	A>-	Íntron 5	não trad	A	A	A	-	A	A	
17110	912	C>A>G	Íntron 5	não trad	C	C	A	C	G	C	
17111	915	A>-	Íntron 5	não trad	A	A	A	-	A	A	
17112	916	T>-	Íntron 5	não trad	T	T	T	-	T	T	
17113	917	C>T	Íntron 5	não trad	C	C	C	T	C	C	
17114	922	A>T	Íntron 5	não trad	A	A	T	A	T	A	
17115	924	A>T	Íntron 5	não trad	A	A	T	A	T	A	
17116	926	T>A	Íntron 5	não trad	T	T	A	T	A	T	
17117	929	G>T	Íntron 5	não trad	G	G	T	G	T	G	
17118	935	T>-	Íntron 5	não trad	-	T	T	-	T	T	
17119	936	A>-	Íntron 5	não trad	A	A	-	A	-	A	
17120	937	A>-	Íntron 5	não trad	A	A	-	A	-	A	
17121	940	T>A	Íntron 5	não trad	T	T	T	A	T	T	
17122	942	T>-	Íntron 5	não trad	-	T	T	T	T	T	
17123	945	A>-	Íntron 5	não trad	-	A	A	-	A	A	
17124	946	T>C>-	Íntron 5	não trad	T	T	C	-	C	T	
17125	974	G>C	Exon 6	Gly172Ala	G	G	C	G	G	G	G
17126	975	A>C	Exon 6	Gly172Ala	A	A	A	C	A	A	A

17127	978	C>T	Exon 6	Ser173=MS	C	C	T	C	T	C	T
17128	986	C>T	Exon 6	Ala176=Val	C	C	C	T	C	C	C
17129	994	C>A	Exon 6	Gln179=Arg	C	C	C	A	C	A	C
17130	995	A>G	Exon 6	Gln179=Arg	C	C	C	G	C	G	C
17131	996	A>-	Exon 6	Gln179=X	-	A	A	A	A	A	A

POLIMORFISMOS CANDIDATO À EFETOR 2238

Código SNP	Posição	Variação do Nucleotideo	Região	Efeito no aminoácido	Isolado						Carvalho <i>et al</i> (2016)	DuPont (2014)	Link <i>et al</i> (2014)
					L.UB112	L.LD5511	L.CV107	L.PF02B07	LDA13.2M	FTPY15.1M	de_novo 2238	DuPont_126	Contig 06191
2201	33	T>C	Exon 1	Asn35=MS	T	C	T	C	T	T	C	T	T
2202	84	T>C	Exon 1	Gly52=MS	T	T	T	T	T	T	T	C	T
2203	99	T>C	Íntron 1	não trad.	T	T	T	C	T	T			
2204	104	T>C	Íntron 1	não trad.	T	T	C	T	T	T			
2205	106	->T	Íntron 1	não trad.	-	-	-	-	-	T			
2206	315	A>T	Íntron 2	não trad.	A	T	A	T	A	A			
2207	320	C>T	Íntron 2	não trad.	C	T	C	T	C	C			
2208	339	A>T	Íntron 2	não trad.	A	T	A	T	A	A			
2209	379	A>C	Exon 3	Gly105=MS	A	C	A	A	A	A	A	A	A
2210	475	C>T	Íntron 3	não trad.	C	T	C	C	C	C			
2211	600	A>T	Exon 4	Lys157=MS	A	A	A	A	A	A	A	T	A
2212	738	->A	Exon 5	Asn181=X	-	-	-	-	-	-	-	-	A
2213	772	T>A	Íntron 5	não trad.	T	A	T	T	T	T			
2214	788	G>C	Íntron 5	não trad.	G	C	G	G	G	G			

POLIMORFISMOS CANDIDATO À EFETOR 5381

Código SNP	Posição	Variação do Nucleotídeo	Região	Efeito no aminoácido	Isolados						Carvalho <i>et al</i> (2016)
					L.UB112	L.LD5511	L.CV107	L.PF02B07	LDA13.2M	FTPY15.1M	de_novo 2238
5301	33	C>T	Exon 1	Asn12=MS	C	C	T	T	C	C	C
5302	87	C>T	Exon 1	Thr30=MS	C	C	T	T	C	C	T
5303	104	T>C	Íntron 1	não trad	T	T	C	C	T	T	
5304	314	T>A	Íntron 2	não trad	T	T	A	A	T	T	
5305	319	T>C	Íntron 2	não trad	T	T	C	C	T	T	
5306	338	T>A	Íntron 2	não trad	T	T	A	A	T	T	
5307	378	C>A	Exon 3	Asp75Ala	C	C	A	A	C	C	A

POLIMORFISMOS CANDIDATO À EFETOR 5849

Código SNP	Posição	Variação do Nucleotídeo	Região	Efeito no aminoácido	Isolados						Carvalho <i>et al</i> (2016)	Link <i>et al</i> (2014)
					L.UB112	L.LD5511	L.CV107	L.PF02B07	LDA13.2M	FTPY15.1M	de_novo 2238	Contig 06191
5801	36	T>C	Exon 1	Asn12=MS	T	T	T	T	T	T	C	T
5802	107	T>C	Íntron 1	não trad	T	T	T	C	C	T		
5803	186	T>C	Exon 2	Ser39=MS	T	T	T	T	T	T	C	T
5804	291	G>A	Íntron 2	não trad	G	G	G	G	A	G		
5805	459	T>-	Íntron 2	não trad	T	-	T	T	T	T		
5806	460	T>-	Íntron 2	não trad	T	-	-	T	T	-		
5807	461	T>-	Íntron 2	não trad	T	T	T	T	-	-		
5808	559	C>T	Exon 3	Asn94=MS	C	C	C	C	C	C	T	C
5809	570	A>G	Exon 3	Ser98Asn	A	G	A	A	A	A	A	A
5810	740	->A	Exon 4	X133Asn	-	-	-	-	-	-	-	A
5811	774	T>A	Íntron 4	não trad	T	A	T	T	T	T		

POLIMORFISMOS DOS CANDIDATOS À EFETORES PERTENCENTES À FAMÍLIA 3

POLIMORFISMOS CANDIDATO À EFETOR 7164

Código SNP	Posição	Variação do Nucleotídeo	Região	Efeito no aminoácido	Isolados						Carvalho <i>et al</i> (2016)
					L.UB112	L.LD5511	L.CV107	L.PF02B07	LDA13.2M	FTPY15.1M	de_novo_2238
7101	187	T>C	Exon 2	Val34=MS	T	C	C	T	T	T	C
7102	241	T>C	Íntron 2	não trad	C	C	T	T	T	T	
7103	251	T>G	Íntron 2	não trad	G	G	T	T	T	T	
7104	252	G>A	Íntron 2	não trad	A	A	G	G	G	G	
7105	259	A>-	Íntron 2	não trad	-	-	A	A	A	A	
7106	267	T>C	Íntron 2	não trad	C	C	T	T	T	T	
7107	271	A>T	Íntron 2	não trad	T	T	A	A	A	A	
7108	274	C>T	Íntron 2	não trad	T	T	C	C	C	C	
7109	283	G>T	Íntron 2	não trad	T	T	G	G	G	G	
7110	311	A>T	Íntron 2	não trad	T	T	A	A	A	A	
7111	322	C>T	Exon 3	Thr42=MS	T	T	C	C	C	C	T
7112	334	G>A	Exon 3	Pro51=MS	A	A	G	G	G	G	A
7113	343	A>T	Exon 3	Gly54=MS	T	T	A	A	A	A	T
7114	358	C>T	Exon 3	Thr59=MS	T	T	C	C	C	C	T
7115	361	C>T	Exon 3	Pro60=MS	T	T	C	C	C	C	T
7116	364	T>C	Exon 3	Ser61=MS	C	C	T	T	T	T	C
7117	391	C>G	Exon 3	Gly70=MS	G	G	C	C	C	C	G
7118	406	A>G	Exon 3	Arg75=MS	G	G	A	A	A	A	G
7119	417	A>T	Íntron 3	não trad	T	T	A	A	A	A	
7120	419	A>C	Íntron 3	não trad	C	C	A	C	C	C	
7121	420	G>A	Íntron 3	não trad	A	A	G	G	G	G	
7122	421	A>G	Íntron 3	não trad	G	G	A	G	G	G	
7123	504	C>T	Íntron 3	não trad	T	T	C	C	C	C	

7124	546	C>T	Exon 4	Phe86=MS	T	T	C	C	C	C	T
7125	567	T>C	Exon 4	Ser93=MS	C	C	T	T	T	T	C
7126	585	C>A	Íntron 4	não trad	A	A	C	C	C	C	
7127	589	C>T	Íntron 4	não trad	T	T	C	C	C	C	
7128	591	G>A	Íntron 4	não trad	A	A	G	G	G	G	
7129	592	C>T	Íntron 4	não trad	T	T	C	C	C	C	
7130	609	A>G	Íntron 4	não trad	G	G	A	A	A	A	
7131	610	A>G	Íntron 4	não trad	G	G	A	A	A	A	
7132	616	A>C	Íntron 4	não trad	C	C	A	A	A	A	
7133	617	T>A	Íntron 4	não trad	A	A	T	T	T	T	
7134	622	->A	Íntron 4	não trad	A	A	-	-	-	-	
7135	623	->T	Íntron 4	não trad	T	T	-	-	-	-	
7136	627	T>C	Íntron 4	não trad	C	C	T	T	T	T	
7137	644	A>G	Íntron 4	não trad	G	G	A	A	A	A	
7138	646	C>A	Íntron 4	não trad	A	A	C	C	C	C	
7139	654	A>C	Íntron 4	não trad	C	C	A	A	A	A	
7140	666	A>T	Íntron 4	não trad	T	T	A	A	A	A	
7141	670	T>-	Íntron 4	não trad	-	-	T	T	T	T	
7142	671	A>-	Íntron 4	não trad	-	-	A	A	A	A	
7143	672	A>G	Íntron 4	não trad	G	G	A	A	A	A	
7144	682	A>G	Íntron 4	não trad	G	G	A	A	A	A	
7145	689	T>C	Exon 5	Thr97=MS	C	C	T	T	T	T	C

