



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALESSANDRA YOKOYAMA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, DIVERSIDADE
GENÉTICA E PERFIL TRANSCRICIONAL DE CANDIDATOS
A EFETORES DE *PHAKOPSORA PACHYRHIZI***



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Soja

ALESSANDRA YOKOYAMA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, DIVERSIDADE
GENÉTICA E PERFIL TRANSCRICIONAL DE CANDIDATOS
A EFETORES DE *Phakopsora pachyrhizi***

Londrina
2016

ALESSANDRA YOKOYAMA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, DIVERSIDADE
GENÉTICA E PERFIL TRANSCRICIONAL DE CANDIDATOS
A EFETORES DE *PHAKOPSORA PACHYRHIZI***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Francismar Corrêa
Marcelino-Guimarães

Londrina
2016

Yokoyama, Alessandra.

Caracterização estrutural, diversidade genética e perfil transcricional de candidatos a efetores de *Phakopsora pachyrhizi* / Alessandra Yokoyama. - Londrina, 2016.
103 f. : il.

Orientador: Doutora Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. *Phakopsora pachyrhizi* - Tese. 2. Soja - Tese. 3. Diversidade genética - Tese. I. Corrêa Marcelino-Guimarães, Doutora Francismar . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ALESSANDRA YOKOYAMA

**“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E
PERFIL TRANSCRICIONAL DE CANDIDATOS A EFETORES DE
PHAKOPSORA PACHYRHIZI”**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francismar Corrêa Marcelino-
Guimarães
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UNOPAR

Dra. Luana Mieko Darben
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Londrina, 30 de agosto de 2016.

"Humildade é sinônimo de sabedoria, que é sinônimo de conhecimento, que é sinônimo de generosidade, que é sinônimo de maturidade que por sua vez é sinônimo de humildade".

(Teorilang)

Com todo amor, aos meus pais e irmão,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por Ele ter me dado suporte para seguir e ter forças para superar as barreiras encontradas no caminho.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), ao programa de Mestrado de Biotecnologia e a todos os professores: André Luíz Martinez de Oliveira, Cesar Augusto Tischer, Doumit Camillos Neto, Elisabete Yurie Sataque Ono, Geni da Silva Varéa, Josiane Alessandra Vignoli, Luiz Filipe Protássio Pereira, Mara Lúcia Luiz Ribeiro, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Maria Inês Rezende, Suzana Mali de Oliveira. Vocês foram essenciais para a minha evolução acadêmica.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante o período do mestrado.

À Embrapa Soja, pela estrutura física para realizar minha dissertação.

À minha orientadora, Doutora Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães, pela dedicação, paciência e ensinamentos por todos esses anos que estive sob sua orientação. Admiro seu profissionalismo e pelo ser humano que é.

À minha família, a qual me apoia em todas as minhas decisões, em que sempre pude ter a liberdade para expor minhas opiniões e receber conselhos dos quais sempre foram para o meu bem. Eu não poderia escolher uma família melhor que a minha.

Aos amigos de laboratório que estiverem presentes diariamente na realização do meu trabalho, Luana Darben, Fernanda Castanho, Michelle Rincão, Kenia Carvalho, Bruna Brumer, Ariane Faria, Bianca Guimarães, Bruna Sercero, Juliana Baberge, Suellen Hishinuma, Talitta Parmezan, Juliane Marinho, Juliana Marcolino, Rafael Nomura, Luciano Aoyagi, Willian Giordani, Jean Alekcevetch, Rafaela Reis, Valeria Caitar, Everton Ferreira, Andre Caranhato, Andre Passianoto, João Vitor Maldonado. Vocês nem imaginam o carinho e admiração que sinto por vocês.

Aos funcionários da Embrapa soja, Cesar Silveira, Marcia Kuwahara, Silvana Rockenbach, Vera Pierotti, Ana Maria Avelino, Adriana Brombini, Danielle Gregório, Allan Flausino, Luiz Alexandre Guizilini, muito obrigada pelo suporte técnico para execução do meu trabalho e pela amizade.

Aos amigos do programa de Biotecnologia, meus eternos “favos de mel”.

Sou imensamente grata por tudo e a todos!

Obrigada!!!

YOKOYAMA, Alessandra. **Caracterização estrutural, diversidade genética e perfil transcricional de candidatos a efetores de *Phakopsora pachyrhizi***. 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

O fungo *Phakopsora pachyrhizi*, pertencente a ordem Pucciniales, é um parasita biotrófico obrigatório, ou seja, depende do hospedeiro para seu desenvolvimento e absorção de nutrientes. Durante a interação com a planta hospedeira, o patógeno secreta proteínas conhecidas como efetores, podendo atuar como fatores de virulência ou avirulência (Avr). A interação entre os produtos dos genes R- Avr leva a uma corrida evolutiva entre o patógeno e seu hospedeiro. De Carvalho et al (2016), em busca de candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, realizaram um estudo do transcriptoma *in planta* da interação entre planta e patógeno, baseada na técnica de RNA-seq obtido de amostras de RNA pela técnica de microdissecação a laser da lesão. Análises *in silico* possibilitou a identificação de 851 proteínas potencialmente secretadas, que foram distribuídas em famílias de genes com características de efetores putativos. De 33 famílias, 3 destacaram-se entre as famílias. Neste trabalho, genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, pertencentes à pelos menos 2 famílias de Pucciniales descritas por De Carvalho et al, 2016, foram caracterizados molecularmente, tanto a nível estrutural e perfil de expressão, quanto sua variabilidade ao nível de polimorfismo de DNA, utilizando diferentes haplótipos com base na região ITS (Darben, 2013), compostos de isolados previamente caracterizados, oriundos de diferentes anos e regiões brasileiras. A caracterização estrutural dos candidatos a efetores revelou a conservação entre os diferentes isolados e membros de cada família de candidatos a efetores avaliados. Nas análises filogenéticas dos isolados para os genes candidatos efetores, revelou agrupamentos similares aos descritos por De Carvalho et al (2016). A comparação entre os níveis substituições sinônimas e não-sinônimas nas sequências codificadoras dos candidatos a efetores revelou que os candidatos 2238 e 5849, estão sob seleção diversificadora, sendo que a maioria dos candidatos avaliados neste estudo estão sob seleção purificadora, inferindo sua possível função conservada destes genes.

Palavras-chave: *Phakopsora pachyrhizi*. Efetor. Seleção diversificadora positiva.

YOKOYAMA, Alessandra. **Structural characterization, genetic diversity and transcriptional profile of candidate effectors of *Phakopsora pachyrhizi***. 2016. 103 pp. Dissertation (Master in Biotechnology) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

The *Phakopsora pachyrhizi* belonging to Pucciniales order, is an obligate biotrophic parasite, or depends upon the host to their development and nutrient absorption. During the interaction with the host plant, the pathogen secretes proteins known as effectors, may act as virulence factors or avirulence (Avr). The interaction between the products of R-Avr genes leads to an evolutionary race between the pathogen and its host. De Carvalho et al (2016) in search of candidate effectors of *P. pachyrhizi*, conducted a study of the transcriptome in plant pathogen interaction between the plant and, based on the RNA-seq technique of RNA samples obtained by laser capture microdissection (LCM). In silico analysis enabled the identification of 851 potentially secreted proteins, which were distributed in families of genes with characteristics of effectors putative. 33 families, three stood out among families. In this work, the candidate effector genes of *P. pachyrhizi* belonging to at least two families Pucciniales described by De Carvalho et al, 2016 have been molecularly characterized, both at a structural level and expression profile, as its variability level of DNA polymorphism using different haplotypes based on ITS region (Darben, 2013), composed of previously characterized isolates, from different years and regions. The structural characterization of candidate effectors revealed conservation among different isolates and members of each family of candidates evaluated effectors. In the phylogenetic analysis of the isolates for gene effectors candidates, revealed similar groups to those described by De Carvalho et al (2016). The comparison between the levels synonymous substitutions and non-synonymous in the coding sequences of candidate effectors showed that candidates in 2238 and 5849, are under diversifying selection positive, and most of the evaluated candidates in this study are under purifying selection, inferring a possible conserved function these genes.

Keywords: *Phakopsora pachyrhizi*. Effector. Diversifying selection positive

SUMÁRIO

1	Introdução	15
2	Objetivos	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	Revisão bibliográfica	18
3.1	A Ferrugem asiática da soja (FAS)	18
3.1.1	Etiologia e Controle do agente patogênico	18
3.1.2	Sintomatologia	20
3.1.3	Ciclo de vida	22
3.1.4	Variabilidade patogênica do fungo	23
3.2	Interação molecular planta-patógeno	26
3.2.1	Sistema imune da planta: PTI e ETI	26
3.2.2	Proteínas Efetoras de Uredinales	27
3.1.3	Co-evolução entre fatores de avirulência-genes R e modelos evolutivos	29
3.3	Variabilidade genética de efetores	30
3.4	Modelos evolutivos	32
4	Material e Métodos	35
4.1	Material Biológico e Seleção dos candidatos efetores	35
4.2	Extração do DNA genômico	36
4.3	Reações de amplificação	36
4.4	Purificação e clonagem dos produtos amplificados	37
4.5	Caracterização dos polimorfismos em genes candidatos a efetores de <i>P. pachyrhizi</i>	38
4.6	Diversidade genética de isolados de <i>P. pachyrhizi</i> com base em polimorfismos em genes candidatos a efetores	39
4.7	Análise estrutural dos genes candidatos a efetores	40
4.8	Perfil de expressão de genes candidatos a efetores de <i>P. pachyrhizi</i>	40

4.8.1	Delineamento Experimental.....	40
4.8.2	Extração de RNA total e síntese de cDNA	41
4.8.3	RT-qPCR	41
5	Resultados e Discussão.....	43
	Referências	44
	ANEXO	56
	ANEXO A - Caracterização estrutural e polimorfismos de genes candidatos a efetores de <i>P. pachyrhizi</i>	57
	ANEXO B - Lista de Tabelas	87
	ANEXO C - Polimorfismos dos candidatos a efetores da Família 1 e 3	92
	ANEXO D - Normas para submissão do artigo para o periódico Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	99

1. Introdução

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de soja no mundo (CONAB, 2016), porém a ferrugem asiática da soja (FAS), cujo agente etiológico é o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, figura ainda como uma das principais doenças que afetam a produção da oleaginosa, podendo levar a perdas em produtividade que chegam a 80% (YORINORI *et al.*, 2005).

O fungo *Phakopsora pachyrhizi*, pertencente a ordem Pucciniales, é um parasita biotrófico obrigatório, ou seja, depende do hospedeiro para seu desenvolvimento e absorção de nutrientes. Durante a interação com a planta hospedeira, o patógeno secreta proteínas conhecidas como efetores, sendo que alguns são translocados no interior da célula hospedeira, através de uma estrutura especializada denominada haustório. Tais proteínas podem atuar como fatores de virulência ou avirulência (Avr), sendo que para o sucesso da infecção a atividade de virulência dos efetores deve estar associada com a manipulação das funções celulares ou com a supressão das respostas de defesa da planta hospedeira (CATANZARITI *et al.*, 2006; DODDS *et al.*, 2004). Em contrapartida, os genes de resistência a doenças em plantas, conhecidos como genes R, codificam imunorreceptores capazes de reconhecer as proteínas efetoras específicas do patógeno, nesse caso denominados proteínas de avirulência. Uma vez que as proteínas Avr são reconhecidas, as plantas iniciam uma resposta de imunidade que normalmente resulta em uma reação de hipersensibilidade (HR) localizada, o que limita a infecção (DODDS e RATHJEN, 2010; JONES *et al.*, 2006).

No decorrer do tempo, esta interação entre os produtos dos genes R- Avr leva a uma corrida evolutiva entre o patógeno e seu hospedeira (ANDERSON *et al.*, 2010). Logo espera-se que genes codificando proteínas efetoras sejam aquelas que evoluam mais rapidamente no genoma dos patógenos (seleção positiva), como forma de escapar do reconhecimento por sistemas de defesa da planta hospedeira e então suplantar os mecanismos de resistência.

Recentemente, com a disponibilidade do genoma de muitos fungos causadores de ferrugem, a predição de candidatos a efetores usando ferramentas de genômica estrutural e comparativa tem se intensificado (DUPLESSIS *et al.*, 2011; HACQUARD *et al.*, 2011; SAUNDERS *et al.*, 2012; CANTU *et al.*, 2013; LINK *et al.*, 2014; NEMRI *et al.*, 2014).

De Carvalho *et al.* (2016), em busca de candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, realizaram um estudo do transcriptoma in planta da interação entre soja e *P. pachyrhizi*, combinando a técnica de microdissecação a laser (LCM) da lesão, seguida do

sequenciamento de alto desempenho das amostras de RNA obtidas. De 36.350 mil ESTs preditas do fungo, foram identificadas 851 proteínas potencialmente secretadas, que foram agrupadas em famílias pela análise comparativa com o secretomas de outras ferrugens, se destacando pelo menos três famílias potencialmente enriquecidas como efetores. Algumas das proteínas secretadas preditas apresentaram características comum a efetores, incluindo: tamanho reduzido, elevado conteúdo de cisteína, ausência de domínios PFAM (exceto aquelas associadas com a patogenicidade), presença de domínios conservados, além de terem sido fortemente expressos na planta durante a infecção.

Neste trabalho, genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, pertencentes a pelos menos duas famílias de Pucciniales enriquecidas com candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, descritas por De Carvalho et al, 2016, foram caracterizados molecularmente, tanto a nível estrutural e perfil de expressão, quanto sua variabilidade ao nível de polimorfismo de DNA, utilizando diferentes haplótipos compostos de isolados previamente caracterizados, oriundos de diferentes anos e regiões brasileiras. Com base nos resultados, é possível inferir pelos menos dois candidatos sob seleção diversificadora. Adicionalmente, a análise de diversidade genética entre os diferentes isolados revelou agrupamentos similares aos descritos por De Carvalho et al (2016).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar estruturalmente genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* pertencentes as duas principais famílias de efetores na Ordem Uredinales/Pucciniales (Famílias 1 e 3), seguida da análise de sua diversidade genética e perfil transcricional em isolados monouredinais de *P. pachyrhizi*, coletados em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil, e em diferentes anos, e sua relação com a patogenicidade do fungo.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* pertencentes as duas principais famílias de efetores presentes na Ordem Uredinales/Pucciniales (Famílias 1 e 3) quanto ao seu perfil transcricional utilizando diferentes isolados monouredinais do patógeno, coletados em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil, e em diferentes anos;
- Identificar os principais polimorfismos presentes em genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* a partir da análise de sua diversidade genética em isolados monouredinais do patógeno, coletados em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil, e em diferentes anos;
- Testar a ocorrência de seleção purificadora contra diversificadora em candidatos a efetores;
- Identificar SNPs que se correlacionam com a virulência.

3. Revisão bibliográfica

3.1 A Ferrugem asiática da soja (FAS)

3.1.1 Etiologia e Controle do agente patogênico

O fungo *P. pachyrhizi* Sydow e Sydow, um Basidiomiceto da ordem Pucciniales, atua como parasita obrigatório biotrófico, isto é, necessita do tecido vivo do hospedeiro para extrair os nutrientes essenciais a sua sobrevivência, por isso, são capazes de explorar células vivas como fontes de alimento. Devido a essa característica, o número de oportunidades ou mecanismos para realizar suas atividades vitais reduz, o que dificulta também sua manipulação *in vitro* para fins de pesquisas, necessitando de plantas de soja ou folhas destacadas mantidas em placas de petri contendo meio ágar-água para a manutenção e multiplicação do patógeno (ZAMBOLIM, 2006; TWIZEYIMANA *et al.*, 2011).

A detecção do fungo foi descrita pela primeira vez no Japão em 1902 (HENNING, 1903), e em 1914 já havia se disseminado para diversos países do sudeste de Ásia. No continente africano foi registrada pela primeira vez em Togo em 1980 (MAWUENA, 1982) e recentemente, foi detectado na Tanzânia e Malawi, respectivamente (MURITHI *et al.*, 2014, 2015). De acordo com o Vakili e Bromfield (1976), a doença foi constatada na América em 1976 em Porto Rico. No ano de 2001, o patógeno foi detectado no Paraguai, bem como no Brasil (YORINORI *et al.*, 2004). A partir disso, o fungo se disseminou por vários países sul americanos, como a Argentina, Bolívia, Colômbia, Uruguai e Equador (ROSSI, 2003; NAVARRO *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006; STEWART *et al.*, 2005; SOTOMAYOR-HERRERA, 2005), e também no México e Estados Unidos (CÁRCAMO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2005). Atualmente, a ferrugem asiática encontra-se em todos os países onde a soja é cultivada.

Desde a sua constatação no território brasileiro, a FAS tem causado sérios danos à economia, com a elevação do custo de produção e redução da produtividade, com um prejuízo já estimado em US\$125,5 milhões. Na última safra (2015/2016), o clima favorável e a disponibilidade do hospedeiro colaboraram para a ocorrência do patógeno, sendo registrados 460 focos da doença no Brasil, sendo os estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul com maiores incidências (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2016).

As perdas em grãos foram reduzidas nos últimos anos graças ao controle realizado por fungicidas, como triazóis e estrobirulinas, porém, há relatos de perda da eficiência dos mesmos (GODOY *et al.*, 2015). Essa prática além de aumentar os custos de produção, constitui uma fonte de contaminação do meio ambiente. Outros métodos de controle, como o período de ausência de plantas de soja vivas no campo, denominado de

vazio sanitário, a identificação de genótipos resistentes e o uso de cultivares menos suscetível têm sido utilizados.

O vazio sanitário da soja é uma medida alternativa de redução de uredósporos no ambiente, na entressafra, para inibir o surgimento precoce da doença na cultura da soja, pela redução da quantidade de inóculo. O período do vazio varia de 60 a 90 dias, considerando que o tempo máximo de sobrevivência de uredósporos de *P. pachyrhizi* é de 55 dias. Atualmente, 12 estados adotam o período do vazio sanitário regulamentado: Rondônia, Pará, Tocantins, Maranhão, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, além do Paraguai, país que também é produtor de soja e faz fronteira com o Brasil (CONAB, 2016).

A resistência de cultivares as doenças constitui um método de controle eficiente, barato e menos agressivo ao ambiente (MCLEAN e BYTH, 1976). Com base na compreensão da patogenicidade é possível identificar genótipos resistentes que podem ser utilizados como fontes de genes de resistência para o desenvolvimento de cultivares, eficazes para determinadas populações do patógeno (AKAMATSU *et al*, 2013).

Até o momento, seis genes de resistência dominantes a *P. pachyrhizi* (*Rpp1* a *Rpp6*) foram mapeados no genoma da soja, mas nenhum gene ainda foi clonado (HYTEN, D.L. *et al.*, 2007; YU, N. *et al.*, 2015; HYTEN, D.L. *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012; KIM, K.S. *et al.*, 2012; MONTEROS, M.J *et al.*, 2007; MEYER, J.D. *et al*, 2009; SILVA, D.C.G. *et al*, 2008). Tal resistência genética tem sido explorada para o desenvolvimento de cultivares (GODOY *et al*, 2016), entretanto devido a elevada variabilidade genética do fungo, a resistência mediada por genes R tem sido suplantada naturalmente e nenhum gene R capaz de fornecer ampla resistência a todos os isolados do patógeno foi ainda identificado, dificultando o desenvolvimento de cultivares com resistência durável (BROMFIELD, 1984; HARTMAN *et al.*, 2005; YORINORI *et al.*, 2005; YAMAOKA *et al.*, 2002; YAMANAKA *et al.*, 2010; MILLES *et al.*, 2011; AKAMATSU *et al.*, 2013).

Recentemente, Kawashima e seus colaboradores (2016), identificaram e clonaram um gene de resistência *CcRpp1* (Resistência *Cajanus cajan* contra *P. pachyrhizi* 1) a partir do feijão guandu (*Cajanus cajan*), que confere resistência total ao fitopatógeno quando expresso em soja. Apesar de não detectarem isolados capazes de suplantar a resistência conferida pelo gene *CcRpp1*, o fungo tem demonstrado que pode rapidamente suplantar genes de resistência que são implantados individualmente. Com mais de 30 milhões de hectares de soja cultivada no Brasil, demonstra que o fitopatógeno sofre uma constante pressão seletiva, por isso, seria necessário estabelecer um conjunto de genes adicionais com diferentes especificidades ou diferentes mecanismos de resistência a FAS.

Cultivares com genes de resistência já se encontram disponíveis comercialmente, contudo, essas cultivares não dispensam a utilização de fungicidas e devem ser utilizadas como uma estratégia adicional de manejo (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2016).

A empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG) desenvolveu a tecnologia InoX para o controle da ferrugem da soja aos produtores da região sul do Brasil, das quais duas cultivares são convencionais (TMG 801 e TMG 803), duas cultivares transgênicas (TMG 7161RR e TMG 7188RR) e uma variedade convencional (BRSGO 7560) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Seagro) do estado de Goiás e com o Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuária (CTPA) (FREITAS, 2011). A resistência das cultivares não é totalmente eficaz pela variabilidade do fungo através da mutação ocasionada pelo próprio patógeno, mas proporciona à planta condições propícias de lidar com a doença no campo.

3.1.2 Sintomatologia

Os sintomas da ferrugem asiática iniciam-se por minúsculos pontos (1 a 2 mm de diâmetro) mais escuros do que o tecido sadio da folha, com coloração esverdeada a cinza esverdeada. A manifestação da doença pode surgir em qualquer estágio de desenvolvimento e em diferentes partes da planta, sendo predominantemente os sintomas foliares (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Ao contrário das demais ferrugens, Reis *et al* (2006) descreve que os sintomas causados pela ferrugem da soja são denominados de “lesões”, e não de pústulas, devido a ocorrência de necrose do tecido foliar onde cada lesão pode conter várias pústulas. Essas lesões, oriundas da fase inicial da infecção, correspondem a formação de protuberância, chamadas urédias (estruturas de reprodução do fungo), que se apresentam como pequenas saliências na lesão e aparecem predominantemente na parte abaxial do folíolo, mas não impede de surgir na superfície superior (ALMEIDA *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Garcés (2012) revelou que para formar uma urédia, são necessários 556 uredósporos e a lesão, 909 uredóporos. É comum as primeiras lesões aparecerem na base do folíolo perto do pecíolo e das nervuras da folha. Possivelmente esta região do folíolo acumula a umidade por mais tempo e proporciona condições propícias à infecção. As lesões não aumentam abruptamente (2-5 mm de diâmetro), porém crescem em número com o progresso da doença (RUPE, 2008), sendo possível ver a olho nu. As urédias vão adquirindo cor castanho clara a castanho escura e abrem-se em minúsculo poro, por onde são liberados os

uredósporos, em que inicialmente apresenta coloração hialina (cristalina), tornam-se bege e acumulam-se ao redor dos poros ou são carregados pelo vento.

De acordo com Bromfield e Hartwig (1980), conforme prossegue a esporulação, ao redor das primeiras urédias o tecido da folha adquire coloração castanho clara (lesão do tipo “TAN”) a castanho-avermelhada (lesão do tipo “reddish-brown”- RB) (Figura 2), formando lesões de fácil visualização em ambas as faces da folha.

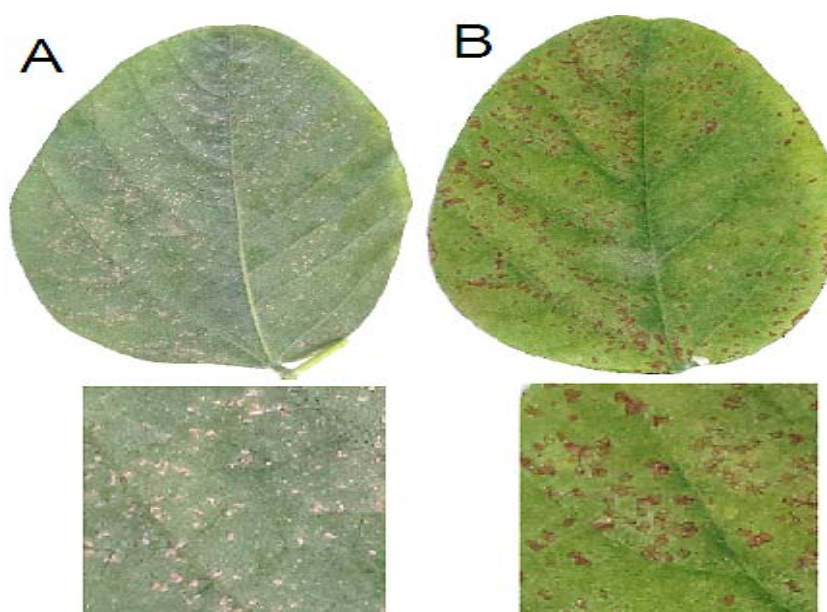


Figura 2 – Sintomas característicos do fungo *Phakopsora pachyrhizi* na face abaxial de folha de soja. (A) Lesões castanho-clara (TAN); (B) Lesões castanho-avermelhada (RB). Foto: Alessandra Yokoyama, 2014.

O estágio final da doença caracteriza-se pelo amarelecimento das folhas com intensa desfolha precoce, e conseqüentemente, comprometem a formação e o enchimento de vagens, reduzindo o peso final dos grãos. Os casos de ataques severos da ferrugem asiática assemelham-se com lavouras dessecadas com herbicidas, resultando em abortamento de flores e vagens e deficiência na granação. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, conseqüentemente, maior a redução do rendimento e da qualidade (YANG *et al.*, 1991).

3.1.3 Ciclo de vida

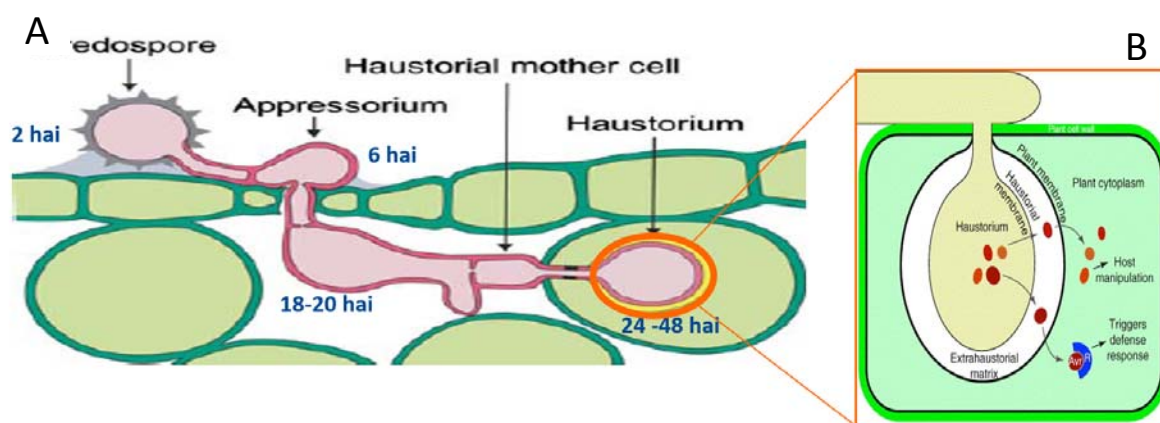
O ciclo de vida dos fungos de ferrugens tende a ser complexo envolvendo diferentes tipos de esporos especializados para cada hospedeiro, porém, o ciclo biológico do fungo *Phakopsora pachyrhizi* é simples, apresentando apenas os estádios de urédia e télia (ONO *et al.*, 1992). A fase uredinial é considerada a mais importante para a epidemiologia da doença, devido à grande quantidade de esporos formados, proporcionando novas infecções, ao contrário da fase de télia, que forma esporos especializados para sobrevivência do fungo em épocas em que as condições climáticas não são favoráveis ao seu desenvolvimento (CARMONA e GALLY, 2005). A germinação dos teliosporos, com formação de basidiósporos, tem sido observada em condições de laboratório, todavia, o seu papel no ciclo de infecção de *P. pachyrhizi* é desconhecido (SAKSIRIRA e HOPE, 1991).

O ciclo de vida de *P. pachyrhizi* inicia-se com uredósporos, provindos de urédias, que atingem as folhas de soja na face superior ou inferior. Os uredósporos medem aproximadamente 23 µm de comprimento e 18 µm de largura, são ovóides, com paredes de 1 µm de espessura e densamente equinulados, hialinos, amarelos ou marrom-claros.

Sob condições apropriadas, temperatura entre 18 e 26°C e período mínimo de molhamento foliar de 6 horas, os uredósporos germinam duas horas pós-inoculação (hpi) produzindo um tubo germinativo com até 185 µm (KOCH e HOPPE, 1987), capaz de penetrar nos tecidos foliares diretamente pela epiderme intacta (ZAMBOLIN, 2006). Após duas a cinco hpi, o tubo germinativo desenvolve em sua extremidade, o apressório, uma estrutura globosa por onde forma um cone apressorial em forma de funil que une com parede celular da hifa de penetração formada dentro da célula epidérmica (BROMFIELD, 1984). A hifa de penetração cresce através da célula epidérmica e atinge o espaço intercelular, sendo separada da hifa primária que emerge por um septo. A hifa primária se ramifica formando hifas secundárias que formam as células mãe do haustório nos locais de contato com células do mesófilo (Figura 3). No período de 24-48 hpi, tais células são invadidas pelas células mãe do haustório que se diferenciam dando origem ao haustório (KOCH *et al.*, 1983). Essa estrutura constitui o sítio de absorção de nutrientes vindo do hospedeiro e é determinante para a fase biotrófica da infecção. Além disso, a partir dessa estrutura é possível contatar a interação do fitopatógeno com o hospedeiro onde se define uma resposta de suscetibilidade ou resistência. Nesse momento, o haustório secreta moléculas denominadas efetoras, que podem alterar a estrutura e a função da célula hospedeira, ou seja, podem manipular e/ou suprimir a resposta de resistência, ocasionando uma interação compatível e, conseqüentemente, a suscetibilidade. Adicionalmente genótipos contendo receptores (genes R) capazes de reconhecer essas moléculas, neste

caso denominadas proteínas de avirulência (Avr), ativam a resposta de defesa, que ocasiona a reação de incompatibilidade e resulta na resistência da planta (JONES e DANGL, 2006).

As lesões com urédias podem surgir após cinco a oito dias a partir da infecção, e depois de 4 semanas haverá toda a produção de urédias oriundos do inóculo primário. A geração de novos uredósporos pode ser produzida de nove a dez dias pós inoculação durante três semanas, o que caracteriza a doença como policíclica (MILES *et al.*,



2005).

Figura 3 - Estágios de desenvolvimento durante interação *P. pachyrhizi* e planta hospedeira. A) Os uredósporos germinam após duas horas após inoculação (hai) dando origem ao tubo germinativo que desenvolve um apressório. No seu interior ocorre a formação da hifa, em seguida, a célula mãe do haustório, a partir da qual o patógeno invade a célula do mesófilo formando o primeiro haustório estabelecendo a interação com o hospedeiro. B) Haustório secretando moléculas efetoras no interior da célula hospedeira. As proteínas efetoras que são reconhecidas pelas proteínas de resistência (R) são proteínas de avirulência (Avr) e as proteínas efetoras que manipularam as respostas de defesa são as proteínas de virulência. Adaptado de CATANZARITI *et al.*, 2007.

3.1.4 Variabilidade patogênica do fungo

Termos como raças, tipos de virulência, patótipos e agressividade têm sido utilizados para descrever a variabilidade do patógeno. Uma raça fisiológica é definida como uma população onde todos os indivíduos têm a mesma combinação de genes de virulência (PARLEVLIET, 1985). Isto tem sido determinado com base em reações induzidas em um conjunto de genótipos diferenciadores contendo genes de resistência específicos. A virulência é definida como a capacidade genética de uma raça de um patógeno em superar a resistência geneticamente determinada do hospedeiro, o qual é eficaz contra outras raças de patógenos, e causar uma interação (doença) compatível. Por último, agressividade é uma medida quantitativa da avaliação do grau de dano de acolhimento e/ou multiplicação do patógeno (SHANER *et al.*, 1992).

Devido à ausência da reprodução sexual, a variabilidade genética e consequentemente patogênica dos fungos da ferrugem deveria ser limitada, no entanto a variabilidade observada é considerável, incluindo o fungo *P. pachyrhizi*.

Em 1966, raças fisiológicas de *P. pachyrhizi* foram descritas pela primeira vez, quando um conjunto de nove isolados foi inoculado em seis genótipos de soja e cinco acessos de leguminosas. As reações dos nove isolados foram semelhantes em todos os seis genótipos de soja, mas seis patótipos foram identificados com base em suas reações sobre os acessos de leguminosas (LIN, 1966).

O primeiro exemplo de diversidade de virulência em cultivares de soja foi descrito na Austrália por McLean e Byth (1976), em que um isolado apresentou-se virulento na cultivar Willians, mas avirulento na adesão PI 200492, enquanto a segunda raça foi virulenta em ambos os genótipos de soja.

Em 1980, três raças fisiológicas foram identificadas a partir da análise de isolados provenientes da Austrália, Índia, Taiwan e Porto Rico. Uma raça identificada em um isolado de Porto Rico, que apresentava uma limitada virulência, a segunda raça compreendia o isolado de Taiwan e a terceira representada pelo isolado proveniente da Índia. O isolado da Austrália foi caracterizado como uma mistura de pelo menos duas raças (BROMFIELD *et al.*, 1980). Em 1983, três raças de *P. pachyrhizi* foram identificadas em plantas de soja coletadas em cinco regiões de Taiwan (YEH, 1983).

Desde 2000, 18 raças foram identificados a partir de 45 isolados coletados do Japão (YAMAOKA *et al.*, 2002), seis patótipos foram estabelecidos a partir de doze isolados de África, Ásia, América do Sul, Havaí e Porto Rico (BONDE *et al.*, 2006), oito patótipos identificados a partir de dez isolados da Ásia, África e América (PHAM *et al.*, 2009), e sete patótipos encontrados a partir de 116 isolados nigerianos (TWIZEYIMANA *et al.*, 2009).

No Brasil, pouco tempo depois da primeira detecção do fungo, sua elevada variabilidade genética e capacidade adaptativa foi observada. De acordo com Yorinori *et al* (2004), no ano de 2002, diversas cultivares comerciais mostraram se resistentes/tolerantes em 2002, contudo, no ano seguinte, todas essas cultivares tornaram-se altamente suscetíveis. A virulência da raça que afetou a soja em 2001 e 2002 ("raça 2002") foi menor quando comparada com a "raça 2003". Além disso, nenhum dos quatro genes dominantes a FAS, *Rpp1* a *Rpp4*, resistiu à raça ocorrida em 2003.

Duas populações do Brasil (BRP-1 e BRP-2) foram comparadas com uma população do Japão (JRP) em um grupo de 13 genótipos de soja provenientes de um banco de genes da Embrapa Soja. As populações do Brasil diferiram entre si quanto a virulência e

em relação à população do Japão, indicando que as populações brasileiras podem apresentar uma alta e variada virulência em relação à população do Japão. O número de variedades ou genes resistentes úteis em ambos os países parece ser limitado. Dessa forma, o desenvolvimento de uma cultivar efetiva contra a ferrugem da soja deveria ser desenvolvida através da piramidação de genes de resistência e pela introdução de resistência horizontal (YAMANAKA *et al.*, 2010).

Akamatsu *et al* (2013) avaliaram 59 populações do fungo *P. pachyrhizi*, coletadas nas safras (2007/2008-2009/2010) no Brasil, Argentina e Paraguai. Dentre todas as populações, somente duas do Paraguai mostraram um perfil de patogenicidade idênticos. A comparação da patogenicidade das populações revelou variação patogênica substancial nas populações de *P. pachyrhizi* da América do Sul. Além da variação geográfica dos patógenos nos três países, a patogenicidade de populações de ferrugem com a mesma origem geográfica variou entre as três safras.

Recentemente, seis raças foram identificadas em cultivares de soja e quatro raças em kudzu, no total de 26 isolados de *Phakopsora pachyrhizi*, dos quais foram coletados em três regiões do Japão. As raças 1, 2, 4 e 5 obtiveram mais isolados comparado com as raças 3 e 6 (YAMAOKA *et al.*, 2014).

Os fungos fitopatogênicos possuem vários mecanismos através dos quais a variabilidade genética pode ser gerada, incluindo recombinação sexual, migração, mutação e hibridação somática (MCDONALD *et al.*, 1989; BURDON e SILK 1997). Já em *Phakopsora pachyrhizi*, os possíveis mecanismos que podem ocasionar a variabilidade genética são a mutação, hibridação somática e a migração (TWIZEYIMANA *et al.*, 2011).

O nível que a mutação contribui para a diversidade das populações é afetado pela taxa de mutação e tamanho da população do patógeno (BURDON, 1993). Além disso, outros eventos mutacionais como a instabilidade cromossômica, inserções ou transposições de sequências, que por sua vez podem ter efeitos sobre a variabilidade fenotípica de patógenos (ZOLAN, 1995). Outro fator que pode ocasionar a variabilidade genética é a hibridação somática, a qual 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, 1956).

Em ferrugens, a anastomose de hifas foi relatada em *Puccinia graminis* (MANNERS e BAMPTON, 1957), *P. recondita* (BARR *et al.*, 1964), *P. 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) relatou pela primeira vez a anastomose de tubos germinativos e hifas, e migração nuclear em *P. pachyrhizi*, sugerindo que o ciclo parassexual poderia explicar a diversidade genética encontrada entre as populações do fungo.

3.2 Interação molecular planta-patógeno

3.2.1 Sistema imune da planta: PTI e ETI

Em geral, patógenos desenvolvem um complexo molecular para penetrar e colonizar os tecidos da planta hospedeira (STERGIOPOULOS e DE WIT, 2009). No entanto, durante o processo de coevolução, as plantas desenvolveram um sistema imune, constituído por duas linhas de defesa, capaz de detectar as atividades do patógeno e ativar respostas de defesa.

A primeira atua antes da invasão da célula pelo patógeno, ou seja, numa etapa extracelular na interação planta-patógeno, em que proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) e ativam a imunidade desencadeada por PAMPs, denominada PTI (*PAMP Triggered Immunity*), evitando a colonização do hospedeiro (STERGIOPOULOS e DE WIT, 2009). Trata-se de uma defesa basal que reconhece moléculas altamente conservadas que normalmente possuem funções estruturais ou enzimáticas fundamentais para o desenvolvimento do micro-organismo, como proteínas bacterianas abundantes, fatores de alongamento Tu (EF-Tu), componentes de flagelina e da parede celular dos fungos, como polissacarídeos e quitina (NEWMAN *et al.*, 2013; WIN *et al.*, 2012).

Enquanto PTI previne a colonização de plantas por patógenos não especializados, proteínas efetoras produzidas por organismos patogênicos adaptados, são capazes de *suplantar* a defesa basal das plantas, contribuindo para a virulência do patógeno. A resistência do hospedeiro por patógenos adaptados é alcançada no momento do reconhecimento específico de efetores (proteínas de avirulência) por proteínas R, e correspondem a um segundo nível de resposta imune conhecida como imunidade desencadeada por efetores (ETI – *Effector Triggered Immunity*) (JONES e DANGL 2006).

Após o reconhecimento do patógeno, a planta desencadeia vários mecanismos de defesa que podem agir diretamente sobre o patógeno ou podem desempenhar um papel

na sinalização para promover a defesa. Estes mecanismos incluem a ativação de cascatas de sinalização celular mediada pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fatores de transcrição, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TORRES *et al.*, 2006) e na resposta de hipersensibilidade (HR), a qual ativa a sinalização do ácido salicílico (SA), levando a resistência sistêmica adquirida (SAR). A resposta sistêmica adquirida (SAR) pode acarretar no acúmulo de compostos relacionados a defesa em tecidos sadios, além disso, representa proteção por um determinado período do ciclo de vida da planta (HAMMERSCHMIDT, 2009).

Muitos componentes de sinalização são compartilhados entre PTI e ETI, incluindo estresse oxidativo e alterações nos níveis hormonais de plantas. Entretanto, as respostas via ETI e PTI são tipicamente diferentes, com a resposta da ETI sendo eficiente contra patógenos especializados e, geralmente mais rápida e duradoura do que a observada na PTI (JONES e DANGL, 2006; TSUDA E KATAGIRI, 2010).

3.2.2 Proteínas Efetoras de Uredinales

Os efetores secretados a partir de agentes patogênicos podem agir no apoplasto ou no citoplasma por vários mecanismos que ocultam a presença de PAMPs ou interfere diretamente na sinalização PTI (JONES e DANGL, 2006). Entre as proteínas efetoras apoplásticas identificadas, destacam-se aquelas com funções de degradação da parede celular do hospedeiro, inibidores de enzimas defensivas da planta, como proteases, proteinases, lipases, proteínas pequenas ricas em cisteínas, entre outros. Por exemplo, pode-se citar o grupo de genes *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* e *Avr9* que codificam pequenas proteínas ricas em cisteínas, secretadas durante a infecção de tomate por *Cladosporium fulvum* (STERGIOPOLOUS e DE WIT, 2009). O aminoácido cisteína proporciona estabilidade à proteína pela formação de pontes dissulfeto (LUDERER *et al.*, 2002). Outro efector apoplástico encontrado em fungo é o *Pep1* de *Ustilago maydis* (DOEHLEMANN *et al.*, 2009). Até o momento, não há exemplos bem caracterizados de efetores apoplásticos em fungos de ferrugem (DE CARVALHO *et al.*, 2016).

Em oomicetos, os efetores citoplasmáticos possuem um domínio N-terminal, que contém motivos comuns, tais como RxLR (Arg-X-Leu-Arg), LxLFLAK ou CRN (motivo Crinkler) e CHxC (JIANG *et al.*, 2008). O motivo RxLR N-terminal, juntamente com um *downstream* DEER (Asp-Glu-Glu-Arg) da proteína efectora *Avr3a* de *Phytophthora infestans* demonstrou ser necessário para a translocação em células de batata (KALE *et al.*, 2010; BOS *et al.*, 2010), porém, para a secreção do efector a partir do haustório, o motivo RxLR não é essencial (WHISSON *et al.*, 2007).

Ainda não foi determinado o papel definitivo da virulência dos efetores de ferrugens, no entanto, poucas proteínas são conhecidas por serem transferidas para o interior da célula hospedeira e algumas são reconhecidas pelos genes R citoplasmáticos. Por exemplo, em *Melampsora lini*, os genes Avr dos efetores AvrL567, AvrM, AvrP123 e AvrP4 foram clonados e codificaram proteínas que, ao serem expressas transientemente em plantas de linho contendo o gene R citoplasmático compatível, induziram a resposta de hipersensibilidade (HR), indicando a sua translocação para o citoplasma (STERGIOPOULOS e DE WIT, 2009).

Compreender e identificar proteínas que constituem o secretoma de ferrugens é relevante na identificação de seus complementos de proteínas efetoras (DE CARVALHO *et al.*, 2016). A abordagem básica utilizada para estudar os putativos efetores é o “sequenciamento profundo” e a montagem do genoma ou transcriptoma seguido por análise comparativa das famílias de genes candidatos a efetores (DUPLESSIS *et al.*, 2011b; XU *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2011).

Saunders *et al.* (2012), por meio de análises *in silico* a partir do genoma de dois fungos patogênicos de ferrugem *Puccinia graminis f. sp. tritici* e *Melampsora larici-populina*, identificaram oito famílias de candidatos efetores. Como resultado, obtiveram um conjunto diverso de candidatos efetores, incluindo famílias de proteínas secretadas expressas a partir do haustório e proteínas pequenas ricas em cisteína.

Link *et al.* (2014) avaliaram o transcriptoma e o secretoma do haustório de *P. pachyrhizi* e *Uromyces appendiculatus*, em que incluíram sequências ESTs (*Expressed Sequence Tags*) já disponíveis a partir de esporos, esporos germinados, apressório e urédia. (POSADA-BUITRAGO e FREDERICK, 2005; TREMBLAY *et al.*, 2009; STONE *et al.*, 2012). No entanto, esses trabalhos não forneceram uma caracterização completa do secretoma de efetores ou mecanismos moleculares que facilitam a invasão do hospedeiro por *P. pachyrhizi*.

Recentemente, De De Carvalho *et al.* (2016), em busca de candidatos a efetores realizaram um estudo do transcriptoma *in planta* da interação entre soja e *P. pachyrhizi*, baseada na técnica de RNA-seq obtido de amostras de RNA pela técnica de microdissecção a laser da lesão. De 36,350 mil ESTs preditas do fungo, análises *in silico* possibilitaram a identificação de 851 proteínas potencialmente secretadas, que foram distribuídas em famílias de genes com características de efetores putativos. Tais características basearam-se no seu tamanho reduzido (<300 aminoácidos), conteúdo de cisteína, e ausência de domínios PFAM (exceto aqueles associados a patogenicidade), além de serem fortemente expressas na planta em momentos específicos durante a infecção. A análise comparativa

destas proteínas secretadas preditas com as demais previamente descritas em espécies de Pucciniales, permitiu a identificação de 33 famílias específicas de *P. pachyrhizi*. De todas as famílias definidas, De Carvalho e seus colaboradores focaram em 13 que continham características consistentes com função de putativo efetor, e destacaram as famílias 1, 2 e 3. Além disso, foi realizado uma análise funcional em *Nicotiana benthamiana* dos membros de duas famílias mais promissoras de *P. pachyrhizi* de candidatos a efetores confirmados nas predições *in silico*, sugerindo que o fungo codifica potenciais proteínas efetoras do fungo com a habilidade de suprimir a resposta de defesa da planta.

3.1.3. Co-evolução entre fatores de avirulência-genes R e modelos evolutivos

Proteínas efetoras capazes de serem reconhecidas por genes R específicos são definidas como proteínas de avirulência. A correspondência entre um fator de avirulência do patógeno com um gene R cognato foi descrita inicialmente no patossistema de *M. lini*-linho, por Flor (1956), em que o produto do gene R da planta hospedeira reconhece um efetor Avr (avirulento) produzido pelo patógeno que gera uma reação de resistência ou incompatibilidade. Se o patógeno não for detectado, como resultado de uma variação alélica ou a falta de um dos dois componentes, uma reação suscetível ou compatível será observada. Curiosamente, os patógenos desenvolvem novos efetores para manter ou melhorar a sua capacidade de causar doença e para minimizar a detecção por um hospedeiro. Ao mesmo tempo, as plantas também são forçadas a manter a resistência a doenças e melhorar a sua capacidade de detectar efetores de patógenos através do desenvolvimento de novas variações alélicas dos genes R. A evolução entre efetores e proteínas R, de patógenos e plantas, respectivamente, é descrito como uma "corrida armamentista" co-evolucionária (JONES E DANGL, 2006; DODDS E RATHJEN, 2010; TYLER E ROUXEL, 2013).

Jones e Dangl (2006) propuseram o modelo zigue-zague, o qual sugere a existência de quatro fases. A primeira, utiliza proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática de células vegetais (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) desencadeando uma resposta de imunidade (PTI). Em seguida, os patógenos capazes de suplantar a defesa basal das plantas, liberam efetores que suprimem PTI, desencadeando a susceptibilidade por efetores (ETS). Na terceira fase, a planta desencadeia um sistema especializado de defesa baseado no reconhecimento direto ou indireto de efetores pelas proteínas codificadas por genes R, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI). Por último, a seleção natural impulsiona patógenos a evitarem a resposta ETI, por exemplo, pela diversificação do gene efetor reconhecido, ou através da aquisição de novos efetores que suprimem ETI. A seleção por parte do

hospedeiro de novos alelos de proteínas R, que podem reconhecer um dos efetores recém adquiridos, direciona novamente a ETI.

Um segundo modelo de reconhecimento é conhecido como “modelo guarda”, que propõe a interação indireta de uma proteína R com o produto do gene Avr (STERGIOPOULOS e DE WIT, 2009). Conforme este modelo, as proteínas R monitoram a presença e modificações de outra proteína do hospedeiro, que pode ser alvo dos efetores do patógeno. Por exemplo, o reconhecimento indireto entre as proteínas Avr2/Cf-2 de *Cladosporium fulvum* e tomate, respectivamente, ocorre quando a proteína Cf-2 está presente na planta e o reconhecimento da proteína Avr2 é mediado por uma proteína alvo Rcr-3. O complexo Rcr-3/Avr2 permite que Cf-2 desencadeie a resposta de defesa (ROONEY *et al.*, 2005; STERGIOPOULOS e DE WIT, 2009).

Outro modelo já descrito, é o *decoy*, onde proteínas específicas, similares aquelas que podem ser alvos de efetores patogênicos, são produzidas pela planta em algumas interações planta-patógeno. A função dessas proteínas decoy é se ligar aos efetores e mediar as interações dos mesmos com proteínas R (VAN DER HOORN *et al.*, 2008). Por exemplo, uma proteína efetora AvrPto de *Pseudomonas syringae* infecta *Arabidopsis*, mas provoca uma resposta de resistência em plantas de tomateiro que transporta duas proteínas de resistência, Pto e Prf, que em associação, reconhece a bactéria e desencadeia uma forte resposta de resistência (XIANG *et al.*, 2008).

3.3 Variabilidade genética de efetores

Os efetores por estarem sob pressão seletiva positiva tendem a apresentar alto nível de polimorfismo com elevado índice de substituições não sinônimas levando a uma elevada variabilidade genética (CANTU *et al.*, 2013; PEDERSEN *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2012, SPERSCHNEIDER *et al.*, 2014). Isso ocorre devido a evolução dos patógenos em decorrência ao estabelecimento de mecanismos distintos para escapar do reconhecimento de seus efetores por sistemas de defesa do hospedeiro.

Em oomicetos, diversas publicações relatam a ocorrência de polimorfismos nos genes de avirulência, os quais são reconhecidos por genes de resistência do hospedeiro.

O oomiceto *Phytophthora infestans* representa uma ameaça para a produção de batata e é um dos patógenos mais devastadores de dicotiledôneas. No entanto, pouco se sabe sobre as bases moleculares de patogenicidade ou o tipo de molécula de avirulência reconhecida pelo hospedeiro. Alelos de resistência a doenças, ou seja, produtos que reconhecem moléculas de avirulência correspondente ao agente patogênico foram introgrididos em batata cultivada a partir de uma espécie selvagem, *Solanum demissum*,

gerando a identificação de R1 e R3a. 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 alterarem a sequência de aminoácidos na proteína expressa e conseqüentemente não suprimiram a resposta de defesa, ou seja, o gene de resistência não reconheceu a sequência do gene avr3a. 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. Além disso, a expressão de Avr3a foi detectada em fases pré-infeccional como também no momento da infecção (ARMSTRONG *et al.*, 2005).

Em 2005, Rehmany e colaboradores utilizaram isolados de *Hyaloperonospora parasítica* que infectam *Arabidopsis thaliana* para analisar a interação entre planta-hospedeiro. Foi estabelecido que os genes RPP (Reconhecimento para *Peronospora parasítica*) detectam produtos de genes de avirulência ATR (*Arabidopsis thaliana* - recognised). Dois acessos nos locos Rpp1 foram descritos, o gene funcional Nd-1 e o Ws-0, sendo este em adesão a quatro genes (Rpp1-WsA; Rpp1-WsB; Rpp1-WsC e Rpp1-WsD). O gene de avirulência ATR1Nd, detectado pelo gene de resistência Rpp-Nd-1 foi utilizado para análise de polimorfismo de oito isolados de *H. parasítica*. Desses oito, cinco isolados diferiram entre si, apresentando seis diferentes alelos que codificaram proteínas com altos níveis de polimorfismo no aminoácido. Curiosamente, isolados avirulentos com Rpp1-Nd tinham seqüências de DNA idênticas, enquanto os isolados virulentos apresentaram seqüências de DNA altamente divergentes dentro das ORFs. A denominação do gene ATR1Nd foi renomeada para ATR1NdWsB pelo reconhecimento dos alelos de ATRNd por Rpp1-WsB. Na análise do perfil de expressão verificou que o gene ATR^{NdWsB} foi expresso para todos os isolados.

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

Stergiopoulos *et al.* (2014) analisaram a variação alélica dentro de quatro genes efetores (MfAvr4, MfEcp2, MfEcp2-2 e MfEcp2-3) do ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* em

uma população global do agente patogênico, e verificaram o seu impacto sobre o reconhecimento por genes de resistência Cf-4 e Cf-ECP2 de tomate. Os autores identificaram um grande número de polimorfismos que pode refletir uma corrida armamentista co-evolutiva entre o hospedeiro e o patógeno, sugerindo que tanto a seleção positiva quanto a recombinação intragênica moldaram a evolução de efetores de *M. fijiensis*.

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 de duas variedades de trigo (CANTU *et al.*, 2013).

Estes estudos auxiliam o entendimento de como a seleção pode influenciar evolutivamente alterações específicas que conduzem para a diversificação de efetores que promovem a virulência (SELIN *et al.*, 2016).

3.4 Modelos evolutivos

A co-evolução desencadeia uma corrida armamentista, de modo que a ocorrência de pressões seletivas recorrentes favorece novas resistências e alelos de virulência para o hospedeiro e patógeno, respectivamente (AGUILETA *et al.*, 2009).

Com o progresso tecnológico e metodológico, foi permitido a detecção de seleção diretamente sobre os genes. Por exemplo, os genes que assumem serem importantes na co-evolução patógeno-hospedeiro pode ser amplificado, sequenciado e analisado por métodos eficientes para verificar se eles são realmente alvos de seleção, quais forças evolutivas estão exercendo (por exemplo, equilíbrio de seleção ou pressão seletiva), que força de seleção está operando e se a seleção vem atuando desde o passado ou mais recentemente (NIELSEN, 2005; TENAILLON E TIFFIN, 2007).

Os métodos mais sensíveis de detecção de seleção natural usam a razão entre o número de substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimo (dN) e o número de substituições sinônimas por sítio sinônimo (dS). Nos casos onde as substituições não-sinônimas enfrentam restrições funcional-estruturais temos $dN < dS$ (seleção negativa ou purificadora). Por outro lado, na presença de seleção positiva (ou diversificadora) temos $dN > dS$. O regime de seleção é determinado pela razão entre dN / dS (ω). Ou seja: $\omega > 1$ para seleção positiva, $\omega < 1$ para seleção negativa ou purificadora e $\omega = 1$ para um regime neutro de substituições (LEAL, 2004).

Um dos métodos para detectar dN e dS é através da contagem par a par, feito pela contagem de dN e dS ao longo das sequencias, que são comparadas par a par em um

alinhamento composto por n sequências de DNA do mesmo comprimento, método Nei-Gojobori (NEI e KUMAR, 2000). Tal método, dN e dS são estimados pela contagem do número total de substituições sinônimas (S) e não-sinônimas (N) e pelo número de sítios potencialmente sinônimos (s) e potencialmente não-sinônimos (n). Estes valores são computados para cada códon sob a premissa de que as mudanças de nucleotídeos têm a mesma probabilidade (modelo de Jukes-Cantor) (LEAL, 2004).

Os primeiros modelos de códons que foram além das comparações em pares da razão dN / dS (também chamada ω) e foram aplicáveis a alinhamentos de sequências múltiplas foram os métodos de máxima verossimilhança desenvolvidos por Goldman e Yang (1994) e Muse e Gaut (1994). Estes modelos permitem a estimativa de parâmetros importantes que levam em conta a complexidade do processo de substituição de códons. Eles também têm a vantagem de calcular a média de todos os possíveis estados de códons em nós internos, em vez de exigir a inferência de estados ancestrais. Diferentes modelos assumem uma distribuição específica de ω , descrita por uma distribuição estatística. Os parâmetros são estimados nos modelos escolhidos maximizando a função de verossimilhança (AGUILETA et al., 2009). Dentre os vários modelos, algumas distribuições estatísticas foram descritas:

- M8

O modelo permite a seleção positiva operando sobre a proteína. Uma proporção p_0 dos sítios é extraída de uma distribuição beta (que é definida no intervalo $[0,1]$), e uma proporção p_1 ($= 1-p_0$) dos sítios são extraídas de uma categoria adicional ω_s (limitada para ser ≥ 1). Assim, os locais extraídos da distribuição beta são locais que experimentam a seleção de purificação, enquanto que os locais extraídos da categoria ω_s são locais que experimentam seleção neutra ou positiva. Tanto p_0 quanto ω_s são estimados usando *Maximum Likelihood* (ML) (YANG et al. 2000).

- M8a

Este modelo é essencialmente semelhante ao modelo M8, exceto pelo fato de que ele não permite a seleção positiva ao definir $\omega_s = 1$. Assim, somente a seleção neutra e purificadora são permitidas aqui. O modelo M8a está aninhado no modelo M8: se sob o modelo M8 ω_s é estimado como sendo 1, obtemos o modelo M8a. Isso permite o teste de hipóteses através da realização de um teste de razão de verossimilhança entre os dois modelos para ver qual modelo se ajusta melhor aos dados (SWANSON et al. 2003).

- M7

Novamente, este modelo é semelhante ao M8, exceto pelo fato de que ele assume apenas uma distribuição beta sem categoria adicional. Assim, permite principalmente a purificação da seleção na proteína. O modelo M7 está aninhado no modelo M8: se p_0 é estimado como sendo 1, o modelo M8 colapsa para o modelo M7 (YANG et al., 2000).

- M5

Este modelo supõe que dN/dS entre os sítios são gama distribuídos. Em oposição à distribuição beta, a distribuição gama não é restrita e, portanto, pode permitir a seleção purificadora, neutra e positiva. No entanto, a desvantagem do modelo é que sob uma categorização discreta da distribuição é possível não obter nenhuma categoria de seleção positiva, embora a seleção positiva esteja operando na proteína (YANG *et al.*, 2000).

- MEC

O modelo MEC é essencialmente diferente de todos os modelos acima descritos, em que é o único modelo que leva em consideração as diferentes probabilidades de substituição de aminoácidos. Este modelo expande uma matriz de probabilidade de substituição de 20 por 20 aminoácidos, numa matriz de probabilidades de 61 por 61 códons de sentido. A taxa de transição (tr) e a taxa de transversão (tv) são parâmetros integrados na matriz. As diferentes forças de seleção e as suas intensidades, todas as substituições não sinônimas na matriz são multiplicadas por ω (para as quais é assumida uma distribuição anterior de gama). Uma vez que as matrizes de probabilidade de substituição assumem, inerentemente, a seleção, o modelo MEC assume outro parâmetro (denotado como f) que representa a proporção de locais que não sofrem seleção. Sob o modelo MEC, uma posição com substituições radicais irá obter um valor dN maior do que uma posição com modificações moderadas (DORON-FAIGENBOIM e PUPKO, 2006).

O modelo indicado pelo teste de razão de verossimilhança é o LRT (*Likelihood Ratio Test*). O teste é utilizado para comparar dois modelos concorrentes e aninhados. Um é o modelo nulo que não assume seleção ($\omega \leq 1$) e o outro é o modelo alternativo que permite a seleção positiva (onde ω pode ser > 1). Os LRTs mostraram-se precisos em simulações (ANISIMOVA *et al.*, 2001). No entanto, depende da divergência de sequência dos dados e do tamanho da amostra, além disso, pode ser conservador se não houver divergência suficiente no alinhamento da sequência. Os LRTs avaliam se um modelo que supõe uma seleção positiva encaixa melhor os dados do que um modelo nulo sem seleção positiva, mas não detecta locais específicos sujeitos a uma taxa aumentada de substituições não sinônimas.

O método bayesiano pode ser empregado para inferir quais sítios no alinhamento estão sob seleção positiva. Tal método é utilizado para calcular a probabilidade posterior de que cada sítio pertence a uma determinada classe ω . Um local com probabilidade posterior ($\geq 0,95$) de pertencer à classe de sítios com $\omega > 1$ tem uma alta probabilidade de estar sob seleção positiva. Para conjuntos de dados com sequências muito semelhantes e de evolução lenta, a análise bayesiana pode perder o poder de detectar quais locais estão sob seleção (ANISIMOVA *et al.*, 2002).

4. Material e Métodos

4.1 Material Biológico e Seleção dos candidatos efetores

Foram utilizados três isolados monouredinais obtidos por Darben (2013) a partir de amostras coletadas em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil e em diferentes anos. O critério de seleção dos isolados foi a partir de diferentes haplótipos identificados nas regiões de ITS1, além de apresentarem diferentes perfis de virulência (Tabela 1 e 2). Os isolados diferiram em sua virulência nos genótipos diferenciadores de soja *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp5* e *Rpp6*, entretanto, apresentaram um genótipo suscetível em comum, o *Rpp1* (Tabela 2).

Tabela 1 – Relação dos isolados com seus respectivos códigos, anos e locais de coleta, e o perfil de virulência na soja.

Código Isolado	Ano da coleta	Local	Perfil de virulência na soja	Haplótipo ITS1
L.L.LD5511	2011	Londrina-PR	Rpp1, Rpp2, Rpp3, Rpp5	8
L.UB112	2012	Uberlândia-MG	Rpp1, Rpp5, Rpp6	4
L.CV107	2007	Campo Verde-MT	Rpp1	12

Tabela 2 – Reações de Suscetibilidade (+), Resistência (-) e Intermediária (+/-) dos 3 isolados de *P. pachyrhizi* em 13 genótipos diferenciadores de soja (Darben, 2013).

Genótipos Diferenciadores de soja	Isolado		
	L.UB112	L.L.LD5511	L.CV107
PI 200492 Rpp1	+	+	+
PI 561356 Rpp1b	-	-	-
PI 230970 Rpp2	-	+	+/-
PI 462312 Rpp3	-	+	-
PI 459025 Rpp4	-	-	-
PI 200526 Rpp5	+	+	-
PI 567102B Rpp6	+	+/-	-
BRS 184	+	+	+

4.2 Extração do DNA genômico

Para extração do DNA genômico, foram pesados aproximadamente 5 mg de esporos de cada isolado em microtubos de 2,0 ml e foram adicionadas duas esferas (*beads*) dentro de cada microtubo. A fim de romper a parede celular do esporo, os microtubos contendo os esporos foram mergulhados no nitrogênio (N₂) líquido e em seguida submetidos ao vórtex. Esse procedimento foi realizado alternadamente durante dez minutos. A extração foi baseada pelo protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983), com modificações. Após a quebra mecânica da parede do esporo, foram adicionados 500 µL de tampão de extração (SDS10%; Tris-HCl 1M pH8,0; NaCl 5M; EDTA 0,5M e 1%de -mercaptoetanol) seguida de incubação em banho-maria a 65 °C por 60 minutos, invertendo-se os tubos a cada 15 minutos durante este período.

Posteriormente, 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 a 6.000 rpm por 15 minutos e a fase *superior* foi transferida para um novo microtubo.

Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de ½ volume de acetato de sódio 3M e 1 volume de isopropanol gelado. As amostras permaneceram por 2 horas a -20°C ou overnight a 4°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 500 µL de etanol 70% e as amostras centrifugadas por cinco minutos a velocidade de 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 ressuspendido em 30 µL de tampão água ultrapura, acrescida de RNase A (40 µg/mL) e incubado a 37 °C por pelo menos 30 minutos. Finalizada a extração, as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C.

Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 1% utilizando o marcador *Low DNA Mass Ladder* e o programa *LabImage 1D 2006*. Por fim, as amostras foram diluídas para se obter uma concentração final de 10 ng/µL por amostra.

4.3 Reações de amplificação

Foram utilizados sete conjuntos de *primers* dos genes candidatos a efetores para amplificar as sequências de DNA dos três isolados (Tabela 3). O desenho dos primers se baseou na sequência do transcrito obtida por De Carvalho et al, 2016.

Tabela 3 – Conjunto de *primers* dos sete candidatos efetores com a temperatura de anelamento.

Efector	Conjunto de <i>primers</i> (Foward e Reverse)	Temperatura (°C)
2238	F CACGGTGTTACTTTCAGTT R GCTGTTACCCAAGCAAAGTAG	56
1784	F CATGGACTCATCACAGGTG R CGTCACCCAAGCCAAGTAA	60
5370	F AGATTCGTAATCCCCAGATT R GCCAAACCTTGACAAATTA	54
7164	F AGACTCTCAGCTCTTAAACCAG R GCCAGACCTCCAAAATTAG	58
5381	F ATGCACGGTGTTACTTTCAGTTG R TCATTCTGACTTTTCCGTCA	60
5849	F CACGGTGTTATCACTTCAGTTGAGGG R CTAGTTTGCTTGGGAACAGCAACACATC	60
3939	F CAAGAACAGAGGTCCTGC R ATGTCAAGCTAGGTCCTAA	55

Para as reações de PCR foi utilizada a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* e amplificadas em termocicladores *Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler*. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,0% em tampão SB 1X. Para verificar o tamanho dos fragmentos obtidos, o marcador de tamanho molecular de 1 kb Plus foi utilizado como guia. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotodigitalizadas em sistema de foto documentação *L.PIX-Molecular Imaging (Loccus Biotechnology)*.

4.4 Purificação e clonagem dos produtos amplificados

Os produtos da amplificação, foram purificados com o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, o DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem *pCR®2.1-TOPO* (Invitrogen®) utilizando o *TOPO® TA Cloning® Kit* (Invitrogen®). Para isso, a reação de ligação foi preparada com o vetor, solução salina (1,2 M NaCl, 0,6 M MgCl₂), o produto purificado e água ultrapura para completar o volume final de 6 µl. A reação foi incubada em gelo por aproximadamente 16 horas.

Por choque térmico, células de *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes foram transformadas. Para cada transformação, células quimiocompetentes e a reação de ligação foram adicionadas em um microtubo. Após 30 minutos de incubação em gelo, o microtubo contendo o DNA e as células foi inserido em um termomixer a temperatura de 42 °C por 40 segundos e em seguida foi transferido para o gelo por 2 minutos. Após esse período, foi

adicionado meio SOC para neutralizar o choque térmico sofrido pela bactéria. Em seguida, as células foram incubadas em tubo Falcon em um agitador a 220 rpm durante 1 hora, a 37 °C.

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

Os clones recombinantes foram identificados pela coloração branca, em seguida, foram repicados em meio LB sólido e foram incubados em tubo Falcon contendo LB líquido e kanamicina durante 16 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 e 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 200 ng/μL, e três clones de cada isolado foram sequenciados.

4.5 Caracterização dos polimorfismos em genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*

A análise dos polimorfismos nas sequências dos genes candidatos a efetores foi conduzida com base no sequenciamento do DNA de três isolados monouredinais de ocorrência brasileira, coletados em diferentes regiões e anos (vide Material e Métodos 4.1). Além disso, foram incluídas algumas sequências do secretoma predito por De Carvalho et al (2016), bem como por Link *et al* (2014) e da patente US20140283207 Dupont (BROGLIE e RAIRDAN, 2014) (Tabela 4). As sequências dos respectivos candidatos identificados no secretoma descrito por De Carvalho et al (2016), que utilizaram 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, localizado na Alemanha), por fim, o isolado GA-05 (Georgia, 2005) da patente US20140283207 Dupont (2014). O alinhamento foi conduzido no Programa BioEdit 7.0.5.3.

Tabela 4 – Sequências do secretoma predito por De Carvalho et al (2016), Link *et al* (2016) e Dupont (2014) com as respectivas famílias.

	Código De Carvalho et al (2016)	Código Link et al, (2014)	Código Dupont (2014)	Família
1	de_novo_5370	-	-	familia_3
2	de_novo_3939	-	Dupont_144	familia_3
3	de_novo_7164	-	-	familia_3
4	de_novo_1784	-	-	familia_1
5	de_novo_2238	contig06191	Dupont_126	familia_1
6	de_novo_5381	contig06191	-	familia_1
7	de_novo_5849	contig06191	Dupont_126	familia_1

Com base nas mutações sinônimas e não sinônimas identificadas foi determinado o tipo de seleção (Purificadora ou Diversificadora) que estaria atuando sobre os candidatos a efetores. Foram utilizados dois métodos de seleção baseados no codon. O primeiro método foi o Z-teste realizado no programa MEGA 7.0 (KUMAR *et al.*, 2016), para selecionar tanto a análise par-a-par quanto a análise total dos códons. O parâmetro utilizado foi o método Nei-Gojobori (SUZUKI e GOJOBORI, 1999) modificado com o conjunto de taxa de transição/transversão sendo 1. O segundo método empregado foi o de Nielsen e Yang (NY), utilizando o servidor Selecton server (DORON-FAIGENBOIM *et al.*, 2005; STERN *et al.*, 2007. <http://selecton.tau.ac.il>) para identificar quais locais do códon estavam sob seleção diversificadora ou seleção purificadora, através da inferência Bayesiana. O modelo utilizado foi o M8 (YANG *et al.*, 2000) e quando a seleção foi positiva, o modelo M8a (SWANSON *et al.* 2003) versus modelo M8 foi aplicado como teste estatístico para seleção diversificadora.

4.6 Diversidade genética de isolados de *P. pachyrhizi* com base em polimorfismos em genes candidatos a efetores

Para estimar a diversidade genética entre os isolados de *P. pachyrhizi* com base no sequenciamento de sete sequencias de genes candidatos a efetores, o alinhamento das sequências proteicas preditas dos candidatos obtidas de 3 isolados de *P. pachyrhizi* foi realizado com auxílio do programa MEGA 7.0 (KUMAR *et al.*, 2016). Para o alinhamento foi também adicionado as sequências de candidatos efetores das famílias 1 (39 sequencias) e 3 (33 sequencias) obtidas por De Carvalho et al (2016). Tais famílias foram obtidas pela análise de clusterização de sequencias 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*; 156 proteínas haustoriais de *P. pachyrhizi* (LINK *et al.*, 2014); 1931 e 643 proteínas de *P. graminis* e *M. larici-populina* (FSD); 21 sequencias de *M. lini* (CATANZARITI *et al.*, 2006); e 851 contigs de candidatos a efetores 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 al.*, 2002).

Após a alinhamentos das sequencias, o programa MEGA 7.0 foi utilizado para gerar as árvores filogenéticas, através do método *Neighbor-Joining*. O suporte estatístico para o agrupamento filogenético foi obtido com as análises de *bootstrap*, utilizando 1000 repetições.

4.7 Análise estrutural dos genes candidatos a efetores

Os fragmentos clonados foram sequenciados e o iniciador universal M13 foi utilizado para o sequenciamento nas direções *forward* e *reverse*. Os reads, três para cada isolado, foram obtidos com o auxílio do programa BioEdit 7.0.5.3 e submetidos à edição manual para retirada das extremidades e dos introns, a fim de se obter as regiões codificadoras dos genes candidatos a efetores bem como suas respectivas sequências de resíduos de aminoácidos.

Para a identificação dos introns nas sequências do DNA dos candidatos efetores, os contigs gerados foram alinhados com as sequências de cDNA correspondentes do banco de dados de transcritos de *Phakopsora pachyrhizi* (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/phakopsora/>), bem como a busca das regiões flangeadoras 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 dos putativos efetores dos três 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 de motivos distribuídos nas sequências foram baseados em qualquer número de repetições e a seleção do número máximo de motivos que o MEME buscou foi de 10 motivos.

4.8 Perfil de expressão de genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*

4.8.1 Delineamento Experimental

Para avaliar o perfil de expressão gênica de seis candidatos efetores nos isolados monouredinais L.L.LD5511 e L.UB112 de *P. pachyrhizi*, foram desenvolvidos dois tipos de experimentos:

A- Perfil de expressão dos candidatos a efetores na ausência da planta hospedeira: Neste experimento foi avaliado o perfil de expressão dos genes candidatos a efetores em

amostras de esporos e esporos germinados, ambos obtidos de isolados monospóricos cultivados e mantidos *in vitro* em folhas destacadas de soja, sob condições de temperatura e umidade controladas em câmara climatizada. Os esporos germinados foram obtidos a partir de esporos frescos, depositados em placa de Petri contendo solução de água com adição de 0,04% de Tween, onde permaneceram *overnight* durante 16 horas, enquanto aproximadamente 50 mg de esporos foram coletados de folhas destacadas de soja e utilizados diretamente para a extração de RNA.

B – Perfil de expressão de candidatos a efetores durante o ciclo infeccioso: o experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado, onde o perfil de expressão dos seis genes candidatos a efetores foi avaliado no decorrer do ciclo infeccioso utilizando dois diferentes isolados (L.L.LD5511 e L.UB112), com perfis de virulência distintos (Vide tabela 2). Plantas do genótipo suscetível ao fungo *P. pachyrhizi* (cultivar Williams 82) foram cultivadas em vasos de plástico contendo substrato composto por terra e areia na proporção 3:1, mantidas em casa de vegetação pressurizada até atingirem o estágio V2-V3, quando foram inoculadas com o fungo. O inoculo foi preparado por meio de uma solução de água com adição de 0,04% de Tween com a concentração dos esporos a 10^4 esporos.mL⁻¹. Os isolados foram inoculados no segundo trifólio das plantas suscetíveis, e para cada experimento, folhas infectadas destas interações compatíveis foram coletadas em diferentes tempos após a inoculação (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas após a inoculação (hai) a fim de representar a progressão da infecção e colonização do tecido hospedeiro pelo fungo. Uma vez coletados, fungo e planta foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Ambos os experimentos foram constituídos por três repetições biológicas, cada uma contendo três plantas.

4.8.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada com o kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), de acordo com procedimentos do fabricante, utilizando 100 mg de amostras congeladas de tecido foliar e de 1 mg de esporos e esporos germinados. O RNA foi quantificado utilizando o Nanodrop (Uniscience) e a sua integridade foi visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Para eliminação de DNA genômico, 1µg de RNA foi tratado com DNase livre de RNase (Invitrogen). Posteriormente, foi realizado a síntese de cDNA utilizando o kit *SuperScript III First Strand* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.8.3 RT-qPCR

Para a análise de RT-qPCR, foram utilizados os *primers* para amplificação da região codante dos genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* conforme descrito por De

Carvalho *et al.* (2016). Todos os primers foram inicialmente testados por PCR convencional utilizando DNA e cDNA de soja para garantir a amplificação específica para *P. pachyrhizi*. As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento de *Real Time StepOnePlus™* (Applied Biosystems), utilizando a metodologia *SYBR green*. A eficiência dos *primers* foi calculada com base na equação $[10^{(-1/\text{slope})}] - 1$ (PFAFFL, M., 2001). Cada reação de PCR foi realizada em triplicata e a especificidade dos produtos da amplificação foi validada pela análise da curva de dissociação. Os níveis de expressão foram determinados através de quantificação relativa calculada segundo a equação $2^{-\Delta Ct}$, onde 2 equivale a soma das eficiências dos *primers* do gene de interesse e do gene normalizador, e $\Delta Ct = (Ct \text{ do gene de interesse} - Ct \text{ do gene endógeno normalizador})$. O gene endógeno beta-tubulina foi utilizado como gene normalizador (MACIEL *et al.*, 2010). As médias e o desvio padrão dos níveis de expressão foram calculados e o agrupamento hierárquico do \log_2 dos valores de Ct foi utilizado para agrupar os contigs baseados nos perfis de expressão (Cluster 3), resultando no dendograma e no heat map, dos quais foram visualizados no Tree View (EISEN *et al.*, 1998).

5. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo científico.

O artigo intitulado “Caracterização estrutural e polimorfismos de genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*” está apresentado no Anexo A, apresentado de acordo com as normas do Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Anexo C).

Referências

AGROLINK. O portal do conteúdo agropecuário. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/ferrugem.aspx>>. Acesso em: 29.abril.2016.

AGUILETA, G.; REFRÉGIER, G.; YOCKTENG, R.; FOURNIER, E.; GIRAUD, T. Rapidly evolving genes in pathogens: Methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 656–670, 2009.

AKAMATSU, H.; YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; Soares, R.M.; MOREL, W.; IVANONICH, A.J.G.; BOGADO, A.N.; KATO, M.; YORINORI, J.T.; SUENAGA, K. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of General Plant Pathology**, 79:28-40, 2013.

ALMEIDA, A. M. R., FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, E M. C.. Doenças de soja. Em: KIMATI, H., AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, E L. E. A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. Vol. 2 (4ta Ed.). Piracicaba, Livrocere. p. 376-399, 2005.

ANISIMOVA, M.; BIELAWSKI, J.P.; YANG, Z.H. Accuracy and power of Bayes prediction of amino acid sites under positive selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 950–958, 2002.

ANISIMOVA, M; BIELAWSKI, J.P; YANG, Z. Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1585-92, 2001.

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, n. 21, 2005.

BARCELLOS, F.G. **Caracterização genética e citológica da recombinação somática em *Trichoderma pseudokoningii***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002. 92p. Tese (Doutorado em Agronomia).

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.

BAILEY, T.; BODÉN, M.; BUSKE, F.; FRITH, M.; GRANT, C. E.; CLEMENTI, L.; REN, J.; LI, W. W.; NOBLE, W. S. "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching", **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. W202-W208, 2009.

BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; AUSTIN, C.N.S.; FREDERICK, R.D.; MILES, M.R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, v. 90, p. 708-716, 2006.

BOS, J.I., ARMSTRONG, M.R., GILROY, E.M., BOEVINK, P.C., HEIN, I., TAYLOR, R.M., ZHENDONG, T., ENGELHARDT, S., VETUKURI, R.R., HARROWER, B., DIXELIUS, C., BRYAN, G., SADANANDOM, A., WHISSON, S.C., KAMOUN, S., BIRCH, P.R. Phytophthora infestans effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.** v. 107, p. 9909–9914, 2010.

BROGLIE, K.E.; RAIRDAN, G.J. **Identification of *P. pachyrhizi* protein effectors and their use in producing asian soybean rust (asr) resistant plants.** <https://www.google.com/patents/US20140283207>, 18 set. 2014.

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

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

BURDON, J. J. The structure of pathogen populations in natural plant communities. **Annual Review Phytopathology**, v. 31, p. 305-323, 1993.

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

CANTU, D., SEGOVIA, V., MACLEAN, D., BAYLES, R., CHEN, X., KAMOUN, S., DUBCOVSKY, J., SAUNDERS, D.G.O., AND UAUY, C. 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.

CÁRCAMO-RODRÍGUEZ, A.; AGUILAR-RÍOS, J.; HERNÁNDEZ, J. R. 2006. First Report of Asian Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* from Mexico. **Plant Disease**, v. 90, p.1260-1260, 2006.

CARMONA, M. A.; GALLY, M. E. Asian soybean rust: incidence, severity, and morphological characterization of *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinia and télia) in Argentina. **Plant Disease**, v. 89, p. 109, 2005.

CASELA, R.C., Variabilidade genética de patógenos e resistência de cultivares. In: VIII SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA. Assis, 2005. Anais... Campinas: Instituto Agrônômico, 2005. p.189-194.

CATANZARITI, A. M.; DODDS, P. N.; LAWRENCE, G. J.; AYLIFFE, M. A.; ELLIS, J. G. 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.; LAWRENCE, G.J.; AYLIFFE, M.A.; ELLIS, J.G. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, Minireview, v.269, p.181-188, 2007.

CATANZARITI, A.M., DODDS, P.N., V.E., T., KOBE, B., ELLIS, J.G., AND STASKAWICZ, B.J. The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. **Molecular plant-microbe Interactions Journal**, v. 23, p. 49–57, 2010.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO **Acomp. safra bras. grãos, v.3 - Safra 2015/16, n.8 - Oitavo Levantamento, Brasília**, p. 1-178, maio 2016.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. Parceria público privada no combate à ferrugem asiática da soja. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/>. Acesso em: 29.abril. 2016.

COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; YORINORI, J.T. Perda de rendimento de grãos de soja causada por ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). **Fitopatologia Brasileira**, v.27 (Suplemento), p.S100, 2002. Resumo. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co96.htm> Acesso em: 20.abril. 2016.

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.

DARBEN, L. **Obtenção e caracterização molecular e fenotípica de isolados monourediniais de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões do Brasil.** Maringá. Universidade Estadual de Maringá-PR, 2013, p. 81. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

DE CARVALHO, M. C.; NASCIMENTO, L.C.; DARBEN, L.M.; PODANOSQUI, A.M.P.; CAITAR, V.L.; QI, M.; ROCHA, C.S.; CARAZZOLLE, M.F.; KUWAHARA, M.K.; PEREIRA, G.A.G.; ABDELNOOR, R.V.; WHITHAM, S.A.; GUIMARÃES, F.C.M. Prediction of the in planta *P. pachyrhizi* secretome and potential effector families. **Molecular plant pathology**, 2016, Accepted Article.

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

DESLANDES, J. A. Ferrugem da Soja e outras leguminosas causada por *Phakopsora pachyrhizi* no Est. Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 337-339, 1979.

DODDS, P.N; LAWRENCE, G.J; CATANZARITI, AM; AYLIFFE, M.A; ELLIS J.G. The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **The Plant Cell Online**, v. 16, n. 3, p. 755–768, 2004.

DODDS, P.N.; RAFIQI, M., GAN, P.H.P.; HARDHAM, A.R.; JONES, D.A.; ELLIS, J.G. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. **New Phytologist Journal**, v. 183, n. 4, p. 993–1000, 2009.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539-548, 2010.

DOEHLEMANN, G.; VAN DER LINDE, K.; AßMANN, D.; SCHWAMMBACH, D.; HOF, A.; MOHANTY, A.; JACKSON, D., AND KAHMANN, R. Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. **PLoS Pathogens Journal**, v. 5, n. 2, 2009.

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.

DORON-FAIGENBOIM, A. and PUPKO, T. A Combined Empirical and Mechanistic Codon Model. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 388-397, 2006.

DUPLESSIS, S.; HACQUARD, S.; DELARUELLE, C.; TISSERANT, E.; FREY, P.; MARTIN, F.; AND KOHLER, A. *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 Journal**, v.24, p. 808–818, 2011.

EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O.; AND BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **PNAS**, v. 95, p. 14863–14868, 1998.

EMBRAPA SOJA. LONDRINA. Soja na alimentação: Composição do grão. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=7>. Acesso em: 03 nov. 2014.

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.

FIALLOS, F.R.G. A ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow. **Ciencia y Tecnología**, 4:45-60, 2011.

FLOR, H.H. The complementary genetic systems in flax and flax rust. **Advances Genetics**, v.8, n.1, p.29-54, 1956.

FREIRE, M.C.M.; da SILVA, M.R.; ZHANG, X.; ALMEIDA, A.M.R.; STACEY, G.; de OLIVEIRA, L.O. Nucleotide polymorphism in the 5.8S nrDNA gene and internal transcribed spacers in *Phakopsora pachyrhizi* viewed from structural models. **Fungal Genetics and Biology**, 49:95-100, 2012.

FREIRE, M.C.M.; OLIVEIRA, L.O.; ALMEIDA, A.M.R.; SCHUSTER, I.; MOREIRA, M.A.; LIEBENBERG, M.M.; MIENIE, C.M.S. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) 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.

FREITAS, M.C.M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1-12, 2011.

GARCÉS, F. R.; REIS, E.M. Umbral numérico de infección de *Phakopsora pachyrhizi* en el cultivo de soja. **Avances en investigación Agropecuaria**, v. 16, n. 1, p. 79-88, 2012.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; SOUZA KIIHL, R.A.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, 117:545–553, 2008.

GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M.; MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; PIMENTA, C.B.; FORCELINI, C. A. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 6 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 111).

GOLDMAN, N; YANG, Z. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p.725-36, 1994.

HACQUARD, S.; JOLY, D. L.; LIN, Y.C.; TISSERANT, E.; FEAU, N.; DELARUELLE, C.; LEGUÉ, V.; KOHLER, A.; TANGUAY, P.; PETRE, B.; FREY, P.; PEER, Y.V de.; ROUZÉ, P.; MARTIN, F.; HAMELIN, R.C.; DUPLESSIS, S. A Comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populini* (Poplar Leaf Rust). **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 25, n. 3, p. 279-293, 2012.

HAMMERSCHMIDT R. Systemic acquired resistance. **Advances in Botanical Research**, v. 51, p. 173-222, 2009.

HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. Breeding for Resistance to Soybean Rust. **Plant Disease**, 89:664-666, 2005.

HENNINGS, V. P. A few new Japanese Uredinaceae. **Hedwigia**, v. 42, p. 107-108, 1903.

HOGENHOUT, S.A; VAN DER HOORN, RAL; TERAUCHI, R; KAMOUN, S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 22, n. 2, p. 115-122, 2009.

HYTEN, D.L.; SMITH, J.R; FREDERICK, R.D; TUCKER, M.L; SONG, Q.; CREGAN, P.B. Bulk segregant analysis using the Golden Gate assay to locate the Rpp3 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 49, p. 265–271, 2009.

HYTEN, D.L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; AND CREGAN, P. B. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 47, p. 837–838, 2007.

JAKUPOVIĆ, M., HEINTZ, M., REICHMANN, P., MENDGEN, K., AND HAHN, M. Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 8–19, 2006.

JIANG, R. H., TRIPATHY, S., GOVERS, F., TYLER, B. M. 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**, v. 105, p. 4874-4879, 2008.

JONES, J.D.G, DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

JONES, J.D.G.; WITEK, K.; VERWEIJ, W.; JUPE, F.; COOKE, D.; DORLING, S.; TOMLINSON, L.; SMOKER, M.; PERKINS, S.; FOSTER, S. Elevating crop disease resistance with cloned genes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 369, n. 1639, p. 1-7, 2014.

KALE, S. D.; GU, B.; CAPELLUTO, D. G. S.; DOU, D.; FELDMAN, E.; RUMORE, A.; ARREDONDO, F. D.; HANLON, R.; FUDAL, I.; ROUXEL, T.; LAWRENCE, C. B.; SHAN, W.; TYLER, B. M. External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. **Cell**, v. 142, p. 284-295, 2010.

KAWASHIMA, C. G.; GUIMARÃES, G.A.; NOGUEIRA, S.R.; MACLEAN, D.; COOK, D.R.; STEUERNAGEL, B.; BAEK, J.; BOUYIOUKOS, C.; MELO, B. do V.A.; TRISTÃO, G.; OLIVEIRA, J.C de.; RAUSCHER, G.; SHIPRA, M.; PANICHELLI, L.; BACOT, K.; JOHNSON, E.; IYER, G.; TABOR, G.; WULFF, B.B.H.; WARD, E.; RAIRDAN, G.J.; BROGLIE, K.E.; WU, G.; ESSE, P.V.; JONES, J.D.G, BROMMONSCHENKEL, S.H. A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. **Nature biotechnology**, 2016.

KERK, N. M.; CESERANI, T.; TAUSTA, S. L.; SUSSEX, I. M.; NELSON, T. M.. Laser Capture Microdissection of Cells from Plant Tissues. **Plant Physiology**, v. 132, p. 27–35, 2003.

Kim, K.S. *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** , v. 125, p. 1339–1352, 2012.

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

KOCH, E.; HOPPE, H.H., Effect of light on uredospore germination and germ tube growth of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **Journal of Phytopathology**, v.119, p. 64-74, 1987.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LEAL, É.S.; ZANOTTO, P. M. **Substituição alélica e parâmetros populacionais do vírus da imunodeficiência humana, tipo I (HIV-1)**, [s.n.], São Paulo, 2004.

LI, S.; SMITH, J.R.; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. **Theoretical Applied Genetics**, 125:133-142, 2012.

LIN, S. Y. Studies on the physiologic races of soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. J. **Taiwan Agricultural Research**, v. 15, p.24-28, 1966.

LINK, T.I.; LANG, P.; SCHEFFLER, B.E.; DUKE, M. V.; GRAHAM, M. A.; COOPER, B.; TUCKER, M.L.; VAN DE MORTEL, M.; VOEGELE, R.T.; MENDGEN, K.; BAUM, T.J.; WHITHAM, S. A. 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. & MANNERS, J. G. Somatic recombination in yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*). In: The production and possible origin of two new physiological races. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 53, p. 251-258, 1969.

LUDERER, R.; DE KOCK, M.J.D.; DEES, R.H.L.; DE WIT, P.J.M.; JOOSTEN, M.H. Functional analysis of cysteine residues of ECP elicitor proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Molecular Plant Pathology**, v.2, p.91–95, 2002.

MACIEL, T.E.F., FREIRE, M.C.M., ALMEIDA, Á.M.R. DE, AND OLIVEIRA, L.O. de. Molecular characterization of beta-tubulin from *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, p. 169–177, 2010.

MANNERS, J. G. & BAMPTON, S. S. Fusion of uredospore germ tubes in *Puccinia graminis*. **Nature**, v. 179, p. 483-484, 1957.

MAWUENA, G. 1982. Preliminary observations on soybean rust incidence in Togo. **Soybean Rust Newsletter**, v. 5, p. 20–21.

MCDONALD, B. A.; MCDERMOTT, J. M.; ALLARD, R. W.; WEBSTER, R. K.; 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.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Resistance of soybean rust in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 5, p. 34-36, 1976.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, p. 951 - 956, 1980.

MELCHING J.S, DOWLER W.M, KOOGLER L, ROYER M.H. Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. **Plant Disease**, v. 73, p.117–122, 1989.

MEYER, J.D.; SILVA, D.C; YANG, C.; PEDLEY, K.F; ZHANG, C.; VAN DE MORTEL, M.; HILL, J.H.; SHOEMAKER, R.C.; ABDELNOOR, R.V.; WHITHAM, S.A.; GRAHAM, M.A. Identification and analyses of candidate genes for rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. **Plant Physiology**, v. 150, p. 295–307, 2009.

MILES, R. M.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Symptoms, Life Cycle, and Infection Process of Asian Soybean Rust (ASR). **Source of information is the APSnet**. p. 1-5. 2005.

MILES, M.R.; BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; BERNER, D.K.; FREDERICK, R.D. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant Disease**, 95:577-581, 2011.

MONTEROS, M.J.; MISSAOUI, A.M.; PHILLIPS, D.V.; WALKER, D.R.; BOERMA, H.R. Mapping and confirmation of the ‘Hyyuga’ red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. **Crop Science**, v. 47, p. 829–834, 2007.

MURITHI, H.M.; SOKO, M. M.; HARTMAN, L. First Report of *Phakopsora pachyrhizi* causing rust on soybean in Malawi. **Plant Disease**, v. 98, p. 1-3, 2014.

MURITHI, H.M.; SOKO, M. M.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. First Report of *Phakopsora pachyrhizi* Causing Rust on Soybean in Malawi. **Plant Disease**, v. 99, n. 3, p. 420-420, 2015.

MUSE, S.V.; GAUT, B.S. A Likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, p. 715–724, 1994.

NAVARRO, J. C., NAKASATO, R.; UTIAMADA, C. M.; YORINORI, J.T. 2004. First report of Asian soybean rust in Bolivia. World Soybean Research Conference, VII International Soybean Processing and Utilization Conference, IV Brazilian Soybean Congress. (*Supplement*): 85- 86 (Abstract).

NEWMAN, M.-A., SUNDELIN, T., NIELSEN, J. T., AND ERBS, G. MAMP (Microbe-associated Molecular Pattern) triggered immunity in plants. **Frontier Plant Science**, v. 4, 139, 2013.

NEMRI, A.; SAUNDERS, D.G.O.; ANDERSON, C.; UDAPHYAYA, N. M.; WIN, J.; LAWRENCE, G.J.; JONES, D.A.; KAMOUN, S.; ELLIS, J.G.; DODDS, P.N. The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. **Frontier Plant Science**, v.5, p. 1-14, 2014.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, v. 3, p. 418-426, 1986.

NIELSEN, R. Molecular signatures of natural selection. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 197–218, 2005.

ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN, J.F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycological Research**, v. 96, p. 825–850, 1992.

ORBACH, M. J.; FARRALL, L.; SWEIGARD, J. A.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. **Plant Cell**, v. 12, p. 2019-2032, 2000.

PARLEVLIET, J. E. Race and pathotype concepts in parasitic fungi. **Bulletin. OEPP/EPPO Bulletin**, v. 15, p. 145-150, 1985.

PAUL, C.; HARTMAN, G.L.; MAROIS, J.J.; WRIGHT, D.L. First report of *Phakopsora pachyrhizi* adapting to soybean genotypes with Rpp1 or Rpp6 rust resistance genes in field plots in the United States. **Plant Disease**, 97:1379, 2013.

PEDERSEN, C.; THEMAAT, E.V.L.V.; MCGUFFIN, L.; ABBOTT, J.C.; BURGIS, T.A.; BARTON, G.; BINDSCHEDLER, L.V.; LU, X.; MAEKAWA, T.; WEBLING, R.; CRAMER, R.; CHRISTENSEN, H.T.; PANSTRUGA, R.; SPANU, P.D. Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. **BMC Genomics**, v. 13, n. 694, p. 1471-2164, 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 45, 2001.

PHAM, T.A.; MILES, M.E.; FREDERICK, R.D.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, 93:224-228, 2009.

PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.10, p.393-400, 1956.

POSADA-BUITRAGO, M.L.; FREDERICK, R.D. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 949-962, 2005.

PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO : Brasil 2014/2015 a 2024/2025 projeções de longo prazo / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: MAPA/ACS, 2016. 109 p.

RAFIQI, M.; GAN, P. H.; RAVENSDALE, M.; LAWRENCE, G. J.; ELLIS, J. G.; JONES, D. A.; HARDHAM, A. R.; AND DODDS, P. Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. **Plant Cell**, v. 22, p. 2017-2032, 2010.

RAMSTEDT, M.; HURTADO, S.; AND ÅSTRÖM, B. Pathotypes of *Melampsora* rust on *Salix* in short-rotation forestry plantations. **Plant Pathology**, v. 51, p.185-190, 2002.

REHMANY, A. P.; GORDON, A.; ROSE, L. E.; ALLEN, R. L.; ARMSTRONG, M. R.; WHISSON, S. C.; KAMOUN, S.; TYLER, B. M.; BIRCH, P. R. J.; BEYNON, J. L. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. **Plant Cell**, v.17, p.1839-1850, 2005.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. Doenças da soja I: Ferrugem asiática. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

ROONEY, H.C.E.; VAN'T KLOOSTER, J.; VAN DER HOORN, R.A.L.; JOOSTEN, M.H.A.J.; JONES, J.D.G.; DE WIT, P.J.D.M. *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, v.308, p.1783-1786, 2005.

ROSSI, R. L. 2003. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of Soybean Rust in the province of Misiones, Argentina. **Plant Disease**, v. 87, p.102.

ROUXEL, T.; WILLNER, E.; COUDARD, L.; AND BALESDENT, M.H. Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. **Euphytica**, v. 133, p. 219–231, 2003.

RUPE, J.; L. SCONYERS. 2008. Ferrugem asiática da soja, Ferrugem da soja. Portuguese translation by Rubens Cherubini Alves and Emerson M. Del Ponte, 2008. **The Plant Health Instructor**. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/SoybeanRustPort.aspx>>. Acesso em: 15.abril. 2014.

SAKSIRIRA, T. W; HOPPE, H. H. Teliospore Germination of Soybean Rust Fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **Phytopathology**, v. 132, p. 339 – 342, 1991.

SAUNDERS, D.G.O.; WIN, J.; CANO, L.M.; SZABO, L.J.; KAMOUN, S.; RAFFAELE, S. Using Hierarchical clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. **PLoS One**, v. 7, e29847, 2012.

SCHNEIDER R. W; HOLLIER WHITMAN C. A; HK, PALM M. E, MCKEMY, J.M, HERNANDEZ JR, LEVY L, DEVRIES-PATTERSON R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, v. 89, p.774, 2005.

SELIN, C.; KIEVIT, T.R de.; BELMONTE, M.F.; FERNANDO, W.G.D. Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: Progress and Challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

SHANER, G.; STOMBERG, E.; LACY, G.; BARKER, K.; PIRONE. T. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 47-66, 1992.

SILVA, D.C.G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L.; ARIAS, C.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MAURO, A.O.; PEREIRA, S.S.; NOGUEIRA, L.M.; PASSIANOTTO, A.L.; ABDELNOOR, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 57–63, 2008.

SPERSCHNEIDER, J.; YING, H.; DODDS, P.N.; GARDINER, D.M.; UPADHYAYA, N.; SINGH, K.B.; MANNERS, J.M.; TAYLOR, J.M. Diversifying selection in the wheat stem rust fungus acts predominantly on pathogen-associated gene families and reveals candidate effectors. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 372, p. 1-13, 2014.

SOARES, R.; RUBIN, S. de A. L.; WIELEWICKI, A. P.; OZELAME, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1245-1247, 2004.

SONG, X.; RAMPITSCH, C.; SOLTANI, B.; MAUTHE, W.; LINNING, R., BANKS, T.; MCCALLUM, B.; BAKKEREN, G. Proteome analysis of wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina*, infection structures enriched for haustoria. **Proteomics**, v. 11, p. 944–963. 2011.

SOTOMAYOR-HERRERA, I. 2005. La roya de la soja, estratégias de manejo. INIAP-Pichilinge, Quevedo. (Boletín divulgativo, 330). 4 p.

STERGIOPOULOS, I. AND DE WIT, P. J. G. M. Fungal Effector Proteins. **Annual Review of Phytopathology**, v.47, p.233–63, 2009.

STERGIOPOULOS, J., CORDOVEZ, V.; OKMEN, B.; BEENEN, H.G.; KEMA, G.H.; DE WIT, P.J. 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**, v. 15, n. 5, p. 447-460, 2014.

STERN, A; DORON-FAIGENBOIM, A; EREZ, E; MARTZ, E; BACHARACH, E; PUPKO, T: Selecton 2007: 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.; BUITRAGO, M. L. P.; FREDERICK, R. D. Analysis of the complete mitochondrial genome sequences of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Mycologia**, v. 102, n.4, p. 887-897, 2010.

STONE, C.L.; MCMAHON, M.B.; FORTIS, L.L.; NUÑEZ, A.; SMYTHERS, G.W.; LUSTER, D.G.; FREDERICK, R.D. Gene expression and proteomic analysis of the formation of *Phakopsora pachyrhizi* appressoria. **BMC Genomics**, v. 13, n. 269, 2012.

STEWART, S.; E. A. GUILLIN; DÍAZ, L. First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Uruguay. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 909, 2005.

SUZUKI, Y. AND GOJOBORI, T. A method for detecting positive selection at single amino acid sites. **Molecular Biological Evolution**, v. 16, p.1315–1328, 1999.

SWANSON, W.J.; NIELSEN, R.; YANG, Q. Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins. **Molecular Biology Evolution**, v. 20, p. 18-20, 2003.

TENAILLON, M.; TIFFIN, P. The quest for adaptive evolution: a theoretical challenge in a maze of data. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 1–6, 2007.

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

TWIZEYIMANA, M.; OJIAMBO, P.S.; HAUDENSHIELD, J.S.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; PEDLEY, K.F.; BANDYOPADHAYAY, R.; HARTMAN, G.L. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. **Plant Pathology**, 60:719-729, 2011.

TWIZEYIMANA, M.; OJUAMBO, P.S.; SONDER, K.; IKOTUN, T.; HARTMAN, G.L.; BONDYOPADHAYAY, R. Pathogenic variation of *P. pachyrhizi* infecting soybean in Nigeria. **Phytopathology**, v. 99, p. 353-361, 2009.

TORRES M.A.; JONES, J.D.; DANGL, J.L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiological**, v. 141, p. 373-378, 2006.

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

TYLER, B. M.; AND ROUXEL, T. Effectors of Fungi and Oomycetes: Their Virulence and Avirulence Functions and Translocation from Pathogen to HOST Cells. Ames, IA: JohnWiley and Sons, Inc, 2013.

VAKILI, N. G.; K. R. BROMFIELD. *Phakopsora* rust on soybean and other legumes in Puerto Rico. **Plant Disease**, v.60, p.995-999, 1976.

VAN DEN ACKERVEKEN, G. F. J. M.; VAN KAN, J. A. L.; AND DE WIT, P. J. G. M. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. **Plant Journal**, v. 2, p. 359-366, 1992.

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.

VAN DER HOORN RA, KAMOUN S. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. **The Plant Cell**, v. 20, p. 2009-2017, 2008.

WANG, X. B. & 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.

WARD, E.R; UKNES, S.J; WILLIAMS, S.C; DINCHER, S.S; WIEDERHOLD, D.L; ALEXANDER, D.C; *et al.* Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

WHISSON, S. C.; BOEVINK, P. C.; MOLELEKI, L.; AVROVA, A. O.; MORALES, J. G.; GILROY, E. M.; ARMSTRONG, M. R.; GROUFFAUD, S.; VAN WEST, P.; CHAPMAN, S.; HEIN, I.; TOTH, I. K.; PRITCHARD, L.; BIRCH, P. R. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. **Nature**, v. 450, 115-118, 2007.

WIN, J.; CHAPARRO-GARCIA, A.; BELHAJ, K.; SAUNDERS, D. G.; YOSHIDA, K.; DONG, S.; SCHORNACK, S.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; HOGENHOUT, S. A.; KAMOUN, S. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 77, p. 235-247, 2012.

XIANG, T., ZHONG, N., ZOU, Y., WU, Y., ZHANG, J., XING, W., LI, Y., TANG, X., ZHU, L., CHAI, J., AND ZHOU, J.M. Pseudomonas syringae effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. **Curent Biology**, v. 18, p. 74–80, 2008.

XU, J.; LINNING, R.; FELLERS, J.; DICKINSON, M.; ZHU, W.; ANTONOV, I.; JOLY, D.L.; DONALDSON, M.E.; EILAM, T.; ANIKSTER, Y.; BANKS, T.; MUNRO, S.; MAYO, M.; WYNHOVEN, B.; ALI, J., MOORE, R.; MCCALLUM, B.; BORODOVSKY, M.; SAVILLE, B.; BAKKEREN, G. Gene discovery in EST sequences from the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* sexual spores, asexual spores and haustoria, compared to other rust and corn smut fungi. **BMC Genomics**, v. 12, p. 1–15, 2011.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N.G.; PASSIANOTTO, A.L.L.; SANTOS, J.V.M.; BENITEZ, E.R.; ABDELNOOR, R.V.; SOARES, R.M; SUENAGA, K. 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.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, I.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of Genetic Plant Pathology**, 68:52-56, 2002.

YAMAOKA, Y.; YAMANAKA, N.; AKAMATSU, H.; SUENAGA, K. Pathogenic races of soybean rust *Phakopsora pachyrhizi* collected in Tsukuba and vicinity in Ibaraki, Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 184-1844, 2014.

YANG X.B.; TSCHANZ A.T.; DOWLER W.M.; WANG, T.C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybeans infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v.81, p.1420-1426, 1991.

YANG, Z.H; NIELSEN, R; GOLDMAN, N; PEDERSEN, A.M.K: Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. **Genetics**, v. 155, n.1, p.431–449, 2000.

YEH, C. C. Physiological races of *Phakopsora pachyrhizi* in Taiwan. **Journal of Agricultural Research**, v. 32, p. 69-74, 1983.

YORINORI, J. T., MOREL, P. W.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILIAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F. Epidemia de ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, em 2001 e 2002. **Fitopatologia Brasileira** 27 (Suplemento): S178 (Resumo), 2002.

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.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.E.; GODOY, C.V.; NUNES, J., JR. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, 89:675-677, 2005.

YU, N.; KIM, M.; KING, Z.R.; HARRIS, D.K.; BUCK, J.W.; LI, Z.; DIERS, B.W. Fine mapping of the Asian soybean rust resistance gene Rpp2 from soybean PI 230970. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 387–396, 2015.

ZAMBOLIM, L. **Manejo Integrado da Ferrugem Asiática da Soja**. Em: Zambolim, L. (Org.). Ferrugem Asiática da Soja. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco. p. 73-98, 2006.

ZHANG, X.X.; FREIRE, M.C.M.; LE, M.H.; de OLIVEIRA, L.O.; PITKIN, J.W.; SEGRES, G.; CONCIBIDO, V.C.; BAILEY, G.J.; HARTMAN, G.L.; UPCHURCH, G.; PEDLEY, K.F.; STACEY, G. 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.

ZOLAN, M. E. Chromosome length polymorphism in fungi. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 686-698, 1995.

ANEXO

ANEXO A

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E POLIMORFISMOS DE GENES
CANDIDATOS A EFETORES DE *P. pachyrhizi*

STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND POLYMORPHISMS IN CANDIDATE
EFFECTOR GENES OF *Phakopsora pachyrhizi*

Alessandra Yokoyama, Fernanda Machado Castanho, Luana Darben, Michelle Pires Rincão,
Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho, Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães

Classificação: Genética.

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS A EFETORES DE *P. pachyrhizi*

Alessandra Yokoyama^a, Fernanda Machado Castanho^a, Luana Darben^a, Michelle Pires Rincão^a, Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho^b, Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães^{a*}

^aDepartamento de Biotecnologia Vegetal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), Rodovia Carlos João Strass - Distrito de Warta, PR, 86001-970, Brasil.

^bDepartamento de Biologia – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Rodovia BR-369 Km 54, Vila Maria, CP 261 - CEP 86360-000, Bandeirantes, Brasil.

*Corresponding author. Tel.: +55 43 33716265 E-mail address: francismar.marcelino@embrapa.br

Resumo

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das doenças mais devastadoras de soja na América. Nos últimos anos, muitos trabalhos vêm focando na descoberta de mecanismos moleculares associados à interação soja-*Phakopsora* e o estabelecimento da ferrugem. 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. Seis genes distribuídos nessas famílias ou tribos foram funcionalmente avaliados em sistema heterólogo, onde se obteve forte indicativo para função efetora. Contudo, não se sabe ainda sobre a evolução desses genes em diferentes genótipos de ferrugem. Dessa forma, foi avaliada a ocorrência de polimorfismos genéticos em sete candidatos à efetores entre seis isolados obtidos de diferentes anos e regiões do Brasil. A análise das sequências revelou 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.

Introdução

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* é um parasita biotrófico obrigatório, causador da doença ferrugem asiática da soja (FAS). Desde a sua detecção no Brasil, a ferrugem asiática tem causado sérios problemas à economia, provocando prejuízo estimado em mais de US\$ 125 milhões. Na última safra de 2015/2016 foram registrados 460 focos da doença nos principais estados brasileiros produtores de soja (1). Isto se deve à sua ampla gama de hospedeiros e elevada diversidade genética que contribuem para um complexo padrão de virulência (2).

O sucesso da infecção destes organismos se dá pela secreção de proteínas efetores no citoplasma de seus hospedeiros, as quais podem suplantar os mecanismos de defesa da planta. Tais proteínas podem atuar como fatores 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*) (3).

Os efetores de fungos apresentam diversas características que têm sido amplamente utilizadas para identificar conjuntos de candidatos a efetores no proteoma, genoma ou transcriptoma dos fungos patogênicos. A maioria tem um sinal de secreção N-terminal, são ricas em resíduos de cisteína, demonstram ausência de similaridade nas bases de dados de proteínas comuns e possuem tamanho pequenos (4, 5, 6).

Recentemente, com a disponibilidade do genoma de muitos fungos causadores de ferrugem, a predição de candidatos a efetores usando ferramentas de genômica estrutural e comparativa tem se intensificado (7, 8, 9, 10, 11, 12). No entanto, em *Phakopsora*, as informações sobre seu genoma são escassas, dificultando a compreensão da interação do patógeno-hospedeiro. Em busca de candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, De carvalho e seus colaboradores (2016), identificaram 13 famílias gênicas enriquecidas em candidatos a efetores do patógeno, dentre as quais três foram sugeridas como principais (Famílias 1, 2 e 3). Sete genes distribuídos nessas famílias foram funcionalmente avaliados, utilizando plantas de *Nicotiana benthamiana*, em que se obteve forte indicativo para função efetora. A partir desses dados, genes candidatos a efetores pertencentes as famílias 1 e 2 foram caracterizados molecularmente, tanto a nível estrutural e perfil de expressão, quanto sua variabilidade ao nível de polimorfismo de DNA, utilizando diferentes haplótipos compostos de isolados previamente caracterizados, oriundos de diferentes anos e regiões brasileiras. A identificação e a compreensão dessas proteínas poderão auxiliar no conhecimento da estrutura proteica dos efetores de *Phakopsora* e ser úteis na identificação das proteínas R da soja. Além disso, detectar o nível de variação genética nesses genes,

permitirá entender o processo de seleção atuante, e principalmente, auxiliará na identificação de domínios chave no reconhecimento R-Avr.

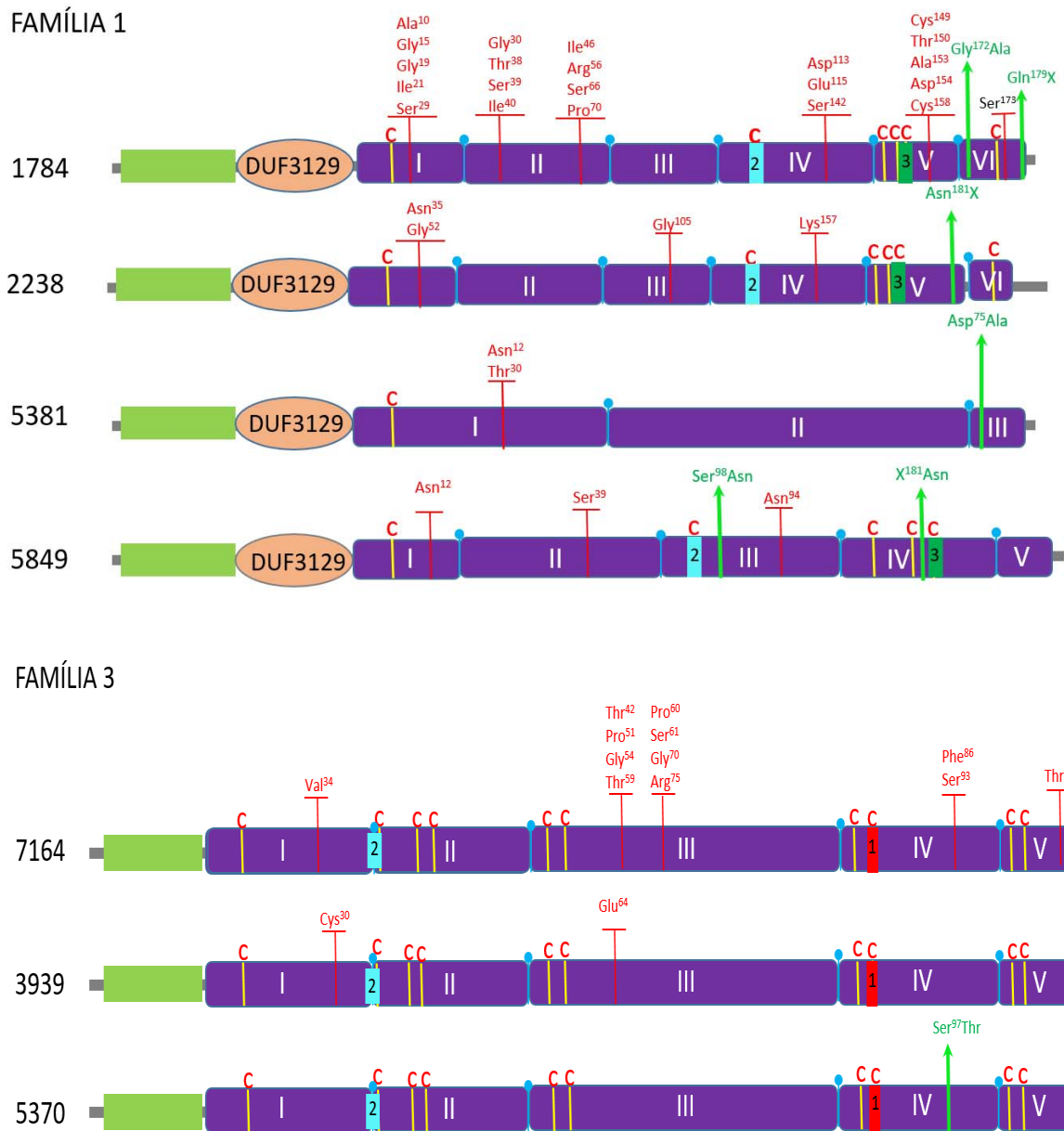
2. Resultados e Discussão

2.1 Caracterização estrutural dos candidatos efetores

2.1.1 Estrutura da região codante e proteína expressa

O sequenciamento da região expressa dos candidatos a efetores permitiu a identificação e predição da proteína predita, junção intron/exon e potenciais domínios. A estrutura proteica dos 7 candidatos representados pelas famílias 1 e 3 pode ser observada na Figura 1. Em todos os candidatos foi possível observar a presença do peptídeo sinal localizado na região N-terminal, indicando que a proteína seria secretada, entre os aminoácidos 1 ao 22 para os candidatos da família 1 e para a família 3, entre os aminoácidos 1 ao 24.

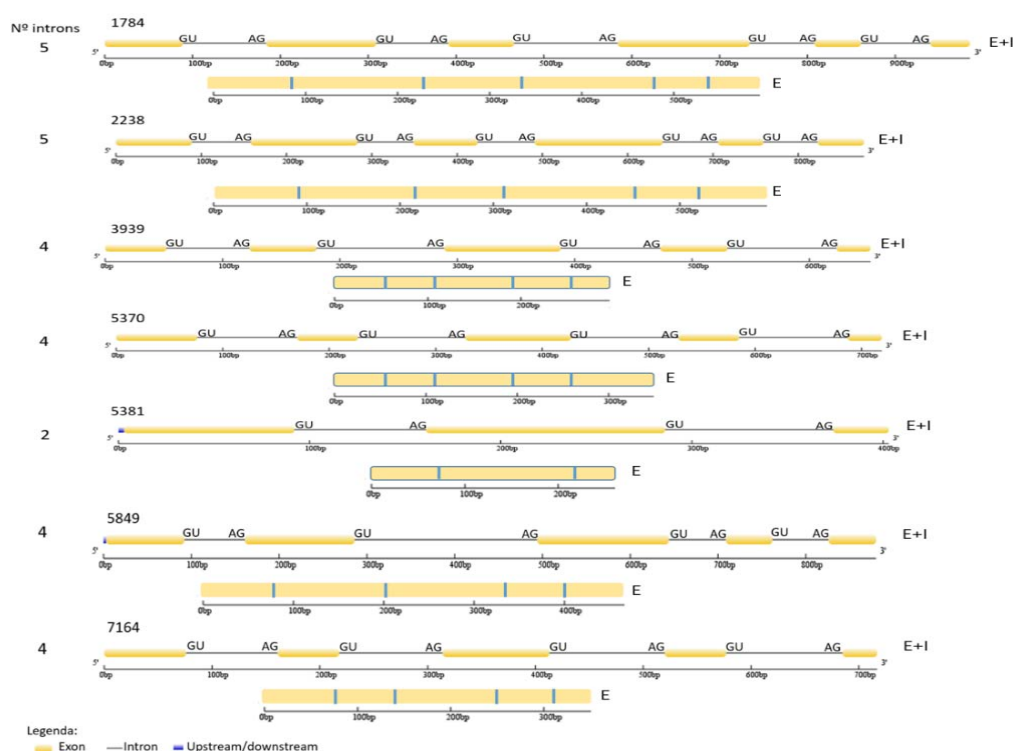
Todos os candidatos efetores analisados exibiram proteínas com elevados níveis do resíduo cisteína, indicando elevada capacidade de interação com outras proteínas. Os candidatos da Família 1 exibiram pelo menos 6 resíduos de cisteínas distribuídos nas seqüências 1784 e 2238, enquanto os candidatos 5849 e 5381 apresentaram 5 e 1, respectivamente. Para a família 3, todos os candidatos revelaram, em cada um, 10 resíduos de cisteínas (Figura 1). Pedersen e seus colaboradores (2012), quando estudaram a estrutura e evolução do fungo patogênico *Blumeria graminis*, observaram que as cisteínas conservadas na maioria das famílias tinham um número par. Esse número foi consistente para as famílias 1 e 3 dos candidatos efetores estudados nesse trabalho. Além disso, o elevado grau de resíduos de cisteína presente em efetores é comum nas mais diferentes espécies, tais como *Melampsora larici-populina*, *Coletotrichum lentis*, *Puccinia graminis f. sp. tritici* (8, 13, 14). Proteínas ricas em cisteínas são comuns em efetores de fungos patogênicos, em que as pontes de dissulfeto podem melhorar a estabilidade da proteína no apoplasto do hospedeiro (15).



(Figura 1)

Para determinar a localização dos introns/exons e potenciais domínios, as seqüências de DNA foram alinhadas com as de cDNA de cada candidato efetor. Com base nos resultados, foi possível observar que os candidatos 1784 e 2238 foram os que mais exibiram regiões de introns, enquanto os efetores 3939, 5370, 5849 e 7164 apresentaram 4 introns, e o único com 3 foi o efetor 5381, conforme esquema na figura 2. Como esperado, em todo início e fim de cada intron, foi detectada a presença de duas bases GU e AG, respectivamente, característica encontrada em todos os íntrons, para a ocorrência de *splicing*.

Com relação ao número de exons, os candidatos da família 1 apresentaram 6 exons, exceto o candidato 5849 e 5381, que exibiram 5 e 3 exons, respectivamente. Para família 3, cinco exons foram localizados nas sequências de todos os candidatos. Foi possível observar que a estrutura da proteína dos candidatos dessa família foi semelhante, apresentando um peptídeo sinal com o mesmo tamanho, número de exons iguais, bem como a quantidade de cisteína ao longo da sequência. A conservação da estrutura gênica destes candidatos, incluindo resíduos de aminoácidos em particulares posições, além do elevado nível de similaridade, reforçam que estes candidatos pertençam a uma família genica e provavelmente surgiram de um ancestral em comum (8).



(Figura 2)

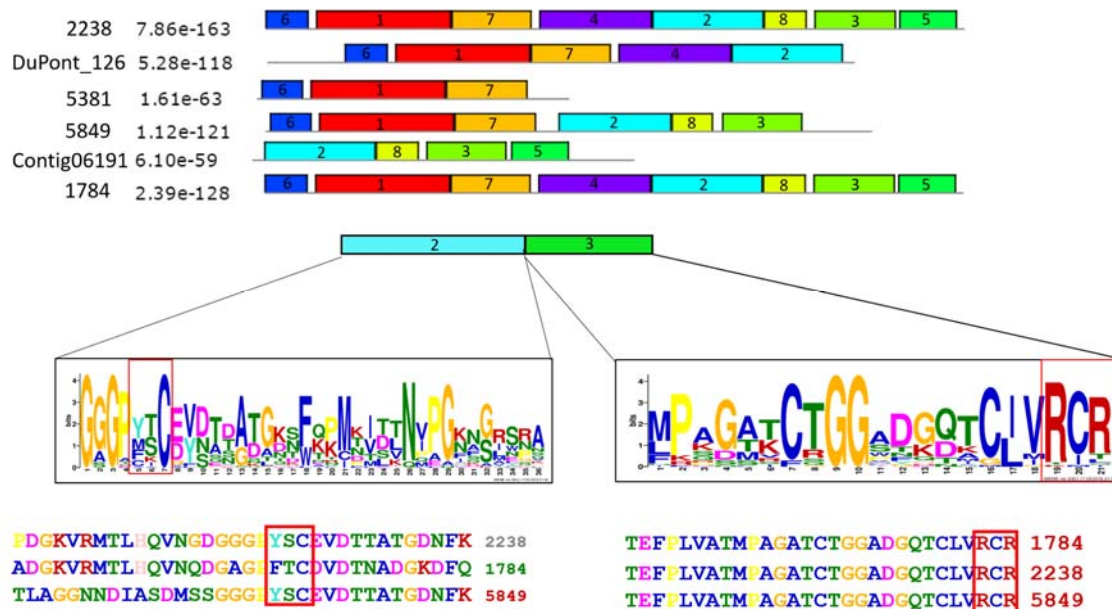
Em relação ao tamanho das sequências genica preditas, o efetor 5381 foi o que exibiu o menor tamanho, com 403 pares de bases (pb) para o transcrito primário e uma redução para 243 pb após a retirada dos introns. Em contrapartida, os candidatos 1784 e 2238, apresentaram tamanho de 546 pb para regiões somente com exons e quando os introns foram incluídos, o tamanho aumentou para 1002 e 878 pb, respectivamente.

2.1.2 Domínios e Motivos

Em todos os candidatos a efetores pertencentes a Família 1 foi possível identificar o domínio DUF3129, o qual não apresenta uma função conhecida descrita, assim

como relatado por De Carvalho *et al.*, 2016. Este domínio já foi reportado em muitas seqüências de candidatos a efetores de fungos, tais como *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Melampsora larici-populina* (7, 9). Para os candidatos da família 3, este domínio não foi localizado.

Adicionalmente, outros motivos conservados foram verificados para ambas famílias. Para os candidatos efetores da tribo 1, foi encontrado um total de 8 motivos conservados presentes nas 6 seqüências (Figura 3), dentre estes, dois motivos conservados de cisteína (motivo 2 e 3): os motivos [YFM][ST]C e o RCR, encontrados no segundo e quinto resíduo de cisteína, respectivamente, presentes em todos os candidatos a efetores, exceto para o 5381. Ambos os motivos foram encontrados por De Carvalho e seus



colaboradores (2016).

(Figura 3)

Ainda, os motivos 1, 6 e 7 foram presentes em todos os candidatos, com exceção do contig06191, obtido por Link *et al* (2014), enquanto o motivo 5 foi presente apenas nos candidatos 5849 e 1784.

Para a família 3, foram encontrados 6 motivos conservados (Figura 4). O motivo 5 foi identificado no efetor 7164 e na seqüência Dupont_144 (patente US20140283207, 2014), enquanto o motivo 6 foi presente apenas no efetor 5370. Dois motivos conservados contendo cisteínas também foram identificados, os motivos [FY]xC (motivo 1) e [AFY]xC (motivo 2). Tais 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* (16, 7), *P. striiformis f.sp. tritici* (17) e *Melampsora larici-populina* (9, 8).

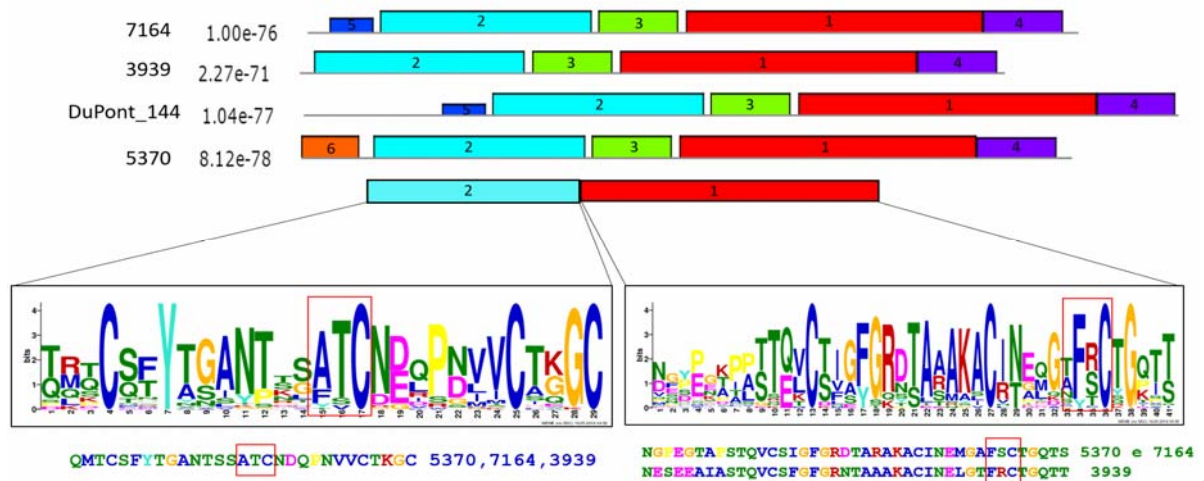


Figura 4)

2.2 Análise do polimorfismo em genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*

A fim de avaliar o polimorfismo de sete genes candidatos efetores foi realizado o sequenciamento da região a ser transcrita a partir do DNA de três isolados monouredinais de ocorrência brasileira, coletados em diferentes regiões e anos, além da inclusão das sequências dos respectivos candidatos identificados no secretoma descrito por De Carvalho et al (2016), (amostra populacional de *P. pachyrhizi* obtida em Londrina no ano de 2009 – Comunicação Pessoal – De Carvalho, M.), ainda foram incluídas 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 Konstanz, Alemanha), e as apresentadas na patente US20140283207 (18). O número total e tipo de polimorfismos detectado para cada candidato a efector, bem como a região onde foi identificado pode ser observado na tabela 1.

(Tabela 1)

Entre os candidatos a efetores analisados, o efector que apresentou maior número de polimorfismos foi o de_novo_1784, membro da família 1, contendo 92 sítios polimórficos gerados por 9 inserções/deleções (indels) e 83 substituições de base, distribuídos tanto nos exons quanto nos introns. Observou-se que as sequências dos isolados L.CV107 e a do de_novo 1784 foram similares em comparação as sequências do isolado L.L.LD5511 e L.UB112. Sendo assim, a maioria dos polimorfismos identificados foi na sequência do candidato a efector de_novo_1784 quando comparado o isolado L.CV107 com as dos isolados L.L.LD5511/L.UB112. Dentre os 92 sítios polimórficos, foram

identificadas apenas 2 substituições não sinônimas, com consequente mudança de aminoácido na proteína predita. Uma delas provocou uma mudança radical baseada nas propriedades físico-química do aminoácido, em que a polaridade do grupo R alterou de polar (hidrófilo) para não polar (hidrófobo), potencialmente capaz de afetar a estrutura e a função da proteína predita. A outra variação observada levou a uma não predição do códon na posição 179 para o isolado L.UB112, possivelmente por ter ocorrido a deleção do último nucleotídeo nesse ponto, enquanto para os outros o aminoácido glutamina prevaleceu.

O segundo efetor que apresentou maior nível de polimorfismo foi o *de_novo_7164*, membro da família 3, que apresentou 46 sítios polimórficos, sendo 41 substituições de base e 5 deleções. Para esse efetor, novamente o isolado L.CV107 foi o que mais se diferenciou quando comparado aos isolados L.L.LD5511 e L.UB112 (Anexo B). Apesar de apresentar muitas substituições de base nas sequências do DNA, estas não foram capazes de alterar a proteína.

Para análise do polimorfismo do candidato efetor 2238, foram incluídas a sequência *Dupont_126* (patente US20140283207) (18) e a do *contig06191* (11) por apresentarem elevada similaridade com esse efetor. Quando todas as sequências foram alinhadas, 13 SNPs foram detectados. Dois deles foram observados entre os isolados para as mesmas sequências, um na posição 101, o qual o isolado L.L.LD5511 e o *de_novo_2238* apresentou a base C, enquanto os isolados L.UB112, L.CV107 e *Dupont_126* constataram a base T, e o outro na posição 446, onde a base C foi observada para os dois primeiros isolados. Para os isolados L.UB112, L.CV107 e *Dupont_126* foi presente a base A. A sequência *Dupont_126* revelou mais duas substituições na posição 152 (T/C) e 667 (A/T). O *contig06191* exibiu apenas uma inserção da base A, na posição 805 (Anexo A). Foi possível observar que as sequências do candidato a efetor 2238 dos isolados L.UB112 e L.CV107 foram mais similares quando comparado com o isolado L.L.LD5511, dos quais os 8 polimorfismos encontrados foram entre o isolado L.L.LD5511 quando comparado com os outros dois isolados. As sequências proteicas preditas dos isolados para o efetor 2238 foram similares, porém o *contig06191* exibiu uma inserção de uma base na posição, que gerou um códon de asparagina na posição 179 da proteína predita. Tal inserção provocou uma alteração no quadro de leitura na região C-terminal da proteína predita.

Os candidatos a efetores 5849 e 5381 apresentaram 9 e 7 polimorfismos, respectivamente, sendo que 5 foram substituições de base e 4 indels para o 5849 e 7 substituições para o efetor 5381. Para o efetor 5381, os isolados L.L.LD5511 e o L.UB112 foram idênticos entre si, mas se diferenciaram do L.CV107 e a sequência *de_novo_5381*, obtida de uma amostra populacional do patógeno de 2009 (6), enquanto para o efetor 5849,

o isolado que se diferenciou foi o L.L.LD5511 e a população 2009. A sequência contig06191 apresentou apenas uma inserção da base A, na posição 740. Com relação aos polimorfismos na proteína predita, para o candidato 5381, houve uma mutação missense, em que o aminoácido ácido aspártico, um aminoácido carregado negativamente prevaleceu para o isolado L.CV107 e o de_novo 5381, enquanto para o isolado L.L.LD5511 e o L.UB112 foi alterado para alanina, um aminoácido apolar hidrofóbico. Ao contrário, o candidato a efetor 5849, na posição 133 da proteína, gerou o códon de asparagina apenas para contig06191, resultado da inserção da base A, e, conseqüentemente, tal inserção foi capaz de alterar a mudança de leitura da sequência proteica. Outra substituição não sinônima foi observada na posição 98, em que o aminoácido asparagina prevaleceu para todas as sequências, exceto para o isolado L.L.LD5511, que exibiu o aminoácido serina, no entanto, ambos são pertencentes ao mesmo grupo R, polar e hidrofílico (Tabela 1).

Os demais efetores avaliados apresentaram os menores níveis de polimorfismo identificados neste trabalho, uma e duas substituições respectivamente para os efetores 5370 e 3939. A substituição na sequência nucleotídica do efetor 5370, foi de uma mudança na base G/C na posição 586 da sequência, sendo que os 3 isolados apresentaram a base G e o de_novo_5370 (6), apresentou a base C. Foi gerado um único SNP capaz de alterar o códon do aminoácido na posição 92, porém, a variação do aminoácido foi neutra, ambos pertencentes ao grupo R polar. 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 (8).

Em relação ao efetor 3939, os dois polimorfismos encontrados não foram observados entre os isolados analisados neste trabalho, mas entre os isolados e a sequência (Dupont_144) similar apresentada na patente (US20140283207) (18). Tais polimorfismos geraram duas substituições sinônimas, estabelecendo a mesma sequência proteica.

De modo geral, pode-se observar com base nos resultados que o isolado L.CV107 foi o que mais se diferenciou quando comparado aos isolados L.UB112 e o LD551 com relação as sequencias dos candidatos a efetores 1784, 7164 e 5381. Tal fato poderia ser explicado pela origem e data de coleta do isolado. O isolado L.CV107 é o mais antigo, tendo sido obtido em 2007, no Estado de Mato Grosso, enquanto L.UB112 e L.L.LD5511 foram obtidos nos anos de 2012 e 2011, respectivamente, nas cidades de Uberlândia (MG) e Londrina (PR) (19). Além disso, o isolado L.CV107, para os candidatos 2238 e o 5849, mostrou-se quase 100% similar ao isolado L.UB112, mas para nenhum candidato a efetor analisado, se mostrou similar ao isolado L.L.LD5511, podendo inferir que o local tenha sido

importante para essa variação, visto que a distância entre a região de Uberlândia e Campo Verde é menor quando comparada com Londrina. Adicionalmente, o perfil de virulência do isolado L.CV107 mostrou que apenas o Rpp1 foi suscetível a este isolado, enquanto os isolados L.L.LD5511 e L.UB112, além do Rpp1, apresentaram outros genótipos suscetíveis, Rpp2, Rpp3, Rpp5 e, Rpp5 e Rpp6, respectivamente.

A avaliação dos polimorfismos detectados quanto ao tipo de substituições sinônimas e não sinônimas demonstrou que nenhuma proteína predita foi alterada drasticamente, mas a maioria apresentou alguma modificação, sendo que os candidatos 1784 e 5849 foram os que apresentaram o maior número de substituições não sinônimas, 2 cada. Com base na relação entre as substituições sinônimas e não sinônimas baseadas na análise global nos códons da sequência codificadora, de modo geral, foi possível inferir que os candidatos estão sob seleção purificadora (Tabela 2), ou seja, provavelmente codificando proteínas com funções conservadas, por isso evoluindo lentamente (20). Tais resultados sugerem que as proteínas correspondentes podem não serem imunes ou que a imunidade desenvolvida através dessas proteínas não tem impacto na virulência (21).

Em muitos casos em que a variação alélica em locus de avirulência de fungos foi estudada, verificou-se que os meios para escapar do reconhecimento do hospedeiro não foram por seleção positiva, mas simplesmente por perda de função do gene. Alguns exemplos incluem o locus Avr1-Co39 em *Magnaporthe oryzae* (22) e o locus AvrLm1 em *Leptosphaeria maculans* (23).

(Tabela 2)

Em alguns casos, como para os candidatos 2238 e 5849, foram encontradas evidências da ocorrência de seleção diversificadoras para um pequeno número de códons no modelo de Nielsen e Yang (NY) (Figura 5), mas na análise do Nei-Gojobori (z-teste), tais códons não foram suficientes para considerar a seleção diversificadora significativa (Tabela 2). Do mesmo modo, Pedersen *et al* (2012) quando analisaram 72 famílias de genes candidatos a efetores de *B. graminis f. sp. hordei* verificaram que o z-teste não foi eficiente para detectar o polimorfismo em alguns aminoácidos para algumas famílias de efetores,

2238

```

1           11           21           31           41
HGVITSVEGA NGQTGS AFGM VESTPRDGTR TNPFQTDSSI IRDREVSSGK
51          61          71          81          91
ASACGRTLGA GNNDIASDMS SAESAGLASI GPDGKVRMTL HQVNGDGGGP
101         111        121        131        141
YSCEVDTTAT GDNEKKMNID TNVPGKNSRS RAKATEFPLV ATMPAGATCT
151         161        171
GGADGQTCLV RCRNAANAGP FGGCVAVTQA N

```

Legend:

The selection scale:

1 2 3 4 5 6 7

Positive selection Purifying selection

5849

```

1           11           21           31           41
HGVITSVEGA NGQTGS AFGM VESTPRDGTR TNPFQTDSSI IRDREVSSGK
51          61          71          81          91
ASACGRTLGA GNNDIASDMS SGGGPYSCEV DTTATGDNEK KMNIDTNVEG
101         111        121        131        141
KNSRSRAKAT EEP L V A T M P A G A T C T G G A D G Q T C L V R C R N V Q T L V H L V D V L
151
L L P K Q

```

Legend:

The selection scale:

1 2 3 4 5 6 7

Positive selection Purifying selection

enquanto no modelo de NY, a seleção dos mesmos códons foi diversificadora.

(Figura 5)

Adicionalmente, tais divergências entre os resultados dos modelos podem ser explicadas pelo fato do método Suzuki e Gojobori (SG), modelo utilizado para realizar o teste-z, ignorar a incerteza na reconstrução do ancestral e no caminho evolutivo entre sequências ancestrais e existentes, e falha para explicar a variabilidade, afetando negativamente o desempenho do teste. Em contraste, o método Nielsen e Yang (NY), utilizado para calcular a pressão diversificadora versus purificadora no servidor Selecton server, usa toda a sequência para detectar se qualquer parte da mesma passou por seleção positiva, permitindo que as informações a partir de todos os locais são utilizadas para estimar as quantidades comuns a todos os locais (por exemplo, distâncias evolutivas) com mais precisão (24).

Interessantemente, para todos os candidatos a efetores que apresentaram polimorfismos não sinônimos, estes foram encontrados na região C-terminal da proteína predita, enquanto a região N-terminal os polimorfismos foram sinônimos (Figura 1). Em patógenos como ferrugem e oomicetos, a seleção diversificadora foi observada na região C-terminal em muitas famílias de genes efetores (25, 26, 27, 28, 29). Estes resultados são consistentes com a ideia de que as proteínas são efetoras modulares, com o N-terminal envolvido na secreção e translocação do hospedeiro e o domínio C-terminal é destinado para modular ou interagir com as proteínas de defesa do hospedeiro dentro das células vegetais (30, 29).

2.3 Diversidade genética de isolados de *P. pachyrhizi* com base em polimorfismos em genes candidatos a efetores

A comparação entre as sete sequencias dos candidatos a efetores das Famílias 1 e 3, obtidas do sequenciamento de 3 isolados brasileiros de *P. pachyrhizi*, foi analisada conjuntamente com os demais membros destas mesmas famílias obtidas por De Carvalho et al (2016). Foram geradas duas árvores filogenéticas com base no sequenciamento das regiões dos sete genes candidatos efetores, agrupando os candidatos das famílias 1 e 3 separadamente (Figura 6).

Na análise dos membros da Família 1, foi possível observar a formação de dois grandes grupos. O primeiro contendo a maioria dos membros de *P. pachyrhizi*, e os outros representantes de diferentes espécies de ferrugens, como *P. graminis* e *M. lini*. Os candidatos efetores 2238, 5849 e 5381 se agruparam em um mesmo ramo, enquanto o 1784 em outro, mas os quatro candidatos permaneceram no mesmo grupo.

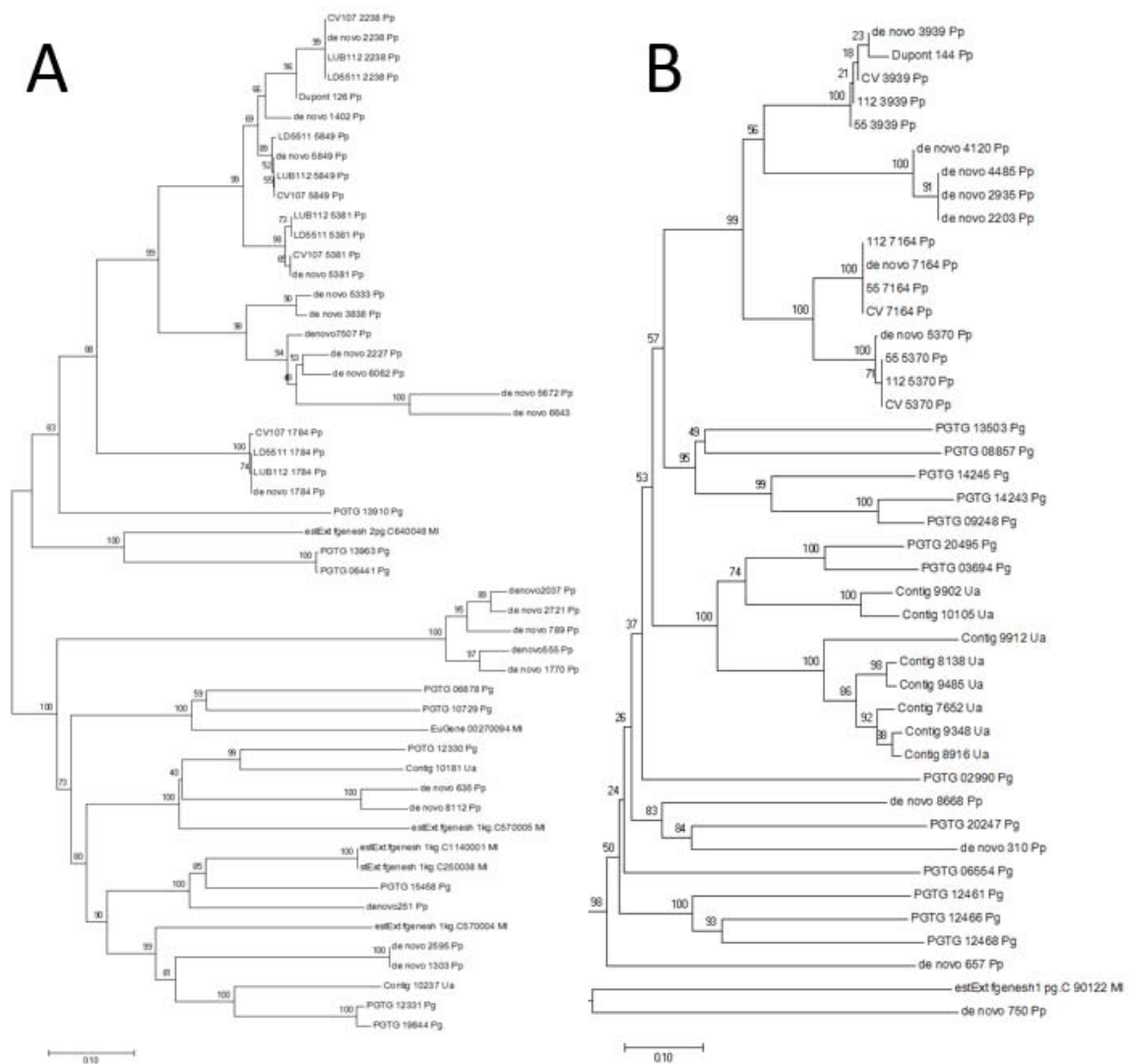
Na análise filogenética da família 3, foi possível observar que os candidatos 5370 e 7164 se agruparam em um mesmo ramo e o candidato 3939 no mesmo sub-ramo,

com um *bootstrap* de 100%. O sub-ramo contendo sequências de *Puccinia graminis* ficou próximo a esses candidatos.

A estrutura observada neste estudo das árvores filogenéticas para as famílias 1 e 3 não diferiram das apresentadas por De Carvalho e colaboradores (2016), que demonstraram que as sequências dos candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, tanto da família 1 como da 3, constituíram um cluster isolado, sugerindo uma possível expansão destas famílias no genoma de *P. pachyrhizi*.

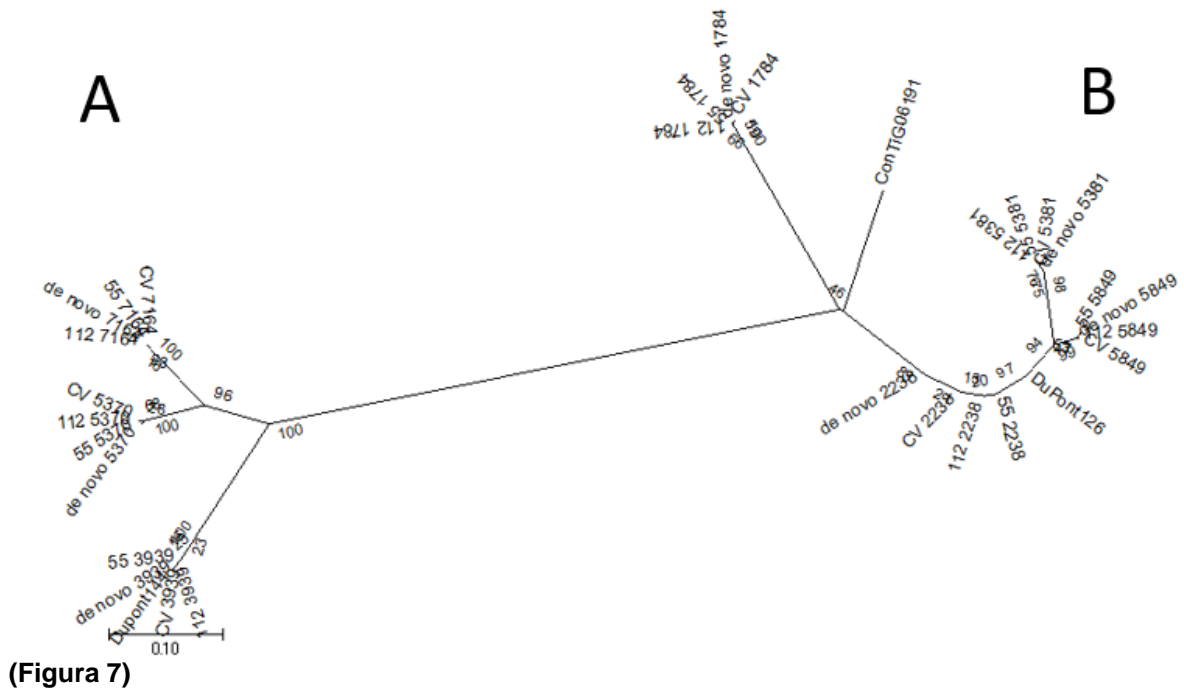
Como esperado, as sequências de um mesmo efector obtidas do sequenciamento dos três isolados monouredinais de *P. pachyrhizi* se agruparam em pequenos ramos, demonstrando que são mais similares entre si quando comparados com outros efetores de *P. pachyrhizi* e de outras ferrugens. O número reduzido de isolados utilizado nas análises pode ter sido insuficiente para detectar a separação de grupos, no entanto ressalta-se que a comparação abrangeu sequências de diferentes espécies de Pucciniales e efetores costumam ser proteínas linhagem ou espécie específicas ou serem genes de famílias específicas observadas em genomas de ferrugens (7).

Stergiopolus *et al* (2014), avaliaram a diversidade de 34 linhagens de *Mycosphaerella fijensis*, um fungo que infecta banana, de 4 genes efetores, e verificaram um grande número de polimorfismos que puderam refletir a co-evolução entre patógeno-hospedeiro. Rehmany e seus colaboradores (2005), ao estudarem o patógeno oomiceto *Hyaloperonospora parasitica* identificaram um gene de avirulência ATR^{NdWSb} que apresentou seis alelos divergentes entre oito isolados analisados. Sendo assim, para se presenciar um número de polimorfismo consistente com a finalidade de presenciar a separação na escala evolutiva, é necessário incluir um número maior de isolados.



(Figura 6)

A fim de verificar a diferença apenas nas sequências de proteínas entre os sete candidatos efetores, foi conduzida uma análise filogenética contendo as sequências dos isolados de *P. pachyrhizi*, juntamente com as oriundas da amostra populacional coletada em 2009 (6), contig06191, Dupont 126 e Dupont 144 (Figura 7). Na árvore filogenética foi possível observar a separação em dois grupos distintos, um correspondente a família 1 e outro a família 3. Similarmente à análise em conjunto com demais sequências de fungos causadores de ferrugem, na análise apenas com as sequências dos candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, para cada candidato, os isolados se agruparam nos mesmos ramos, com elevados níveis de similaridade, mesmo entre os candidatos a efetores que apresentaram níveis significativos de seleção diversificadora.



Adicionalmente, o alinhamento entre os candidatos a efetores membros das famílias 1 e 3 permitiu a identificação de alterações estruturais entre os membros de cada família.

Na família 1, pode-se observar elevada similaridade entre os membros 2238, 5381 e o 5849, que apresentaram 77% de similaridade, bem como o contig06191. No entanto foi possível observar uma inserção de 8 aminoácidos na região N terminal exclusiva (destacada em vermelho) do efector 2238 (Figura 8a). Tal inserção provocou ainda uma mudança no quadro de leitura na sequência predita da proteína 2238. Além disso, dando enfoque nos efetores 2238, 5849 e o contig06191, quando as sequências nucleotídicas foram alinhadas, o contig06191 exibiu a base A na posição 739 e 805 para o efector 5849 e 2238, respectivamente. Quando a proteína foi predita, a inserção dessa base provocou a mudança na leitura da região C-terminal do contig06191, incluindo a região do motivo conservado RCR, em que alterou para TMQ (Figura 8b).



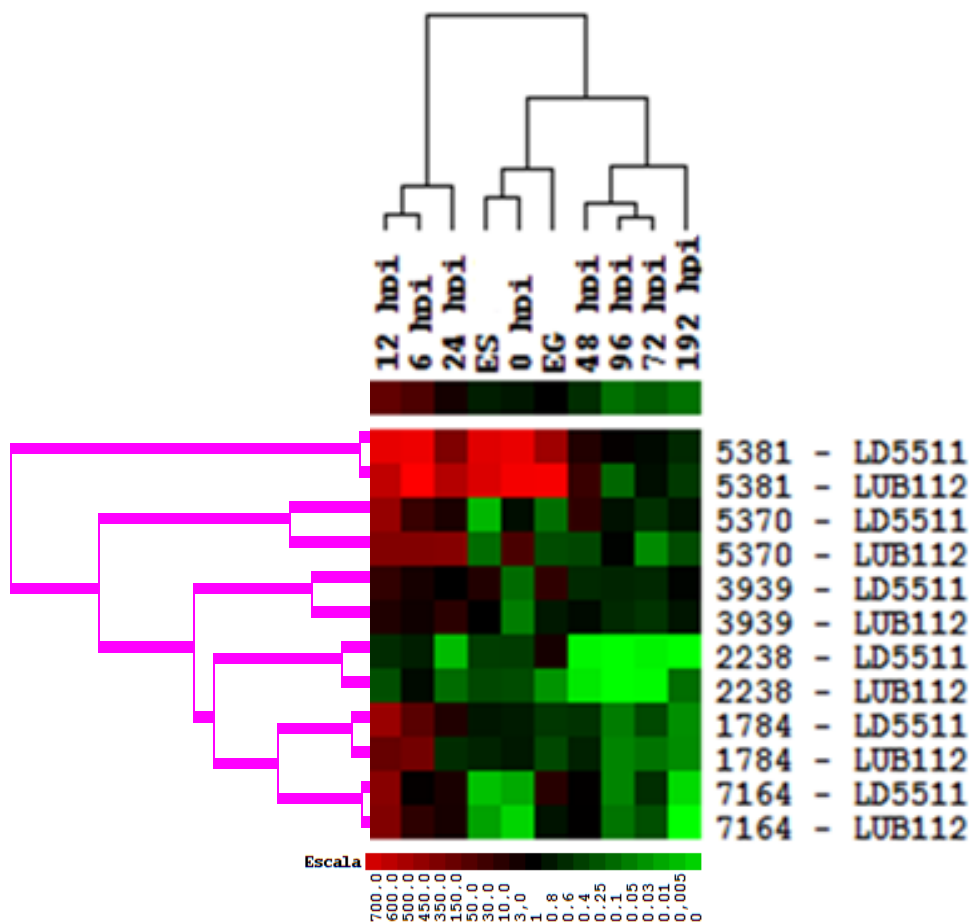
(Figura 8)

L.L.LD5511, respectivamente. Por ultimo, para o candidato 1784, a expressão diferenciou-se entre os isolados no tempo de 24 horas apenas para o L.L.LD5511.

O perfil de expressão do candidato a efetor 5381 da família 1 não diferiu entre os dois isolados analisados, mas se destacou dentre os demais quanto a forte expressão nos tempos de 0 horas a 24 horas, bem como no esporo e esporo germinado.

Em geral, a expressão de todos os candidatos foi *up* regulada durante os tempos iniciais de infecção até 24 horas após inoculação (hai), no entanto, no tempo de formação do haustório (48 horas) não foi possível observar uma *up* regulação. (6), ao analisarem o perfil de expressão de 22 contigs de *P. pachyrhizi* dos quais incluíram os membros das famílias 1 e 3 avaliados nesse estudo, observaram para os membros da família 1 e 3, uma forte *up* regulação durante o início da infecção até 24 horas pos inoculação (hpi) e em esporos germinados. (31) e (7) também revelaram a expressão de efetores em esporos no início da interação entre hospedeiro-patógeno antes da formação do haustório ou ao longo de todo o processo de infecção (7).

(Tabela 3)



(Figura 10)

3. Material e Métodos

3.1 Material Biológico e Seleção dos candidatos efetores

Foram utilizados três isolados monouredinais obtidos por (19) a partir de amostras coletadas em diferentes regiões produtoras de soja do Brasil e em diferentes anos. O critério de seleção dos isolados foi a partir de diferentes haplótipos identificados nas regiões de ITS1, além de apresentarem diferentes perfis de virulência (Tabela 4 e 5). Os isolados diferiram em sua virulência nos genótipos diferenciadores de soja *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp5* e *Rpp6*, entretanto, apresentaram um genótipo suscetível em comum, o *Rpp1* (Tabela 5).

(Tabela 4 e 5)

3.2 Extração do DNA genômico, PCR e sequenciamento dos candidatos a efetores

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por (32), sendo utilizado 5 mg de esporos triturado com nitrogênio líquido e 500 µL de tampão de extração (SDS10%; Tris-HCl 1M pH8,0; NaCl 5M; EDTA 0,5M e 1%de -mercaptoetanol) por amostra.

Foram utilizados sete conjuntos de *primers* dos genes candidatos a efetores para amplificar as sequências de DNA dos três isolados 2238 (F-CACGGTGTTACTTTCAGTT; R-GCTGTTACCCAAGCAAAGTAA), 1784(F-CATGGACTCATCACAGGTG; R-CGTCACCCAAGCCAAGTAA), 5370 (F AGATTCGTAATCCCCAGATT; R GCCAAACCTTGACAAATTAA), 7164 (F AGACTCTCAGCTCTTAAACCAG; R GCCAGACCTCCAAAATTAG), 5381 (F ATGCACGGTGTTACTTTCAGTTG; R TCATTCTGACTTTTCCGTCA), 5849 (F CACGGTGTTATCACTTTCAGTTGAGGG; R CTAGTTTGCTTGGAACAGCAACACATC) e 3939 (F CAAGAACAGAGGTCCTGC; R ATGTCAAGCTAGGTCCTAA). O desenho dos primers se baseou na sequência do transcrito obtida por (6).

Para as reações de PCR foi utilizada a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* e amplificadas em termocicladores *Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler*. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,0% em tampão SB 1X. Para verificar o tamanho dos fragmentos obtidos, o marcador de tamanho molecular de 1 kb Plus foi utilizado como guia. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotodigitalizadas em sistema de foto documentação *L.PIX-Molecular Imaging (Loccus Biotechnology)*.

Os produtos da amplificação, foram purificados com o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado

foi ligado ao vetor de clonagem *pCR@2.1-TOPO* (Invitrogen®) utilizando o *TOPO® TA Cloning®* Kit (Invitrogen®).

Por choque térmico, células de *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes foram transformadas. Três clones recombinantes de cada candidato a efetor foram selecionados e extraídos utilizando o Kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega)* seguindo as instruções do fabricante. A reação para sequenciamento foi preparada utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e sequenciador modelo ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.3 Caracterização dos polimorfismos em genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*

A análise dos polimorfismos nas sequências dos genes candidatos a efetores foi conduzida com base no sequenciamento do DNA de três isolados monouredinais de ocorrência brasileira, coletados em diferentes regiões e anos (vide Material e Métodos 3.1). Além disso, foram incluídas algumas sequências do secretoma predito por (6), bem como por (11) e da patente US20140283207 Dupont (18) (Tabela 7). As sequências dos respectivos candidatos identificados no secretoma descrito por (6), que utilizaram 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 (11), que trabalhou com o isolado Thai1 (coleção do laboratório da Universidade de Constança, localizado na Alemanha), por fim, o isolado GA-05 (Georgia, 2005) da patente US20140283207 Dupont (2014). O alinhamento foi conduzido no Programa BioEdit 7.0.5.3.

(Tabela 6)

Com base nas mutações sinônimas e não sinônimas identificadas foi determinado o tipo de seleção (Purificadora ou Diversificadora) que estaria atuando sobre os candidatos a efetores. Foram utilizados dois métodos de seleção baseados no codon. O primeiro método foi o Z-teste realizado no programa MEGA 7.0 (23), para selecionar tanto a análise par-a-par quanto a análise total dos códons. O parâmetro utilizado foi o método Nei-Gojobori (33) modificado com o conjunto de taxa de transição/transversão sendo 1. O segundo método empregado foi o de Nielsen e Yang (NY), utilizando o servidor Selecton server (34, 35, <http://selecton.tau.ac.il>) para identificar quais locais do codon estavam sob seleção diversificadora ou seleção purificadora, através da inferência Bayesiana. O modelo utilizado foi o M8 (36) e quando a seleção foi positiva, o modelo M8a (37) versus modelo M8 foi aplicado como teste estatístico para seleção diversificadora.

3.4 Diversidade genética de isolados de *P. pachyrhizi* com base em polimorfismos em genes candidatos a efetores

Para estimar a diversidade genética entre os isolados de *P. pachyrhizi* com base no sequenciamento de sete sequencias de genes candidatos a efetores, o alinhamento das sequências proteicas preditas dos candidatos obtidas de 3 isolados de *P. pachyrhizi* foi realizado com auxílio do programa MEGA 7.0 (23). Para o alinhamento foi também adicionado as sequências de candidatos efetores das famílias 1 (39 sequencias) e 3 (33 sequencias) obtidas por (6). Após a alinhamentos das sequencias, o programa MEGA 7.0 foi utilizado para gerar as árvores filogenéticas, através do método *Neighbor-Joining*. O suporte estatístico para o agrupamento filogenético foi obtido com as análises de *bootstrap*, utilizando 1000 repetições.

3.5 Análise estrutural dos genes candidatos a efetores

Para a identificação dos introns nas sequências do DNA dos candidatos efetores, os contigs gerados foram alinhados com as sequências de cDNA correspondentes do banco de dados de transcritos de *Phakopsora pachyrhizi* (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/phakopsora/>), bem como a busca das regiões flangeadoras GU...AG na intersecção de cada intron/exon. As estruturas foram visualizadas pelo Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) (38).

As sequências das proteínas preditas dos putativos efetores dos três isolados de *P. pachyrhizi* em conjunto com as proteínas da família 1 e 3 (6) foram submetidas a identificação de motivos conservados através do programa MEME (39). Os critérios de busca dos locais de motivos distribuídos nas sequências foram baseados em qualquer número de repetições e a seleção do número máximo de motivos que o MEME buscou foi de 10 motivos.

3.6 Perfil de expressão de genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*

3.6.1 Delineamento Experimental

Para avaliar o perfil de expressão gênica de seis candidatos efetores nos isolados monouredinais L.L.LD5511 e L.UB112 de *P. pachyrhizi*, foram desenvolvidos dois tipos de experimentos.

A- Perfil de expressão dos candidatos a efetores na ausência da planta hospedeira (amostras de esporos e esporos germinados, ambos obtidos de isolados monouredinais cultivados e mantidos *in vitro* em folhas destacadas de soja) sob condições de temperatura e umidade controladas em câmara climatizada. Os esporos germinados

foram obtidos a partir de esporos frescos, depositados em placa de Petri contendo solução de água com adição de 0,04% de Tween, onde permaneceram *overnight* durante 16 horas, enquanto aproximadamente 50 mg de esporos foram coletados de folhas destacadas de soja e utilizados diretamente para a extração de RNA.

B – Perfil de expressão de candidatos a efetores durante o ciclo infeccioso: o experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado, onde o perfil de expressão dos seis genes candidatos a efetores foi avaliado no decorrer do ciclo infeccioso utilizando dois diferentes isolados (L.L.LD5511 e L.UB112), com perfis de virulência distintos (Vide tabela 5). Plantas do genótipo suscetível ao fungo *P. pachyrhizi* (cultivar Williams 82) foram inoculadas com o fungo. O inóculo foi preparado por meio de uma solução de água com adição de 0,04% de Tween com a concentração dos esporos a 10^4 esporos.mL⁻¹. Para cada experimento, folhas infectadas destas interações compatíveis foram coletadas em diferentes tempos após a inoculação (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas após a inoculação (hai) a fim de representar a progressão da infecção e colonização do tecido hospedeiro pelo fungo. Uma vez coletados, fungo e planta foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Ambos os experimentos foram constituídos por três repetições biológicas, cada uma contendo três plantas.

3.6.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada com o kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), de acordo com procedimentos do fabricante, utilizando 100 mg de amostras congeladas de tecido foliar e de 1 mg de esporos e esporos germinados. O RNA foi quantificado utilizando o Nanodrop (Uniscience) e a sua integridade foi visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Para eliminação de DNA genômico, 1µg de RNA foi tratado com DNase livre de RNase (Invitrogen). Posteriormente, foi realizado a síntese de cDNA utilizando o kit *SuperScript III First Strand* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6.3 RT-qPCR

Para a análise de RT-qPCR, foram utilizados os *primers* para amplificação da região codante dos genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* conforme descrito por (6). As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento de *Real Time StepOnePlus™* (Applied Biosystems), utilizando a metodologia *SYBR green*. A eficiência dos *primers* foi calculada com base na equação $[10^{(-1/\text{slope})}]-1$ (40). Cada reação de PCR foi realizada em triplicata e a especificidade dos produtos da amplificação foi validada pela análise da curva de dissociação. Os níveis de expressão foram determinados através de quantificação

relativa calculada segundo a equação $2^{-\Delta Ct}$, onde 2 equivale a soma das eficiências dos *primers* do gene de interesse e do gene normalizador, e $\Delta Ct = (CT \text{ do gene de interesse} - CT \text{ do gene endógeno normalizador})$. O gene endógeno beta-tubulina foi utilizado como gene normalizador (41). As médias e o desvio padrão dos níveis de expressão foram calculados e o agrupamento hierárquico do \log_2 dos valores de Ct foi utilizado para agrupar os contigs baseados nos perfis de expressão (Cluster 3), resultando no dendograma e no heat map, dos quais foram visualizados no Tree View (42).

4. Conclusão

- A caracterização estrutural dos candidatos a efetores revelou a ocorrência de características intrínsecas a efetores de tais como: presença de peptídeo sinal, domínio DUF3129 para a família 1 e para a família 3 foram encontrados os motivos conservados [FY]xC e [AFY]xC, regiões de exons ricas em cisteínas e proteínas relativamente pequenas, além de sua conservação entre os diferentes isolados e membros de cada família de candidatos a efetores avaliados;
- As análises filogenéticas dos isolados para os genes candidatos efetores revelou agrupamentos similares aos descritos por De Carvalho et al (2016), sendo que no máximo 2 substituições não sinônimas foram evidenciadas nos candidatos 1784 e 5849;
- A comparação entre os níveis substituições sinônimas e não-sinônimas nas sequências codificadoras dos candidatos a efetores revelou que pelo menos 2 candidatos, 2238 e 5849, estão sob seleção diversificadora, porém, para os demais candidatos () os dados são inconclusivos, visto que o número de membros para estes candidatos foi menor em comparação aos candidatos 2238 e 5849;
- O padrão de virulência e diferentes polimorfismos observados entre os isolados para os genes candidatos a efetores parece não influenciar o perfil transcricional de cada candidato a efector, visto que com exceção dos efetores 1784, 5370 e 3939, os demais apresentaram perfil de expressão similar entre os diferentes isolados avaliados;

5. Perspectivas futuras

A inclusão de um número maior de isolados obtidos de diferentes regiões e de diferentes anos na análise poderá contribuir para revelar outros polimorfismos importantes nas proteínas candidatas a efetores de *P. pachryhzi*, inclusive permitindo inferir sobre tipo de forças de seleção que estaria atuando sobre tais genes. Adicionalmente, espera-se que encontre uma resposta de defesa diferencial entre as distintas regiões dos candidatos efetores, para possivelmente propor a importância dessa região.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES e a Embrapa Soja pelo suporte financeiro.

Referências

1. CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. Parceria público privada no combate à ferrugem asiática da soja. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/>. Acesso em: 29.abril. 2016.
2. Hartman G-L, Miles M-R, Frederick R-D (2005) Breeding for Resistance to Soybean Rust. *Plant Dis.* 89:664-666.
3. Jones J-D-G, Dangl J-L (2006) The plant immune system. *Nature* 444(7117):323–329.
4. LOWE R-G, HOWLETT B-J (2012) Indifferent, affectionate or deceitful: lifestyles and secretomes of fungi. *PLoS Pathog.* 8:e1002515 [10.1371/journal.ppat.1002515](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002515).
5. Duplessis S., Bakkeren G., Hamelin R (2014) Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics, *Adv Bot. Res.* 70 173-209 [10.1016/B978-0-12-397940-7.00006-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397940-7.00006-9).
6. De Carvalho M-C, Nascimento L-C, Darben, L-M, Podanosqui A-M-P, Caitar V-L, Qi M, Rocha C-S, Carazzolle M-F, Kuwahara M-K, Pereira G-A-G, Abdelnoor R-V, Whitham S-A, Guimarães F-C-M (2016) Prediction of the in planta *P. pachyrhizi* secretome and potential effector families. *Mol Plant Pathol.* Accepted Article.
7. Duplessis S, Hacquard S, Delaruelle C, Tisserant E, Frey P, Martin F, Kohler A (2011) *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:808–818.
8. Hacquard S, Joly D-L, Lin Y-C, Tisserant E, Feau N, Delaruelle C, Legué V, Kohler A, Tanguay P, Petre B, Frey P, Peer Y-V de, Rouzé P, Martin F, Hamelin R-C, Duplessis S (2012) A Comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populini* (Poplar Leaf Rust). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25(3):279-293.
9. Saunders D-G-O, Win J, Cano L-M, Szabo L-J, Kamoun S, Raffaele S (2012) Using Hierarchical clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *PLoS One*, 7(1), e29847. doi.org/10.1371/journal.pone.0029847
10. Cantu D, Segovia V, Maclean D, Bayles R, Chen X, Kamoun S, Dubcovsky J, Saunders D-G-O, Uauy C (2013) 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* 14(270):1-18.
11. Link T-I, Lang P, Scheffler B-E, Duke M-V, Graham M-A, Cooper B, Tucker M-L, Van de Mortel M, Voegelé R-T, Mendgen K, Baum T-J, Whitham S-A (2014) The Haustorial Transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and Their Candidate Effector Families. *Mol. Plant Pathol.* 15:379–393.
12. Nemri A, Saunders D-G-O, Anderson C, Udaphyaya N-M, Win J, Lawrence G-J, Jones D-A, Kamoun S, Ellis J-G, Dodds P-N (2014) The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. *Front. Plant Sci.* 5:1-14.
13. Bhadauria V, Maclachlan R, Pozniak C, Banniza, S (2015) Candidate effectors contribute to race differentiation and virulence of the lentil anthracnose pathogen *Colletotrichum lentis*. *BMC genom.* 16(628):2-21.

14. Sperschneider J, Ying H, Dodds P-N, Gardiner D-M, Upadhyaya N, Singh K-B, Manners J-M, Taylor J-M (2014) Diversifying selection in the wheat stem rust fungus acts predominantly on pathogen-associated gene families and reveals candidate effectors. *Front Plant Sci.* 5(372):1-13.
15. Stergiopoulos I, De Wit P-J-G-M (2009) Fungal Effector Proteins. *Ann. Rev. Phytopathology* 47:233–63.
16. Godfrey D, et al. (2010) Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* 11:317.
17. Cantu D, Govindarajulu M, Kozik A, Wang M, Chen X, Kojima K-K et al (2011) Next generation sequencing provides rapid access to the genome of *Puccinia striiformis f. sp. tritici*, the causal agent of wheat stripe rust. *PLoS ONE* 6(8).
18. Broglie K-E, Rairdan G-J (2014) Identification of *P. pachyrhizi* protein effectors and their use in producing asian soybean rust (asr) resistant plants. <https://www.google.com/patents/US20140283207>, Access 18 set. 2015.
19. DARBEN, L. Obtenção e caracterização molecular e fenotípica de isolados monouredinais de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões do Brasil. Maringá. Universidade Estadual de Maringá-PR, 2013, p. 81. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
20. Pedersen C, Themaat E-V-L-V, MCGUFFIN L, ABBOTT J-C, BURGIS T-A, BARTON G, BINDSCHEDLER L-V, LU X, MAEKAWA T, WEBLING R, CRAMER R, CHRISTENSEN H-T, PANSTRUGA R, SPANU P-D (2012) Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics* 13(694):1471-2164.
21. Aguilera G, Refrégier G, Yockteng R, Fournier E, Giraud T (2009) Rapidly evolving genes in pathogens: Methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists. *Infect Genet Evol.* 9:656–670.
22. Tosa Y, Osue J, Eto Y, Oh H, Nakayashiki H, Mayama S, Leong S (2005) Evolution of an avirulence gene, AVR1-CO39, concomitant with the evolution and differentiation of *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:1148–1160.
23. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870–1874.
24. Massingham T, Goldman N (2005) Detecting amino acid sites under positive selection and purifying selection. *Genetics* 169(3):1753-1762.
25. Allen R-L, Bittner-Eddy P-D, Grenville-Briggs L-J, Meitz, J-C, Rehmany A-P, Rose L- E and Beynon J-L (2004) Host-parasite co-evolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* 306:1957-1960.
26. Barrett L-G, Thrall P-H, Dodds P-N, Van Der Merwe M, Linde C-C, Lawrence G-J, Burdon J-J (2009) Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini*. *Mol. Biol. Evol.*, 26:2499-2513.
27. Rehmany A-P, Gordon A, Rose L-E, Allen R-L, Armstrong M-R, Whisson S-C, Kamoun S, Tyler B-M, Birch P-R-J, Beynon J-L (2005) Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* 17:839-1850.

28. Van Der Merwe M-M, Kinnear M-W, Barrett L-G, Dodds P-N, Ericson L, Thrall P-H, Burdon J-J (2009) Positive selection in AvrP4 avirulence gene homologues across the genus *Melampsora*. *Proc. R. Soc. B* 276:2913-2922.
29. Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva K-V, Cano L-M, Chaparro-Garcia A, Ammar R, Staskawicz B-J, Kamoun S (2007) Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *The Plant Cell* 19:349-2369.
30. Schornack S, Huitema E, Cano L-M, Bozkurt T-O, Oliva R, Van Damme M, Schwizer S, Raffaele S, Chaparro-Garcia A, Farrer R, Segretin M-E, Bos J, Haas B-J, Zody M-C, Nusbaum C, Win J, Thines M, Kamoun S (2009) Ten things to know about oomycete effectors. *Mol. Plant Pathol.* 10:795-803.
31. Nirmala J, Drader T, Chen X, Steffenson B, Kleinhofs A (2010) Stem rust spores elicit rapid RPG1 phosphorylation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:1635–1642.
32. Dellaporta S-L, Wood J, Hicks J-B (1983) A plant miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-20.
33. Suzuki Y, Gojobori T (1999) A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol. Biol. Evol.* 16:1315–1328.
34. Doron-Faigenboim A, Stern A, Bacharach E, Pupko T (2005) Selecton: a server for detecting evolutionary forces at a single amino-acid site. *Bioinformatics* 21(9):2101–2103.
35. Stern A, Doron-Faigenboim, A, Erez E, Martz E, Bacharach E, Pupko T (2007) Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acid Res.* 35:W506–W511.
36. Yang Z-H, Nielsen R, Goldman N, Pedersen A-M-K (2000) Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155(1):431–449.
37. Swanson W-J, Nielsen R, Yang Q (2003) Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins. *Mol. Biol. Evol.* 20:18-20.
38. Bo H, Jinpu J, An-Yuan Guo, He Zhang, Jingchu, L and Ge Gao (2015) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31(8):1296-1297.
39. Bailey T, Bodén M, Buske F, Frith M, Grant C-E, Clementi L, Ren J, Li W-W, Noble W-S (2009) "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching". *Nucleic Acids Res* 37:W202-W208.
40. Pfaffl, M. W (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(45).
41. Maciel T-E-F, Freire M-C-M, Almeida Á-M-R. de, Oliveira L-O de (2010) Molecular characterization of beta-tubulin from *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol. Plant Pathol.* 11:169–177.
42. Eisen M-B, Spellman P-T, Brown P-O, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS* 95:14863–14868.

Legenda de figuras

Figura 1 – Estrutura da proteína predita dos sete candidatos efetores de *P. pachyrhizi*. As caixas roxas representam as proteínas codificadas por diferentes genes, incluindo o peptídeo sinal (verde). Os principais motivos da família 1 estão representados em caixas azuis (2-[YFM][ST]C) e verdes (RCR). Os motivos conservados da família 3 estão representados pelas cores azuis ([AFY]xC) e vermelhas ([FY]xC). Os círculos correspondem ao domínio de função desconhecida (DUF3129) representando os candidatos da família 1. Os introns estão representados por linhas azuis com círculos na ponta e os exons estão marcados com números romanos. Genes contendo resíduos de cisteínas estão marcados com linhas verticais amarelas. Substituições de aminoácidos estão indicados por três letras. Polimorfismos gerados por substituições não sinônimas estão identificadas em setas verdes. Polimorfismos gerados por substituições sinônimas estão identificadas em forma de T. Ala, alanina; Arg, arginina; Asn, asparagina; Asp, ácido aspártico; Gln, glutamina; Glu, ácido glutâmico; Gly, glicina; His, histidina; Ile, isoleucina; Leu, leucina; Lys, lisina; Phe, fenilalanina; Pro, prolina; Ser, serina; Thr, threonina; Tyr, tirosina; Val, valina.

Figura 2 – Regiões de introns e exons (E+I), e apenas exons (E), dos sete genes candidatos efetores com o tamanho de cada sequência. Com a retirada dos introns, foi possível prever a proteína de cada candidato, todas com tamanhos inferiores que 200 pb.

Figura 3 – Motivos conservados dos candidatos efetores 2238, 5381, 5849 e 1784 (Família 1), bem como da sequência da patente US20140283207 (Dupont_126) e de Link *et al* (contig06191). Os motivos 2 e 3 foram expandidos para evidenciar os motivos conservados de cisteínas [Y/FxC] e o motivo RCR.

Figura 4 – Motivos conservados para os efetores 3939, 5370, 7164 e patente US20140283207 (Dupont_144). Foi expandido os motivos 1 e 2 para destacar os motivos conservados de cisteína [FY]xC e [AFY]xC evidenciados nos candidatos a efetores da família 3.

Figura 5 – Distribuição dos códons sob seleção diversificadora e purificadora. Sequências de proteínas e distribuição de aminoácidos sob seleção positiva e purificadora dos candidatos 2238 e 5849. Os resíduos foram coloridos de acordo com os valores calculados de Ka/Ks, através da ferramenta Selecton server (<http://selecton.tau.ac.il/>). Os locais com códons sob seleção positiva diversificadora estão destacados em laranja e os códons sob seleção purificadora estão marcados em roxo ou amarelo.

Figura 6 – Árvores filogenéticas construídas pelo método Neighbor-Joining (NJ) com base nas sequências de aminoácidos dos sete genes candidatos efetores para três isolados e membros da ordem Pucciniales. Os valores dos nós representam a análise de *bootstrap*. A) Árvore filogenética representando a família 1 incluindo os candidatos 2238, 5381, 5849 e 1784. B) Árvore filogenética da família 3, apresentando os putativos efetores 3939, 5370 e 7164. Pp – *Phakopsora pachyrhizi*, Ua – *Uromyces appendiculatus*, Pg – *Puccinia graminis*, MI – *Melampsora larici-populina*.

Figura 7 - Árvore filogenética das sequências de aminoácidos dos sete candidatos efetores (1784, 2238, 5381, 5849, 3939, 5370, 7164), do contig06191 (Link *et al.*, 2014), Dupont 126, Dupont 144 (patente Dupont, 2014). O ramo A pertence à família 3. O ramo B pertence à família 1.

Figura 8 – Polimorfismos observados entre os candidatos efetores 2238, 5849 e 5381. A) Alinhamento dos 3 candidatos demonstrando a sequência exclusiva para o 2238 (em vermelho) e a mudança na leitura da proteína. As sequências vermelhas destacadas em amarela demonstram o codon, e a letra em cima o aminoácido predito. B) Alinhamento das sequências referentes aos candidatos 2238 e 5849, e a inserção de uma base no contig06191 provocou a mudança de leitura na região C-terminal. O motivo conservado RCR e TMQ está destacado em vermelho e sublinhado.

Figura 9 – Alinhamento dos candidatos 5370 e 7164. Os aminoácidos destacados em vermelho demonstram as diferenças entre os dois candidatos. A caixa expandida contém as sequências de nucleotídeos com substituições de base entre os candidatos, no entanto, tais substituições foram sinônimas e não interferiram nas sequências de aminoácidos.

Figura 10 - *Heat map* e agrupamento de perfis de expressão de seis genes candidatos a efetores avaliando dois isolados monouredinais de *P. pachyrhizi* após 8 dias de infecção. Os contigs são pertencentes a família 1 e 3 (De Carvalho *et al.*, 2016). Legenda: ES – Esporo; EG – Esporo Germinado.

ANEXO B

Lista de Tabelas

observados entre os isolados
efetores

Polimorfismos gerados nas sequências dos candidatos efetores						
Efetor	Exon	Intron	Substituição Sinônima	Substituição não sinônima	Substituição Aminoácido	Total
1784	23	69	21	2	G-A/C-X	92
7164	13	33	13	0	-	46
2238	4	9	3	1	X-S	13
3939	2	0	2	0	-	2
5370	1	0	0	1	S-T	1
5381	3	4	2	1	A-D	7
5849	5	4	3	2	N-S/X-N	9

Tabela 1 - Polimorfismos para os sete candidatos

Tabela 2 - 1) Método de seleção Nei-Gojobori modificado: Teste de seleção positiva ou purificadora baseado no códon. A coluna da esquerda mostra o número de pares com seleção positiva significativa (z-tests nível de 5%) comparando com o número total de pares dentro de cada número de membros do candidato a efetor. As duas colunas da direita exibem valores de P, quando menores que 0,05 são considerados significativos a nível de 5 %. O parâmetro utilizado foi o Nei-Gojobori modificado (transition/transversion bias =1). O teste estatístico (dN-dS) e (dS-dN) estão destacados como seleção diversificadora e purificadora, respectivamente. dS = Substituição sinônima dN = Substituição não sinônima. **2) Resultados Selecton-server (Modelo de Nielsen e Yang):** Cálculo da seleção diversificadora ou purificadora baseado no códon utilizando o Selecton-server e baseou se na inferência Bayesiana (Doron-Faigenboim *et al.*, 2005). As colunas da esquerda indicam o número de códons sob seleção diversificadora. A coluna do meio exibe os níveis significativos do Modelo 8a versus modelo M8. A coluna da direita mostra a média dos valores de Ka/Ks calculados na proteína.

Seleção purificadora* Seleção diversificadora**.

Candidatos a efetores	Número de membros	Método de seleção Nei-Gojobori modificado ¹			Resultados Selecton-server ²		
		Z-test par-a-par Diversificadora	Z-test total Diversificadora P-value/(dN-dS)	Z-test total Purificadora* P-value/(dS-dN)	Codons sob seleção diversificadora**	Modelo M8 versus M8a P-values	Média Ka/Ks-value
1784	4	0/6	1,000/-4,648	0,000/4,721*	-	não testado	0,055*
2238	6	0/15	1,000/-1,766	0,357/0,367*	13/181**	0,001**	0,856*
3939	5	0/10	1,000/-1,440	0,078/1,429*	-	não testado	0,058*
5370	4	0/6	0,152/1,031	1,000/-1,043*	0/106	não significativo	0,751*
5381	4	0/6	1,000/-1,026	0,134/1,113*	-	não testado	0,212*
5849	5	0/10	1,000/-0,062	0,459/0,103*	10/155**	0,001**	1,44**
7164	4	0/6	1,000/-2,754	0,003/2,835*	-	não testado	0,055*

Tabela 3 – Níveis de expressão normalizados de seis candidatos a efetores em todos os tempos após inoculação. Os valores em parênteses representam os desvios padrão. O asterisco (*) destaca a expressão *up* regulada.

GENE	Níveis de expressão dos candidatos a efetores									Esporo	Esporo Germinado
	0 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	96 hpi	192 hpi			
1784 - L.UB112	0,541 (0,267)	18,569 (3,756)*	13,354 (0,375)*	0,324 (0,182)	0,422 (0,569)	0,053 (0,009)	0,035 (0,007)	0,028 (0,011)	0,403	0,157	
1784 - L.L.LD5511	0,494 (0,344)	9,591 (0,274)*	49,037 (2,479)*	2,278 (0,015)*	0,278 (0,209)	0,153 (0,092)	0,042 (0,007)	0,026 (0,004)	0,558	0,244	
2238 - L.UB112	0,144 (0,028)	0,765 (0,362)	0,137 (0,116)	0,063 (0,105)	0,003 (0,002)	0,002 (0,001)	0 (0,000)	0,061 (0,085)	0,159	0,023	
2238 - L.L.LD5511	0,217 (0,161)	0,459 (0,184)	0,335 (0,293)	0,009 (0,005)	0,002 (0,001)	0,002 (0,002)	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)	0,209	1,712	
3939 - L.UB112	0,041 (0,010)	1,496 (0,409)*	2,213 (0,991)*	2,927 (0,858)*	0,768 (0,249)	0,263 (0,027)	0,353 (0,030)	0,576 (0,052)	1*	0,543	
3939 - L.L.LD5511	0,067 (0,022)	1,773 (0,706)*	3,51 (1,752)*	0,996 (0,596)	0,351 (0,166)	0,354 (0,118)	0,393 (0,061)	0,883 (0,087)	2,363*	3,304*	
7164 - L.UB112	0,004 (0,005)	3,163 (1,532)*	26,68 (3,168)*	1,804 (0,595)*	1,049 (0,845)*	0,131 (0,131)	0,051 (0,043)	0,0001 (0,00)	0,016	0,607	
7164 - L.L.LD5511	0,013 (0,019)	1,121 (0,656)*	31,628 (1,809)*	1,908 (0,402)*	1,073 (0,385*)	0,306 (0,245)	0,034 (0,023)	0,004 (0,003)	0,007	2,741*	
5370 - L.UB112	6,451 (0,011)*	27,796 (5,186)*	27,492 (1,422)*	29,978 (0,567)*	0,1667 (0,103)	0,03 (0,022)	0,919 (1,261)	0,142 (0,178)	0,063	0,142	
5370 - L.L.LD5511	0,706 (0,420)	4,337 (1,421)*	45,92 (1,916)*	2,005 (1,515)*	3,292 (3,256)*	0,294 (0,283)	0,647 (0,490)	0,623 (0,799)	0,0095	0,0600	
5381 - L.UB112	509,98 (102,306)*	659,938 (181,476)*	134,05 (104,213)*	98,596 (151,208)*	4,268 (1,955)*	0,698 (0,337)	0,074 (0,040)	0,235 (0,218)	264,932*	541,989*	
5381 - L.L.LD5511	386,009 (14,821)*	425,201 (65,758)*	364,251 (65,190)*	25,575 (11,976)*	2,406 (0,966)*	0,786 (0,939)	1,148 (0,634)*	0,357 (0,266)	297,728*	57,781*	

Tabela 4 – Relação dos isolados com seus respectivos códigos, anos e locais de coleta, e o perfil de virulência na soja.

Código Isolado	Ano da coleta	Local	Perfil de virulência na soja	Haplótipo ITS1
L.L.LD5511	2011	Londrina-PR	Rpp1, Rpp2, Rpp3, Rpp5	8
L.UB112	2012	Uberlândia-MG	Rpp1, Rpp5, Rpp6	4
L.CV107	2007	Campo Verde-MT	Rpp1	12

Tabela 5 – Reações de Suscetibilidade (+), Resistência (-) e Intermediária (+/-) dos 3 isolados de *P. pachyrhizi* em 13 genótipos diferenciadores de soja (Darben, 2013).

Genótipos Diferenciadores de soja	Isolado		
	L.UB112	L.L.LD5511	L.CV107
PI 200492 Rpp1	+	+	+
PI 561356 Rpp1b	-	-	-
PI 230970 Rpp2	-	+	+/-
PI 462312 Rpp3	-	+	-
PI 459025 Rpp4	-	-	-
PI 200526 Rpp5	+	+	-
PI 567102B Rpp6	+	+/-	-
BRS 184	+	+	+

Tabela 7 – Sequências do secretoma predito por De Carvalho et al (2016), Link *et al* (2016) e Dupont (2014) com as respectivas famílias

	Código De Carvalho et al (2016)	Código Link et al, (2014)	Código Dupont (2014)	Família
1	de_novo_5370	-	-	familia_3
2	de_novo_3939	-	Dupont_144	familia_3
3	de_novo_7164	-	-	familia_3
4	de_novo_1784	-	-	familia_1
5	de_novo_2238	contig06191 Dupont_126		familia_1
6	de_novo_5381	contig06191 -		familia_1
7	de_novo_5849	contig06191 Dupont_126		familia_1

ANEXO C

POLIMORFISMOS DOS CANDIDATOS A EFETORES DA FAMÍLIA 1								
Candidato efetor 1784					Isolado			Carvalho et al
Código SNP	Posição	Varição nucleotídeo	Região	Efeito no Aminoácido	LD5511	LUB112	LCV107	de_novo 1784
SNP 1701	30	G>A	Exon 1	Ala10=MS	G	G	A	G
SNP 1702	35	C>A	Exon 1	Gly15=MS	A	C	C	C
SNP 1703	57	T>C	Exon 1	Gly19=MS	T	T	C	C
SNP 1704	63	C>T	Exon 1	Ile21=MS	C	C	T	T
SNP 1705	87	T>A	Exon 1	Ser29=MS	T	T	A	A
SNP 1706	107	C>-	Intron 1	Não traduzido	C	C	-	C
SNP 1707	115	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1708	116	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1709	134	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1710	140	T>A	Intron 1	Não traduzido	T	T	A	
SNP 1711	147	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1712	149	G>-	Intron 1	Não traduzido	-	-	G	
SNP 1713	168	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1714	170	A>C	Intron 1	Não traduzido	A	A	C	
SNP 1715	176	T>G	Intron 1	Não traduzido	T	T	G	
SNP 1716	177	T>A	Intron 1	Não traduzido	T	T	A	
SNP 1717	178	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1718	183	C>T	Intron 1	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1719	186	A>G	Exon 2	Gly30=MS	A	A	G	G
SNP 1720	210	C>T	Exon 2	Thr38=MS	C	C	T	T
SNP 1721	213	G>A	Exon 2	Ser39=MS	G	G	A	A
SNP 1722	216	T>C	Exon 2	Ile39=MS	T	T	C	C
SNP 1723	234	T>C	Exon 2	Ile46=MS	T	T	C	C
SNP 1724	264	T>A	Exon 2	Arg56=MS	T	T	A	A
SNP 1725	294	A>C	Exon 2	Ser66=MS	A	A	C	C
SNP 1726	306	A>T	Exon 2	Pro70=MS	A	A	C	A

SNP 1727	319	T>G	Intron 2	Não traduzido	T	T	G	
SNP 1728	342	A>G	Intron 2	Não traduzido	A	A	G	
SNP 1729	343	C>T	Intron 2	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1730	351	A>G	Intron 2	Não traduzido	A	A	G	
SNP 1731	358	T>C	Intron 2	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1732	362	T>C	Intron 2	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1733	379	A>T	Intron 2	Não traduzido	A	A	T	
SNP 1734	385	C>T	Intron 2	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1735	489	T>C	Intron 3	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1736	490	T>A	Intron 3	Não traduzido	T	T	A	
SNP 1737	502	C>T	Intron 3	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1738	509	T>G	Intron 3	Não traduzido	T	T	G	
SNP 1739	510	T>A	Intron 3	Não traduzido	T	T	A	
SNP 1740	515	C>A	Intron 3	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1741	520	T>C	Intron 3	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1742	529	A>T	Intron 3	Não traduzido	A	A	T	
SNP 1743	532	A>C>-	Intron 3	Não traduzido		A	C	
SNP 1744	546	C>T	Intron 3	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1745	548	C>T	Intron 3	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1746	551-567	GAAATGAAAA AAAAAAA>-	Intron 3	Não traduzido	-	-	GAAATGAAA AAAAAAA	
SNP 1747	580	A>-	Intron 3	Não traduzido	A		A	
SNP 1748	581	C>A	Intron 3	Não traduzido	C	C	A	
SNP 1749	583	C>T	Intron 3	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1750	635	C>T	Exon 4	Asp113=MS	C	C	T	T
SNP 1751	641	G>A	Exon 4	Glu115=MS	G	G	A	A
SNP 1752	702	C>A	Exon 4	Ser142=MS	C	C	A	C
SNP 1753	749	T>A	Intron 4	Não traduzido	T	T	A	
SNP 1754	750	C>-	Intron 4	Não traduzido	C	C	-	
SNP 1755	753	T>G	Intron 4	Não traduzido	T	T	G	
SNP 1756	755	C>T	Intron 4	Não traduzido	C	C	T	
SNP 1757	764	T>C	Intron 4	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1758	766	T>A	Intron 4	Não traduzido	T	T	A	
SNP 1759	768	A>T	Intron 4	Não traduzido	A	A	T	
SNP 1760	769	T>A	Intron 4	Não traduzido	T	T	A	

SNP 1761	770	T>G	Intron 4	Não traduzido	T	T	G	
SNP 1762	779	G>T	Intron 4	Não traduzido	G	G	T	
SNP 1763	787	T>A	Intron 4	Não traduzido	T	T	A	
SNP 1764	788	T>G	Intron 4	Não traduzido	T	T	G	
SNP 1765	790	A>-	Intron 4	Não traduzido	-	-	A	
SNP 1766	791	A>-	Intron 4	Não traduzido	-	-	A	
SNP 1767	792	T>-	Intron 4	Não traduzido	-	-	T	
SNP 1768	797	T>C	Intron 4	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1769	800	G>C	Intron 4	Não traduzido	G	G	C	
SNP 1770	818	T>C	Exon 5	Cys149=MS	T	T	C	T
SNP 1771	821	T>C	Exon 5	Thr150=MS	T	T	C	T
SNP 1772	830	T>C	Exon 5	Ala153=MS	T	T	C	C
SNP 1773	833	T>C	Exon 5	Asp154=MS	T	T	C	C
SNP 1774	845	C>T	Exon 5	Cys158=MS	C	C	T	T
SNP 1775	866	G>A	Intron 5	Não traduzido	G	G	A	
SNP 1776	875	A>G	Intron 5	Não traduzido	A	A	G	
SNP 1777	877	A>T	Intron 5	Não traduzido	A	A	T	
SNP 1778	881	A>T	Intron 5	Não traduzido	A	A	T	
SNP 1779	884	A>G	Intron 5	Não traduzido	A	A	G	
SNP 1780	893	G>A	Intron 5	Não traduzido	G	G	A	
SNP 1781	911	C>A	Intron 5	Não traduzido	C	C	A	
SNP 1782	921	A>T	Intron 5	Não traduzido	A	A	T	
SNP 1783	923	A>T	Intron 5	Não traduzido	A	A	T	
SNP 1784	925	T>A	Intron 5	Não traduzido	T	T	A	
SNP 1785	928	G>T	Intron 5	Não traduzido	G	G	T	
SNP 1786	934	T>-	Intron 5	Não traduzido	T	-	T	
SNP 1787	941	T>-	Intron 5	Não traduzido	T	-	T	
SNP 1788	944	A>-	Intron 5	Não traduzido	A	-	A	
SNP 1789	945	T>C	Intron 5	Não traduzido	T	T	C	
SNP 1790	973	G>C	Exon 6	Gly172Ala	G	G	C	G
SNP 1791	977	C>T	Exon 6	Ser173=MS	C	C	T	T
SNP 1792	995	A>-	Exon 6	Gln179X	A	-	A	A

Candidato efetor 2238					Isolado			Carvalho et al	DuPont	Link et al
					LD5511	LUB112	LCV107	de_novo 2238	DuPont_126	contig06191
SNP 2201	101	C>T	Exon 1	Asn35=MS	C	T	T	C	T	-
SNP 2202	152	T>C	Exon 1	Gly52=MS	T	T	T	T	C	T
SNP 2203	172	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C			
SNP 2204	382	A>T	Intron 2	Não traduzido	T	A	A			
SNP 2205	387	C>T	Intron 2	Não traduzido	T	C	C			
SNP 2206	406	A>T	Intron 2	Não traduzido	T	A	A			
SNP 2207	446	A>C	Exon 3	Gly105=MS	C	A	A	C	A	
SNP 2208	542	C>T	Intron 3	Não traduzido	T	C	C			
SNP 2209	667	A>T	Exon 4	Lys157=MS	A	A	A	A	T	A
SNP 2210	805	A>-	Exon 5	Asn181X	-	-	-	-	-	A
SNP 2211	839	T>A	Intron 5	Não traduzido	T	T	A			
SNP 2212	850	G>C	Intron 5	Não traduzido	C	G	G			

Candidato efetor 5849					Isolado			Carvalho et	Link et al	
					LD5511	LUB112	LCV107	de_novo 5849	contig06191	
SNP 5801	36	T>C	Exon 1	Asn12=MS	T	T	T	C	-	
SNP 5802	186	T>C	Exon 2	Ser39=MS	T	T	T	C	-	
SNP 5803	463	T>-	Intron 2	Não traduzido	T	-	T			
SNP 5804	464	T>-	Intron 2	Não traduzido	T	-	-			
SNP 5805	559	C>T	Exon 3	Asn94=MS	C	C	C	T		
SNP 5806	570	A>G	Exon 3	Ser98Asn	G	A	A	A	C	
SNP 5807	687	T>-	Intron 3	Não traduzido	-	T	T			
SNP 5808	740	A<-	Exon 4	X133Asn	-	-	-	-	A	
SNP 5809	774	T>A	Intron 4	Não traduzido	A	T	T			

Candidato efetor 5381					Isolado			Carvalho et al
					LD5511	LUB112	LCV107	de_novo 2238
SNP 5301	36	C>T	Exon 1	Asn12=MS	C	C	T	C
SNP 5302	90	C>T	Exon 1	Thr30=MS	C	C	T	T
SNP 5303	107	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C	
SNP 5304	317	T>A	Intron 2	Não traduzido	T	T	A	
SNP 5305	322	T>C	Intron 2	Não traduzido	T	T	C	
SNP 5306	341	T>A	Intron 2	Não traduzido	T	T	A	
SNP 5307	381	C>A	Exon 3	Asp75Ala	C	C	A	A

POLIMORFISMOS DOS CANDIDATOS A EFETORES DA FAMÍLIA 3								
Candidato efetor 7164					Isolado			Carvalho et al
					LD5511	LUB112	LCV107	de_novo 7164
SNP 7101	187	C>T	Exon 1	Val34=MS	C	C	T	C
SNP 7102	241	C>T	Intron 1	Não traduzido	C	C	T	
SNP 7103	252	G>T	Intron 1	Não traduzido	G	G	T	
SNP 7104	253	A>G	Intron 1	Não traduzido	A	A	G	
SNP 7105	259	A>-	Intron 1	Não traduzido	-	-	A	
SNP 7106	267	C>T	Intron 1	Não traduzido	C	C	T	
SNP 7107	271	T>A	Intron 1	Não traduzido	T	T	A	
SNP 7108	274	T>C	Intron 1	Não traduzido	T	T	C	
SNP 7109	283	G>T	Intron 1	Não traduzido	T	T	G	
SNP 7110	311	T>A	Intron 1	Não traduzido	T	T	A	
SNP 7111	322	T>C	Exon 3	Thr42=MS	T	T	C	T
SNP 7112	334	A>G	Exon 3	Pro51=MS	A	A	G	A
SNP 7113	343	T>A	Exon 3	Gly54=MS	T	T	A	T
SNP 7114	358	T>C	Exon 3	Thr59=MS	T	T	C	T
SNP 7115	361	T>C	Exon 3	Pro60=MS	T	T	C	T
SNP 7116	364	C>T	Exon 3	Ser61=MS	C	C	T	C
SNP 7117	391	G>C	Exon 3	Gly70=MS	G	G	C	G
SNP 7118	406	G>A	Exon 3	Arg75=MS	G	G	A	A

SNP 7119	417	T>A	Intron 2	Não traduzido	T	T	A	
SNP 7120	419	C>A	Intron 2	Não traduzido	C	C	A	
SNP 7121	420	A>G	Intron 2	Não traduzido	A	A	G	
SNP 7122	421	G>A	Intron 2	Não traduzido	G	G	A	
SNP 7123	504	T>C	Intron 2	Não traduzido	T	T	C	
SNP 7124	546	T>C	Exon 4	Phe86=MS	T	T	C	T
SNP 7125	567	C>T	Exon 4	Ser93=MS	C	C	T	C
SNP 7126	585	A>C	Intron 4	Não traduzido	A	A	C	
SNP 7127	589	T>C	Intron 4	Não traduzido	T	T	C	
SNP 7128	591	A>G	Intron 4	Não traduzido	A	A	G	
SNP 7129	592	T>C	Intron 4	Não traduzido	T	T	C	
SNP 7130	609	G>A	Intron 4	Não traduzido	G	G	A	
SNP 7131	610	G>A	Intron 4	Não traduzido	G	G	A	
SNP 7132	616	C>A	Intron 4	Não traduzido	C	C	A	
SNP 7133	617	A>T	Intron 4	Não traduzido	A	A	T	
SNP 7134	622	A>-	Intron 4	Não traduzido	A	A	-	
SNP 7135	623	T>-	Intron 4	Não traduzido	T	T	-	
SNP 7136	627	C>T	Intron 4	Não traduzido	C	C	T	
SNP 7137	644	G>A	Intron 4	Não traduzido	G	G	A	
SNP 7138	646	A>C	Intron 4	Não traduzido	A	A	C	
SNP 7139	654	C>A	Intron 4	Não traduzido	C	C	A	
SNP 7140	666	T<-	Intron 4	Não traduzido	-	-	T	
SNP 7141	670	A<-	Intron 4	Não traduzido	-	-	A	
SNP 7142	671	T>A	Intron 4	Não traduzido	T	T	A	
SNP 7143	672	G>A	Intron 4	Não traduzido	G	G	A	
SNP 7144	682	G>A	Intron 4	Não traduzido	G	G	A	
SNP 7145	689	C>T	Exon 5	Thr97=MS	C	C	T	C

Candidato efetor 3939					Isolado			Carvalho et al	DuPont
					LD5511	LUB112	LCV107	de_novo 3939	DuPont_144
SNP 3901	89	C>T	Exon 1	Cys30=MS	C	C	C	C	T
SNP 3602	372	G>A	Exon 3	Glu64=MS	G	G	G	A	T

Candidato efetor 5370					Isolado			Carvalho et al
					LD5511	LUB112	LCV107	de_novo 3939
SNP 7001	586	G>C	Exon 4	Ser97Thr	G	G	G	C

ANEXO D



Manuscript Submission

Initial Submission.

All authors must submit their articles at www.PNAScentral.org. Only a single PDF file containing all text, figures, tables, and SI is required for initial Direct Submissions and initial Contributed Submissions. High-resolution files are not required for initial submission. The corresponding author (for initial Direct Submissions and initial PNAS PLUS articles) must include the following information for each coauthor: author order, first name, last Name, email address, and institution. Authors may upload a cover letter (optional), video files, and datasets separately. A length estimate is not required for initial submissions, but 6-page articles should be under 49,000 characters (including spaces, figures, and tables) and 10-page articles under 82,000. PNAS Plus submissions undergo the same review process as Direct Submissions. Authors writing their papers in LaTeX should use our [LaTeX template](#). Authors will need to complete the [License to Publish](#) form and provide permissions for any [previously published material](#).

Revised and Contributed Submission.

Authors of final Contributed papers, revisions, or resubmissions must provide publication-ready source files; guidelines for submitting source files appear below. Publication-ready file formats include Word and LaTeX. Only one article text file should be submitted. SI text files should be uploaded separately. Figures and tables should not be included in main or SI text files.

Manuscript Length.

PNAS generally uses a two-column format averaging 67 characters, including spaces, per line. The maximum length of a regular research article is 6 pages (or 10 pages for PNAS Plus articles), including all text, spaces, and the number of characters displaced by figures, tables, and equations.

An [online submission tool](#) provides authors with an estimation of whether their manuscript fits within the PNAS length requirements (see [Length Estimate Guidelines](#) and [FAQ](#)). When submitting tables, figures, and/or equations in addition to text, keep the text for your manuscript under 39,000 characters (including spaces) for 6-page articles and 65,000 for 10-page articles.

Digital Figures.

High-resolution figure files are not required for initial submissions. Resolution of at least 300 dpi for all figures is required. Only TIFF, EPS, PowerPoint, and high-resolution PDF for Mac or PC are allowed for figures that will appear in the main text. Authors may submit PRC or U3D files for 3D images; these must be accompanied by 2D representations in TIFF, EPS, or high-resolution PDF format. (See [S/](#) below for supplementary material.) Color images must be in RGB (red, green, blue) mode. Include the font files for any text. Images must be final size, preferably one column width (8.7 cm). Figures wider than one column should be sized to 11.4 cm or 17.8 cm wide. Numbers, letters, and symbols should be no smaller than 6 points (2 mm) and no larger than 12 points (6 mm) after reduction and must be consistent. Composite figures must be preassembled. Figures must be submitted as separate files, not

embedded in manuscript text. See the [Digital Art Guidelines](#). Figures and tables may be enlarged to improve legibility of text.

Tables.

Each table should have a brief title above the table. Table footnotes should be below the table. Tables must be submitted as separate files, not embedded in the manuscript text. Publication-ready formats include Word and LaTeX.

SI.

The main text of the paper must stand on its own without the [SI](#). Refer to SI in the manuscript at an appropriate point in the text. Number supporting figures and tables starting with S1, S2, etc. Authors are limited to no more than 10 SI files, not including movie files.

Authors who place detailed materials and methods in SI must provide sufficient detail in the main text methods to enable a reader to follow the logic of the procedures and results and also must reference the online methods. If a paper is fundamentally a study of a new method or technique, then the methods must be described completely in the main text.

Because PNAS edits SI and composes it into a single PDF, authors must provide the following file formats only:

- *Text*: Supply Word, RTF, or LaTeX files (LaTeX files must be accompanied by a PDF with the same file name for visual reference).
- *Figures*: Provide a brief legend for each supporting figure after the supporting text. Provide figure images in TIFF, EPS, PowerPoint, high-resolution PDF, JPEG, or GIF format; figures may not be embedded in manuscript text. When saving TIFF files, use only LZW compression; do not use JPEG compression. Do not save figure numbers, legends, or author names as part of the image. Composite figures must be preassembled.
- *3D figures*: Supply a composable U3D or PRC file so that it may be edited and composed. Authors may submit a PDF file but please note it will be published in raw format and will not be edited or composed.
- *Tables*: Supply Word, RTF, or LaTeX files (LaTeX files must be accompanied by a PDF with the same file name for visual reference); include only one table per file. Do not use tabs or spaces to separate columns in Word tables.
- *Datasets*: Supply Excel (.xls), RTF, PDF, CSV, or TXT files. This file type will be published in raw format and will not be edited or composed.
- *Movies*: Supply Audio Video Interleave (avi), Quicktime (mov), Windows Media (wmv), animated GIF (gif), or MPEG files and submit a brief legend for each movie in a Word or RTF file. All movies should be submitted at the desired reproduction size and length. Movies should be no more than 10 MB in size.
- *Still images*: Authors must provide a still image from each video file. Supply TIFF, EPS, high-resolution PDF, JPEG, or GIF files.
- *Appendices*: PNAS prefers that authors submit individual source files to ensure readability. If this is not possible, supply a single PDF file that contains all of the SI associated with the paper. This file type will be published in raw format and will not be edited or composed.

Journal Cover Figures.

Authors are invited to submit scientifically interesting and visually arresting cover images. For examples, see www.pnas.org/coverarchive. Illustrations need not be reprinted in the article but should be representative of the work. Images should be original, and authors grant PNAS the exclusive license to publish. Include a brief lay-language caption (50–60 words) and

credit information (e.g., Image courtesy of...). Images should be 21 cm wide by 22.5 cm high. Files should be EPS or TIFF and should be in RGB (red, green, blue) color mode. Cover figure files may be submitted online when the paper is submitted or may be sent to PNASCovers@nas.edu; contact PNAS for instructions on submitting large files. Submissions provided outside the online submission system should include manuscript number, author name, phone, and email.

Manuscript Format

Manuscript Order.

Many authors find it useful to organize their manuscripts with the following order of sections; title page, abstract, significance statement, introduction, results, discussion, materials and methods, acknowledgments, references, and figure legends. Provided that authors present information clearly and concisely, other variations to this format are allowed. Number all manuscript pages starting with the title page as page 1.

Title Page. Please note that information entered in the submission form will be used for publication purposes (e.g., author contact information and affiliations). Please also include the following information on the title page:

- *Classification:* Select a major (Physical, Social, or Biological Sciences) and a minor category from the following. Dual classifications are permitted between major categories and in exceptional cases, subject to Editorial Board approval, within a major category.
- **PHYSICAL SCIENCES:** Applied Mathematics; Applied Physical Sciences; Astronomy; Chemistry; Computer Sciences; Earth, Atmospheric, and Planetary Sciences; Engineering; Environmental Sciences; Mathematics; Physics; Statistics; and Sustainability Science.
- **SOCIAL SCIENCES:** Anthropology; Economic Sciences; Environmental Sciences; Political Sciences; Psychological and Cognitive Sciences; Social Sciences; and Sustainability Science.
- **BIOLOGICAL SCIENCES:** Agricultural Sciences; Anthropology; Applied Biological Sciences; Biochemistry; Biophysics and Computational Biology; Cell Biology; Developmental Biology; Ecology; Environmental Sciences; Evolution; Genetics; Immunology and Inflammation; Medical Sciences; Microbiology; Neuroscience; Pharmacology; Physiology; Plant Biology; Population Biology; Psychological and Cognitive Sciences; Sustainability Science; and Systems Biology.
- *Title:* Titles should be no more than three typeset lines (generally 135 characters including spaces) and should be comprehensible to a broad scientific audience. The specific organism studied should be included. Please provide a short title of fewer than 50 characters including spaces for mobile devices and RSS feeds.
- *Author Affiliation:* Include department, institution, and complete address, with the ZIP/postal code, for each author. Use superscripts to match authors with institutions. Authors are encouraged to supply their ORCID iD at submission.
- *Corresponding Author:* The name, complete address, telephone number, and email address of the author to whom correspondence and proofs should be sent. Email addresses will appear in the article footnotes.
- *Keywords:* Keywords are listed below the abstract of the published article. At least three keywords are required at submission.

Abstract. Provide an abstract of no more than 250 words on page 2 of the manuscript. Abstracts should explain to the general reader the major contributions of the article. References in the abstract must be cited in full within the abstract itself and cited in the text.

Significance Statement. Authors must submit a 120-word-maximum statement about the significance of their research paper written at a level understandable to an undergraduate-educated scientist outside their field of specialty. The primary goal of the Significance Statement is to explain the relevance of the work in broad context to a broad readership. The Significance Statement appears in the paper itself and is required for all research papers.

Text. Describe procedures in sufficient detail so that the work can be repeated. Methods must be presented after results and discussion. Follow the spelling and usage given in *Webster's Third New International Dictionary* or the *Random House Dictionary of the English Language*. Avoid laboratory jargon. Correct chemical names should be given, and strains of organisms should be specified. Trade names should be identified by an initial capital letter with the remainder of the name lowercase. Names of suppliers of uncommon reagents or instruments should be provided. Use *Système International* units and symbols whenever possible. Statements of novelty and priority are not permitted in the text.

- **Language-Editing Services:** Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use a language-editing service (see list at www.pnas.org/site/authors/language-editing.xhtml). PNAS does not take responsibility for or endorse these services, and their use has no bearing on acceptance of a manuscript for publication.
- **Use of URLs in Text:** As a publisher, PNAS must be able to archive the data essential to a published article. Where such archiving is not possible, deposition of data in public databases, such as GenBank, ArrayExpress, Protein Data Bank, Unidata, and others outlined in the Information for Authors, is acceptable. Only links to websites that are permanent public repositories, such as self-perpetuating online resources funded by government, academia, and industry, are permitted. Links to an author's personal web page are not acceptable. PNAS allows authors to post their PNAS paper on their home page after the paper is published in PNAS.
- **Gene Nomenclature:** Prior to submission, authors should consult [Genecards](#), or [MGI Nomenclature page](#), or [HUGO Gene Nomenclature Committee](#), or equivalent resources, to ensure standardized nomenclature is used for species-specific gene and protein names. For proposed gene names that are not already approved, please submit the gene symbols to the appropriate nomenclature committee as these must be deposited and approved before publication of the article.
- **Abbreviations:** Abbreviations should be accessible to a broad scientific audience; abbreviations that are specific to a particular field should be defined at first mention in the text.
- **Nomenclature and Style:** Use international standards on nomenclature. PNAS uses *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (8th edition, 2014) as the primary style guide.

Footnotes. PNAS distinguishes author affiliations and footnotes from in-text footnotes by assigning a different set of footnote symbols to each type. Superscript lowercase letters separated by commas (no spaces) are used for author affiliations. Superscript numerals separated by commas (no spaces) are used for author footnotes. In-text footnotes should be preceded by a footnote symbol, used in the order *, †, ‡, §, ¶, #, ||, **, ††, ‡‡, §§, ¶¶, ##.

Acknowledgments. List acknowledgments and funding sources. PNAS collaborates with [FundRef](#) to use a standard taxonomy of funder names. Dedications are rarely allowed.

References. References must be in PNAS style. Only published or in-press papers and books may be cited in the reference list. For references to in-press articles, please confirm with the cited journal that the article is in press and include a DOI number and online publication date. Unpublished abstracts of papers presented at meetings or references to "data not shown" are not permitted. References should be cited in numerical order as they appear in text, and all references, including for the SI, should be included in the main manuscript file. Because tables and figures will be inserted in the text where first cited,

references in these sections should be numbered accordingly. **Include the full title for each cited article.** All authors may be named in the citation for initial submissions. For revisions or final submissions, if there are more than five authors, list the first author's name followed by et al. Provide inclusive page ranges for journal articles and book chapters. Provide date of access for online sources

Journal articles are cited as follows:

10. Neuhaus J-M, Sitcher L, Meins F, Jr, Boller T (1991) A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22):10362-10366.

Cite research datasets in the references if they have a DOI, and list the authors, title, publisher (repository name), and identifier (DOI in URL format) as follows:

12. van Seville E, Doblin M (2016) Data from "Drift in ocean currents impacts intergenerational microbial exposure to temperature. Figshare.<https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.3178534.v2>.

Use MEDLINE/PubMed abbreviations of journal titles or use the full journal title for any journals not indexed in MEDLINE.

Articles or chapters in books are cited as follows:

14. Hill AVS (1991) HLA associations with malaria in Africa: some implications for MHC evolution. *Molecular Evolution of the Major Histocompatibility Complex*, eds Klein J, Klein D(Springer, Heidelberg), pp 403-420.

Figure Legends. Provide these separately from figures, after the references in the manuscript. For figures with multiple panels, the first sentence of the legend should be a brief overview of the entire figure; each panel must be explicitly referenced and described at least once in the figure legend. Graphs should include clearly labeled error bars described in the figure legend. Authors must state whether a number that follows the \pm sign is a standard error (SEM) or a standard deviation (SD). The number of independent data points (N) represented in a graph must be indicated in the legend. Numerical axes on graphs should go to 0, except for log axes.