

BERNARDO DO VALE ARAÚJO MELO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO TEMPORAL DE OITO GENES CANDIDATOS A EFETORES DE *Phakopsora pachyrhizi* E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS CODIFICADAS EM *Nicotiana benthamiana***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

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

T

M528a  
2019  
Melo, Bernardo do Vale Araújo, 1994-  
Análise da expressão temporal de oito genes candidatos a efetores de *Phakopsora pachyrhizi* e localização subcelular das proteínas codificadas em *Nicotiana benthamiana* / Bernardo do Vale Araújo Melo. – Viçosa, MG, 2019.  
iv, 57 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Herminio Brommonschenkel.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 46-57.

1. Ferrugem-da-soja. 2. Virulência (Microbiologia).  
3. Microscopia confocal. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

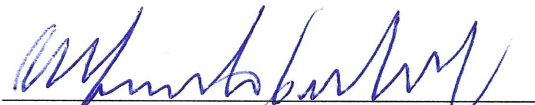
CDD 22. ed. 632.492

BERNARDO DO VALE ARAÚJO MELO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO TEMPORAL DE OITO GENES CANDIDATOS A EFETORES DE *Phakopsora pachyrhizi* E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS CODIFICADAS EM *Nicotiana benthamiana***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2019.

  
Francisco Murilo Zerbini Júnior

  
Marisa Vieira de Queiroz

  
Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Orientador)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 A soja [ <i>Glycine Max</i> (L.) Merrill] .....	3
2.2 <i>Phakopsora pachyrhizi</i> , agente causal da Ferrugem Asiática da Soja.....	5
2.3 Controle da ferrugem asiática da soja .....	6
2.4 Sistema imune vegetal e proteínas efetoras .....	7
2.5 Identificação e caracterização funcional de efetores .....	10
2.5.1 Estudo de localização subcelular de CSEPs marcados com fluorescência .....	13
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 Seleção e caracterização dos genes candidatos a efetores de <i>P. Pachyrhizi</i> para os estudos funcionais .....	17
3.2 Análise da expressão gênica dos candidatos a efetores de <i>P. pachyrhizi</i> isolado PPUFV02 durante a interação com a soja .....	17
3.3 Obtenção dos clones de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com vetores pK7FWG2 contendo genes candidatos a efetores de <i>P. pachyrhizi</i> do isolado PPUFV02.....	18
3.4 Cultivo de plantas de <i>N. benthamiana</i> .....	20
3.5 Expressão transiente das proteínas candidatas a efetores de <i>P. pachyrhizi</i> isolado PPUFV02 fusionadas a GFP em <i>N. benthamiana</i> para avaliação da localização subcelular .....	20
<b>4 RESULTADOS</b> .....	23
4.1 Características estruturais dos genes candidatos a efetores de <i>P. pachyrhizi</i> selecionados para estudos funcionais .....	23
4.2 Análise da expressão gênica dos candidatos a efetores de <i>P. pachyrhizi</i> isolado PPUFV02 durante a interação com a soja .....	27
4.3 Análise da localização subcelular das proteínas candidatas a efetoras fusionadas a GFP em <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	31
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46

## RESUMO

MELO, Bernardo do Vale Araújo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Análise da expressão temporal de oito genes candidatos a efetores de *Phakopsora pachyrhizi* e localização subcelular das proteínas codificadas em *Nicotiana benthamiana*.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Durante a sua interação com a soja, o fungo *Phakopsora pachyrhizi* secreta e transloca para a célula vegetal várias proteínas efetoras com função de suprimir as respostas de defesa e/ou favorecer o seu parasitismo. Por meio da análise do transcrito da interação soja-*Phakopsora pachyrhizi* vários genes que codificam proteínas candidatas a efetoras já foram identificados, mas a função da maioria dessas proteínas na patogênese ainda é desconhecida. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, analisando a sua expressão temporal durante a infecção e localização subcelular das proteínas codificadas. Para isso, candidatos a efetores obtidos a partir de estudos de proteômica e transcritômica foram analisados e oito genes (*EC3318*, *EC23*, *CSEP07*, *CSEP09*, *RTP1*, *HESP-C49*, *PHPA\_29* e *PHPA\_43*) foram selecionados, com base na expressão durante a infecção, presença de sequência codificadora do peptídeo sinal de secreção e alta identidade com genes que codificam proteínas efetoras de outras espécies de fungos causadores de ferrugens. Os genes selecionados apresentaram diferentes padrões de expressão, mas a maioria apresentou pico de expressão 24 horas após a inoculação, momento de início de formação dos haustórios do patógeno. As proteínas fusionadas a GFP foram expressas em folhas de *Nicotiana benthamiana* juntamente com proteínas marcadoras de compartimentos subcelulares e observadas em microscópio confocal de varredura a laser. A proteína *EC23* se localizou exclusivamente no citoplasma, enquanto as proteínas *EC3318*, *CSEP07*, *CSEP09*, *Hesp-C49*, *PHPA\_29* e *PHPA\_43* se localizaram no citoplasma e no núcleo. O padrão de expressão dos genes e a localização subcelular das proteínas codificadas são condizentes com um provável papel efetor durante a patogênese em soja.

## ABSTRACT

MELO, Bernardo do Vale Araújo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Temporal expression of eight *Phakopsora pachyrhizi* effector candidate genes and subcellular localization of the encoded proteins in *Nicotiana benthamiana*.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

During its interaction with soybeans, the fungus *Phakopsora pachyrhizi* secretes and translocates several effector proteins into the plant cell to suppress defense responses and/or to facilitate its parasitism. Through transcriptome analysis of the interaction between *P.pachyrhizi* and soybean, several candidate genes encoding putative effector proteins have been identified, but the function of the majority of these proteins in pathogenesis is still unknown. The objective of this study was to characterize *P. pachyrhizi* effector candidate genes, analyzing their temporal expression during infection and investigating the possible subcellular targets of the encoded proteins. Effector candidates sequences obtained from transcriptomics studies were analyzed and eight genes (EC3318, EC23, CSEP07, CSEP09, RTP1, HESP-C49, PHPA\_29 and PHPA\_43) were selected based on their expression during infection, presence of sequence encoding signal peptide for secretion and high identity with genes that encode effector proteins in others rust fungi. Different expression patterns were observed but most of the genes showed expression peaks 24 hours after the inoculation, stage in which the haustoria formation begins. GFP-fused proteins were expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves together with fluorescence-tagged proteins that are markers of subcellular compartments. The EC23 protein was located exclusively in the cytoplasm, while EC3318, CSEP07, CSEP09, HEPEP-C49, PHPA\_29 and PHPA\_43 located in the cytoplasm and also in the cell nucleus, The gene expression pattern and the subcellular localization of the encoded proteins strongly indicate that the selected genes encode *P. pachyrhizi* effectors.

## 1 INTRODUÇÃO

A soja é um grão com múltiplas possibilidades de usos, desde a alimentação humana e animal até a produção de óleos lubrificantes, biodiesel e desinfetantes. O seu principal uso é na produção de ração animal, em função do seu alto teor de proteína e baixo custo de produção, sendo o principal insumo utilizado para suprir a necessidade proteica dos animais. Em decorrência da importância dessa leguminosa nas atividades humanas, a área plantada de soja no mundo ocupa cerca de 124 milhões de hectares, destes, 35 milhões estão no Brasil, segundo maior produtor mundial dessa leguminosa (CONAB, 2018; USDA, 2018).

A produtividade média brasileira é de 3299 kg/ha, representando uma produção de quase 117 milhões de toneladas do grão, porém a ocorrência de pragas e doenças é um fator que afeta o teto produtivo. A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das doenças de maior impacto na produção de soja no país, gerando um custo estimado de US\$ 2 bilhões por ano, somado os custos de controle e perdas de produção (Godoy *et al.*, 2016; USDA, 2018).

*P. pachyrhizi* é um fungo biotrófico pertencente ao filo Basidiomycota, que infecta mais de 30 espécies de leguminosas. Em soja, a infecção pode ocorrer em hastas, pecíolos, vagens ou folhas; a redução da área fotossintética devido as lesões e a desfolha precoce levam à redução da produtividade. O ciclo completo de vida de *P. pachyrhizi* ainda não foi totalmente esclarecido. Teliósporos já foram descritos e sua germinação foi obtida em condições de laboratório (Saksirirat e Hoppe, 1991). Todavia, até o momento não se demonstrou a infectividade de basidiósporos na soja. Até o momento, são desconhecidos os estágios de pécnio e écio (Bromfield, 1984; Goellner *et al.*, 2010).

Com o desenvolvimento da doença, as urédias presentes na face abaxial das folhas infectadas se rompem e liberam os uredósporos que são dispersos a longas distâncias pelo vento possibilitando a reinfecção da planta ou infecção de outras plantas em campo (Andrade e Andrade, 2002).

Durante a infecção da soja, *P. pachyrhizi* secreta várias proteínas, denominadas proteínas efectoras, com a função de suprimir as respostas de defesa da planta e promover o parasitismo (Link *et al.*, 2014). Com a redução dos custos de sequenciamento de DNA, a caracterização dos genomas de fitopatógenos e a caracterização de seu repertório gênico têm se tornado mais acessível, facilitando a identificação e caracterização de genes candidatos a efetores para patógenos causadores de ferrugens. Com isso, houve um

aumento significativo no número de estudos com efetores, assim como do número de sequências caracterizadas e depositadas nos bancos de dados, o que facilita a predição e análise comparativa de sequências gênicas (Lorrain *et al.*, 2018). Por exemplo, De Carvalho *et al.* (2017) fez a predição de 851 genes de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas expressas *in planta*. Algumas destas proteínas podem estar relacionadas à supressão das respostas de defesa vegetal, atuando como efetores. Todavia, com exceção do efector PpEC23 (Qi *et al.*, 2016) nenhum outro efector de *P. pachyrhizi* foi caracterizado funcionalmente.

A impossibilidade de usar ferramentas tradicionais de transformação e estudos genéticos de associação, empregados em fungos de modo geral, dificultam o estudo funcional de efetores em *P. pachyrhizi*. O método mais comum para estudo de efetores de fungos parasitas obrigatórios são sistemas de expressão heteróloga, como aqueles que utilizam o Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3) de bactérias, vetores virais ou a agroinfiltração. A expressão transiente de proteínas candidatas a efetores fusionadas com proteínas fluorescentes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em *Nicotiana benthamiana* tem sido empregada em diversos estudos que visam a determinação do alvo subcelular da proteína efectora dentro da célula vegetal (Pecrix *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

A identificação e caracterização de efetores é de grande importância em estudos de interações planta-patógeno, já que os efetores atuam como determinantes do fenótipo da interação, por suprimir a defesa vegetal e, ou, favorecer o desenvolvimento do patógeno, ou como fatores de incompatibilidade, no caso de seu reconhecimento pelas proteínas codificadas pelos genes de resistência. Efetores de grande importância para a patogênese e conservados entre isolados de um patógeno são de grande valia na busca de resistência durável e de amplo espectro. A identificação e caracterização destas proteínas efectoras também auxilia a identificação e monitoramentos de genes de resistência em programas de melhoramento (Vleeshouwers e Oliver, 2014).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar genes candidatos a efetores de *Phakopsora pachyrhizi* do isolado PPUFV02, por meio da análise da expressão durante a infecção e estudo da localização subcelular das proteínas codificadas em *Nicotiana benthamiana*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]

A soja é uma planta herbácea pertence à família Fabaceae, gênero *Glycine* e espécie *Glycine max* (L.) Merrill. Acredita-se que esta leguminosa tenha origem no continente asiático, mais especificamente na China, pois livros, artefatos e fitofósseis comprovam o uso do grão pelos chineses há mais de cinco mil anos, indicando que neste país ocorreu a domesticação da espécie *G. soja*, espécie que deu origem a *G. max* (Qiu e Chang, 2010).

A soja ficou restrita ao oriente por pelo menos dois milênios, sendo plantada na Europa pela primeira vez em 1739 no jardim botânico de Paris, com a finalidade de ornamentação. O primeiro registro de cultivo de soja no continente americano foi em 1765 nos Estados Unidos. No século XIX a cultura já era conhecida na Argentina, Egito, Cuba, Filipinas e Canadá, onde era cultivada como forrageira (Sedyama *et al.*, 1985; Hartman *et al.*, 2011)

O primeiro relato de plantio de soja no Brasil foi feito por D'Utra em 1882, na Bahia. A variedade cultivada era oriunda dos Estados Unidos, não estava adaptada a regiões de baixa latitude como as do estado da Bahia, o que levou ao insucesso do seu plantio extensivo. Em 1908, a soja foi levada ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), local onde apresentou melhor desenvolvimento do que na Bahia. No IAC, as sementes das variedades introduzidas foram multiplicadas e distribuídas a produtores paulistas (Sedyama *et al.*, 1985; Sedyama, 2009).

Em 1914, a soja foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul. Devido à semelhança das condições climáticas do estado com o clima dos Estados Unidos, país de origem das variedades introduzidas, a cultura apresentou melhor desempenho do que em São Paulo e Bahia (Santos, 1988)

Em 1935, a soja começou a ser plantada em escala comercial no Rio Grande do Sul, chegando à marca de 702 hectares plantados no ano de 1941. Nesse mesmo ano foi instalada no país a primeira indústria de extração de óleo de soja no Brasil, em Santa Rosa (RS), estimulando a expansão do plantio da cultura no país. A partir de 1950, o cultivo da leguminosa também se expandiu para o sudeste, norte e nordeste do Brasil e forçou

melhoristas a selecionarem cultivares adaptadas ao fotoperíodo de regiões de baixa latitude (Sediyama, 2009).

O progresso e consolidação da soja como uma cultura de larga escala e de grande importância econômica no país se deve ao desenvolvimento de cultivares adaptadas às regiões de baixa latitude. Entretanto, uma série de outros fatores tornaram a atividade produtiva e viável economicamente, como a valorização da soja no mercado mundial e interno na década de 1970, novas técnicas e tecnologias de insumos, corretivos, fertilizantes e máquinas para produção e para processamento da soja, relevo plano e apto à mecanização, investimentos em pesquisas para melhoramento e políticas públicas para expansão da produção agrícola (Medina *et al.*, 1982). Com a expansão do cultivo de soja para áreas de cerrado, o Brasil aumentou consideravelmente a área de produção de soja passando a ser o segundo maior produtor mundial do grão, atrás apenas dos Estados Unidos (Sediyama, 2009).

Na safra 2017/2018, os Estados Unidos lideraram o ranking com uma produção de 119,5 milhões de toneladas, seguido pelo Brasil que produziu aproximadamente 117 milhões de toneladas (USDA, 2018). O consumo interno de soja em grãos foi de 59 milhões de toneladas (CONAB, 2018), enquanto a exportação de soja em grãos foi de 68,1 milhões. A soja é a cultura de maior relevância econômica no país, com a soma dos valores de exportação de soja em grão, óleo e farelo totalizando 31,7 bilhões de dólares (Agrostat, 2018).

Na safra 2018/2019 foram cultivados 35,8 milhões de hectares de soja no Brasil (CONAB, 2019). A Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2018) estimou que a sojicultura gera 1,5 milhão de empregos em dezessete estados do país, incrementando a qualidade de vida das pessoas nas principais cidades produtoras, como comprovado pela melhoria do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) destas cidades após a chegada da sojicultura.

Apesar de ser um alimento secundário na alimentação humana, a soja tem grande importância na produção de proteína de origem animal. O grão possui alto teor de proteínas e lipídios que aliado ao seu baixo custo de produção tornam essa leguminosa uma fonte proteica para complementação da dieta animal (Bezerra *et al.*, 2015). Também é utilizada para produção de biodiesel, extração de compostos para indústria farmacêutica e cosmética (ácidos graxos, glicerol, esteróis e lecitina), agentes aerantes, emulsificantes

antiespumantes, antiderrapantes, dispersantes, estabilizantes e umidificantes (EMBRAPA, 2018).

A produção e retorno econômico da sojicultura poderia ser maior se não fossem as perdas de produção e gastos no controle de pragas e doenças. Segundo Henning *et al.* (2014) quarenta e seis patógenos entre fungos, bactérias, vírus e nematoides acometem a cultura da soja no Brasil e esse número cresce a cada ano devido à abertura de novas áreas de cultivo. Na ausência de controle, as perdas em decorrência de algumas doenças podem ser totais, como já foi relatado em epidemias da Ferrugem Asiática da Soja (EMBRAPA, 2013).

## **2.2 *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da Ferrugem Asiática da Soja**

*Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & Sydow) é um fungo biotrófico pertencente ao filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Phakopsoraceae (MycoBank, 2018). Seu primeiro registro ocorreu no Japão, em 1902, por Henning, que chamou o patógeno de *Uredo sojae* Henn. (Henning, 1903). Em 1914, em Taiwan, o mesmo fungo foi descrito por Hans e Paul Sydow, em *Pachyrhizus erosus* (L.) sendo denominado *Phakopsora pachyrhizi*.

Em 1934, *P. pachyrhizi* foi relatado pela primeira vez na Austrália, onde a soja é cultivada desde 1920. Na América, há relatos de ferrugem na soja a partir de 1976, no entanto acredita-se que antes dessa data apenas a espécie *P. meibomiae*, agente causal da Ferrugem Americana da Soja, estava presente no continente americano (Bonde *et al.*, 2006). De 1997 a 2001, *P. pachyrhizi* foi relatada em vários países africanos (Levy, 2005), e teve o primeiro relato na América do Sul em 2001, primeiramente no Paraguai e depois no Brasil, Bolívia e Argentina (Yorinori *et al.*, 2005), e nos Estados Unidos a partir de 2004 (Schneider *et al.*, 2005).

O ciclo completo de vida de *P. pachyrhizi* ainda não foi totalmente esclarecido. Teliósporos já foram descritos e sua germinação foi obtida em condições de laboratório (Saksirirat e Hoppe, 1991). Todavia, até o momento não se demonstrou a infectividade de basidiósporos na soja. Da mesma forma, até o momento, são desconhecidos os estágios de pínio e écio (Bromfield, 1984; Goellner *et al.*, 2010).

As infecções pelo fungo podem ocorrer em qualquer etapa do desenvolvimento da soja. Os sintomas da doença podem ser observados em hastes, pecíolos e vagens, mas

é mais comum na face abaxial das folhas, onde se observa lesões angulares de coloração acinzentada, castanha ou marrom (Bromfield, 1984). Com o desenvolvimento da doença, as urédias presentes na face abaxial das folhas infectadas se rompem e liberam os uredósporos que são dispersos a longas distâncias pelo vento (Andrade e Andrade, 2002).

Em ambiente favorável, com temperatura entre 18°C e 26°C e disponibilidade molhamento foliar, ocorre a germinação do uredósporo que emite um tubo germinativo com um apressório globoso na extremidade. A penetração ocorre diretamente pela epiderme vegetal aproximadamente 12 horas após a germinação do esporo. A entrada do fungo ocorre através de um cone apressorial que é formado a partir do apressório e dá origem à hifa de penetração, que transversa e mata a célula epidérmica (Bromfield, 1984; Koch e Hoppe, 1983; Ono *et al.*, 1992). No mesófilo, essa hifa de penetração forma hifas primárias que colonizam o espaço intercelular e se ramificam em hifas secundárias que, em contato com células do mesófilo, podem se diferenciar em células-mãe de haustório (Koch *et al.*, 1984). A formação dos haustórios ocorre entre 24 e 48 horas após a inoculação. Observa-se, então, intensa colonização do mesófilo foliar e o espaço intercelular da folha infectada fica preenchido por micélio fúngico. De cinco a oito dias após a inoculação ocorre a formação de urédias e liberação dos uredósporos, completando o ciclo assexuado de *P. pachyrhizi*. Apesar do ciclo se completar em uma semana, as urédias podem produzir novos esporos por até 21 dias, o que incrementa sobremaneira o número de ciclos secundários da doença durante o desenvolvimento da cultura (Bromfield, 1984; Koch e Hoppe, 1983).

Na ausência de cultivo de soja, *P. pachyrhizi* sobrevive em plantas voluntárias ou em outros hospedeiros. Apesar da maioria dos patógenos do grupo das ferrugens possuírem grande especificidade com os hospedeiros, *P. pachyrhizi* é capaz de infectar várias espécies de leguminosas. Cerca de 152 espécies de leguminosas são consideradas potenciais hospedeiras do patógeno (Ono *et al.*, 1992; Slaminko *et al.*, 2008).

### **2.3 Controle da ferrugem asiática da soja**

Devido a dependência do patógeno por hospedeiros vivos para se multiplicar, uma medida de controle legislativa denominada “vazio sanitário” foi implementada para interromper o ciclo de reprodução do patógeno, e assim reduzir a população inicial antes do início da safra de soja. Durante a safra, o principal método de controle empregado é o

químico, através da aplicação de fungicidas, que apesar de ser um método de controle eficiente e importante, o seu uso intensivo pode levar à seleção de populações do patógeno resistentes a fungicidas, como já relatado para os grupos químicos dos triazóis, estrobilurinas e carboxamidas (Dalla Lana *et al.*, 2018; Godoy *et al.*, 2016).

Dentre as estratégias de controle disponíveis para o controle da ferrugem asiática da soja, o controle genético é considerado o método ideal de controle, uma vez que permite a redução do uso de maquinário e insumos, tornando o manejo menos complexo, com consequente redução do impacto ambiental e econômico do controle (Garcia *et al.*, 2008).

Algumas variedades de soja contendo genes de resistência *Rpp* (*Resistance to Phakopsora pachyrhizi*) foram lançadas no mercado brasileiro. Esses genes proporcionam resistência específica a determinadas raças de *P. pachyrhizi* e foram mapeados, até o momento, em sete diferentes loci denominados *Rpp1 a Rpp7* (Garcia *et al.*, 2008; Hyten *et al.*, 2007, 2009; Silva *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Childs *et al.*, 2017). As plantas resistentes podem apresentar lesões de cor castanha-avermelhadas denominadas RB (*Reddish-brown*) com pouca ou nenhuma esporulação, ou não apresentar lesões, que caracteriza o fenótipo de imunidade. Já as plantas suscetíveis apresentam lesões claras de cor bronzeada com grande quantidade de urédias e esporulação abundante, que são denominadas lesões TAN (Bromfield, 1984).

A utilidade das variedades resistentes é limitada pela especificidade dos genes de resistência disponíveis (Paul *et al.*, 2011). Devido à alta capacidade reprodutiva, facilidade de dispersão e suposta ampla variabilidade genética, a resistência conferida por um único gene pode ser rapidamente suplantada. Portanto, as variedades resistentes tem que ser utilizadas em um sistema de manejo integrado associado com estratégias que visem prolongar a vida útil da resistência como a rotação de genes (cultivares), uso de mais de um gene de resistência na mesma cultivar (piramidação de genes), mistura de cultivares com genes de resistência diferentes (multilinhas) e integração com outras medidas de controle, como a utilização de fungicidas (McDonald e Linde, 2002).

## **2.4 Sistema imune vegetal e proteínas efectoras**

As plantas não possuem um sistema de defesa com células móveis que buscam e eliminam agentes patogênicos no organismo, como ocorre em mamíferos. No entanto, elas possuem um sistema de defesa inato, denominado de sistema imune inato ou sistema

imune vegetal, em que cada célula tem potencial de reconhecer e conter o organismo patogênico e evitar que a doença se espalhe pelo tecido (Jones e Dangl, 2006; Wu *et al.*, 2018).

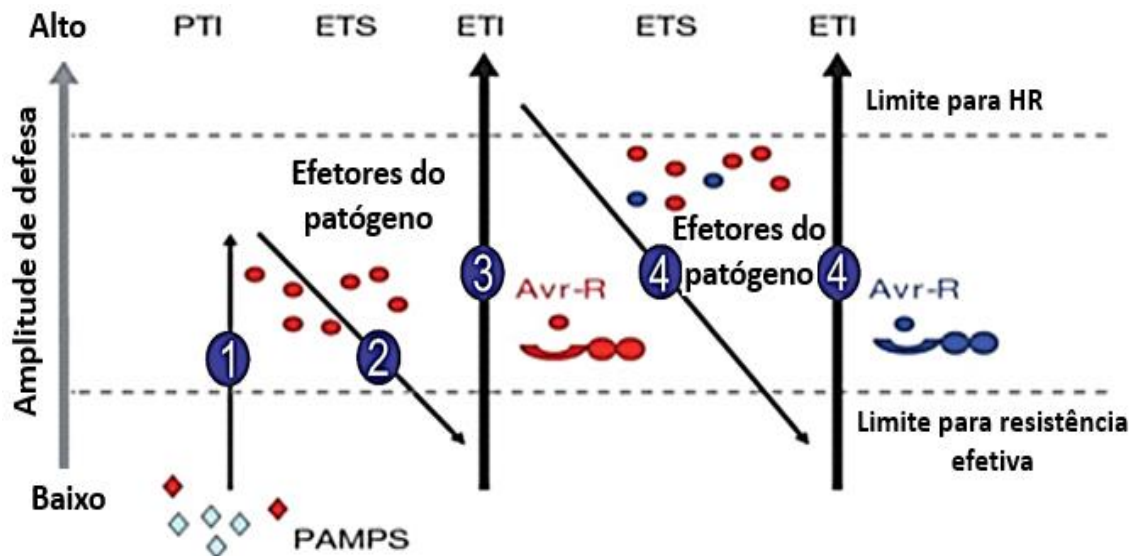
O sistema imune vegetal possui duas linhas de defesa principais: a primeira utiliza proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática denominados proteínas PRRs (*pattern recognition receptors*) capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, conhecidos como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) e ativar a resposta de defesa denominada PTI (*PAMP-triggered immunity*). Esses padrões normalmente são proteínas estruturais conservadas, como flagelina, quitina e glucanos que compõe o flagelo de bactérias e a parede celular de fungos e oomicetos, respectivamente. O reconhecimento desses padrões ativa vias de sinalização intracelular que resultam em diversas respostas de defesa como a indução da transcrição de genes de defesa, a biossíntese de ácido salicílico, a deposição de calose e a produção de espécies reativas de oxigênio (Hammond-Kosack e Jones, 1996; Jones e Dangl, 2006; De Wit, 2007; Dangl *et al.*, 2013; Couto e Zipfel, 2016). Por exemplo, o receptor de membrana FLS2 de *Arabidopsis thaliana* reconhece um peptídeo conservado da parte N-terminal da flagelina (flg22) e ativa uma cascata de MAP quinase que induz a expressão de genes de resposta de defesa (Gomez-Gómez e Boller, 2000; Asai *et al.*, 2002). De modo similar, Kaku *et al.* (2006) caracterizou a proteína CeBip de arroz como um receptor que reconhece a quitina de fungos. Em estudo também realizado com *A. thaliana*, Ranf *et al.* (2015) relatou que lipopolissacarídeos de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Xanthomonas* podem ser reconhecidos pelo receptor *lectin S-domain-1 receptor-like kinase*.

A PTI, também conhecida como defesa basal, é capaz de evitar a infecção pela maioria dos organismos presentes no ambiente. No entanto, fitopatógenos codificam proteínas efetoras capazes de suprimir a PTI, permitindo-os causar doença, o que é descrito como susceptibilidade promovida por efetores (ETS – *effector triggered susceptibility*) (Dangl *et al.*, 2013).

Os efetores são pequenas moléculas produzidas e secretadas por patógenos para bloquear processos de defesa, permitindo que se desenvolvam no tecido do hospedeiro. Os efetores podem ser transportadas para o interior de células vegetais a partir de estruturas especializadas dos patógenos, como haustórios de fungos e oomicetos (Koeck *et al.*, 2011), ou translocados para o seu interior por meio do sistema de secreção de

bactérias (Radics *et al.*, 2014) e estiletos de fitonematoides (Mitchum *et al.*, 2013) ou podem ser secretadas no apoplasto, como ocorre na interação com alguns patógenos que tem um crescimento extracelular, como *Cladosporium fulvum*. No caso específico de *C. fulvum*, diferentes efetores foram identificados em fluidos do apoplasto extraídos de folhas de tomate infectadas com o patógeno (De Wit e Spikman, 1982; Scholtens-Toma, 1989; Thomma *et al.*, 2008; De Wit, 2016).

Durante a coevolução, as plantas desenvolveram uma segunda linha de defesa chamada ETI, baseada no reconhecimento dos efetores, para reconhecer patógenos que suplantaram a PTI (Figura 1). A ETI (*effector-triggered immunity*) é desencadeada após a interação direta ou indireta de efetores com proteínas de resistência da planta codificadas pelos genes R. Essas proteínas de resistência são receptores intracelulares de uma superfamília de proteínas NLR (*nucleotide-binding leucine-rich repeat*) que após o reconhecimento de efetores ativam uma resposta de defesa mais rápida e ampla que as respostas ativadas pela PTI que culminam na morte celular das células no sítio de infecção, conhecida como resposta de hipersensibilidade (*Hypersensitive cell death response – HR*). Pelo fato do reconhecimento de efetores desencadear uma resposta de resistência, nesta situação, esses genes são também conhecidos como genes de avirulência (Flor, 1942; Glazebrook *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2006; Dangl *et al.*, 2013; Alhoraibi *et al.*, 2018).



**Figura 1:** Modelo Zigzag representativo do processo de coevolução de plantas e fitopatógenos: 1) O reconhecimento dos PAMPs leva a ativação da PTI que induz respostas de defesa na planta; 2) Fitopatógenos secretam efetores que bloqueiam a PTI. 3) As plantas desenvolveram uma segunda linha de defesa, ETI, que é ativada pelo reconhecimento de efetores elevando novamente a defesa vegetal. Essa linha é efetiva contra patógenos que suplantam PTI; 4) O processo contínuo de coevolução leva à evolução de novos efetores e novas proteínas R (Adaptado de Jones e Dangl, 2006).

A morte celular no sítio de infecção desencadeada pelo reconhecimento do patógeno, leva a uma sinalização para os tecidos saudáveis da planta próximos ao sítio de infecção e distantes que induz a ativação de uma resposta de defesa sistêmica (SAR, *systemic acquired resistance*). Dentre os genes ativados estão os genes que codificam proteínas relacionadas à resposta de defesa conhecidas como proteínas PR (*pathogenesis-related proteins*) que possuem diferentes atividades bioquímicas como quitinases (PR 3, 4, 8 e 11), peroxidases (PR 9), glucanases (PR 2) e inibidores de proteases (PR 6), dentre outras (Van Loon e Van Strien, 1999; Van Loon et al., 2006; Breen et al., 2017).

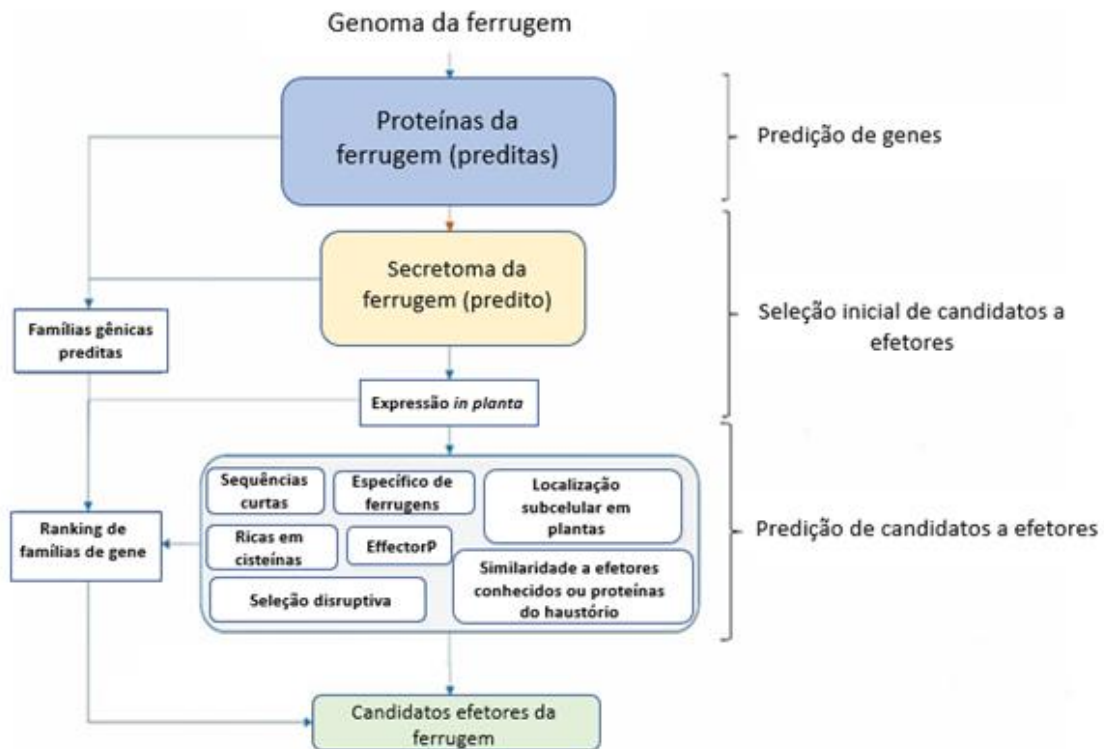
## 2.5 Identificação e caracterização funcional de efetores

Em uma interação planta-patógeno compatível, os efetores atuam suprimindo a defesa vegetal e favorecendo o desenvolvimento do patógeno. Em interações incompatíveis os efetores particulares são alvo do sistema imune. Assim, a caracterização de efetores e do seu modo de ação pode ajudar no controle de doenças, no

desenvolvimento de ferramentas para manipular processos vegetais e na identificação e caracterização de genes de resistência (Vleeshouwers e Oliver, 2014).

Devido à redução do custo e avanço nas técnicas de sequenciamento na última década, foi possível obter algumas sequências do genoma de *P. pachyrhizi* e de seus transcritos durante a interação com a soja visando identificar genes que codificam efetores. Dois trabalhos com foco no sequenciamento do transcrito do haustório de *P. pachyrhizi* foram publicados com o objetivo de identificar proteínas expressas e secretadas pelo haustório. Link *et al.* (2014) fizeram uma seleção de genes que codificam proteínas únicas, com mais de 50 aminoácidos e que possuem peptídeo sinal. Dessa forma, identificaram 156 genes que foram nomeados com a sigla *PpEC* (*P. pachyrhizi* Effector Candidates). Kunjeti *et al.* (2016) identificaram 35 genes, que codificam proteínas que foram denominadas CSEPs (*candidate secreted effector proteins*) expressas no haustório e com características típicas de efetores fúngicos. Dentre as 35 CSEPs identificados por Kunjeti *et al.* (2016), 31 também foram relatadas por Link *et al.* (2014). A partir da técnica de microdissecção por captura a laser combinada a RNAseq e análises de bioinformática, De Carvalho *et al.* (2017) identificaram 851 genes expressos *in planta* que codificam proteínas secretadas e verificaram que 101 desses genes estavam presentes também no conjunto de *PpECs* identificados por Link *et al.* (2014).

Devido à grande quantidade de genes expressos pelos patógenos durante a infecção, é comum, no estudo de efetores, estabelecer critérios de seleção, para identificar os genes candidatos mais promissores, facilitando os estudos funcionais (Figura 2). A primeira etapa da seleção, chamada de *effector-mining*, envolve a seleção de sequências expressas que codificam proteínas com características comuns em efetores, como sinal de secreção, predição do alvo na célula vegetal e alto conteúdo de cisteína. Por exemplo, De Carvalho *et al.* (2017) utilizaram como critérios de seleção genes que codificam proteínas com tamanho inferior a 250 aminoácidos, conteúdo de cisteína superior a 3% e com alta expressão *in planta*. Estudos adicionais de transcritômica, proteômica e genômica comparativa também são utilizados para a seleção de genes com alta expressão durante a infecção, relacionados a estruturas de secreção, específicos dentro de táxon (espécie, família, etc.) ou polimórficos dentro de isolados virulentos e avirulentos (Lorrain *et al.*, 2018).



**Figura 2:** Organograma para seleção de candidatos a efetores em patógenos causadores de ferrugem. (Adaptado de Sperschneider *et al.*, 2017)

Após a primeira etapa, realiza-se a caracterização funcional dos genes candidatos selecionados, visando identificar genes que tenham importância na virulência. De acordo com Lorrain *et al.* (2018), os seguintes estudos são normalmente realizados para caracterizar funcionalmente os genes candidatos a efetores: a) Validação de secreção, a partir do sistema de armadilha de sinal de secreção em leveduras (YST – *yeast secretion trap*); b) Expressão *in planta*, a partir de experimentos como localização subcelular de proteínas marcadas com fluorescência ou imunolocalização; c) Propriedades de virulência, a partir de experimentos como ensaio de morte celular vegetal (indução/supressão de HR) ou ensaios de infecção; d) Silenciamento gênico, induzido pelo hospedeiro ou por vetor viral; e) Bioquímicos, como estudos de expressão; e f) Identificação de proteínas alvo no hospedeiro, a partir de experimentos de co-immunoprecipitação e do sistema duplo híbrido de leveduras.

### 2.5.1 Estudo de localização subcelular de CSEPs marcados com fluorescência

O estudo de localização subcelular das CSEPs visa determinar, dentro da célula vegetal, qual o local de atuação da proteína candidata a efetor, permitindo estabelecer inferências sobre o seu modo de ação (Downen *et al.*, 2009; Schornack *et al.*, 2010; Lorrain *et al.*, 2018). Os efetores AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e PopP2 de *Ralstonia solanacearum*, por exemplo, atuam, respectivamente, no núcleo da célula vegetal onde modulam a expressão gênica e no citoplasma afetando realocação subcelular de proteínas (Gurlebeck *et al.*, 2006; Poueymiro e Genin, 2009), enquanto o efector Pi03192 de *Phytophthora infestans* atua impedindo a mudança de localização de dois fatores de transcrição, do retículo endoplasmático para o núcleo das células de batata (McLellan *et al.*, 2013).

As proteínas efetoras de patógenos apresentam grande diversidade de localização subcelular, refletindo as suas diferentes funções no processo de patogênese. Diversos estudos relatam a localização das proteínas efetoras no núcleo, citoplasma e na membrana plasmática e, em alguns casos, associados ao citoesqueleto, mitocôndria, peroxissomo e cloroplastos (McLellan *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2017; Jelenska *et al.*, 2017; Robin *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Grande parte da regulação da expressão gênica em eucariotos ocorre no âmbito de controle da transcrição. Fatores de transcrição e reguladores transcricionais circulam entre o núcleo e o citoplasma e o seu nível de acumulação e atividade nuclear determinam a amplitude da resposta de defesa (Deslandes e Rivas, 2011). Por essa razão, é de se esperar que o núcleo das células do hospedeiro seja um importante alvo de atuação de efetores destinados a reprimir ou induzir a expressão gênica e, desta forma, alterar as respostas de defesa vegetal ou favorecer o parasitismo.

A inexistência de um protocolo universal para transformação estável para fungos causadores de ferrugens como *P. Pachyrhizi* impede a geração de *mutantes knock-outs* ou estudos de complementação gênica. Assim, o método mais utilizado para estudo funcional de efetores desses fungos é a expressão heteróloga de proteínas codificadas por meio da utilização do SST3 de bactérias, agroinfiltração ou vetores virais. A expressão transiente de genes candidatos a efetores mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em *Nicotiana benthamiana*, por meio da produção de proteínas fusionadas com proteínas fluorescentes, tem sido empregada em diversos estudos que visam a determinação do alvo da proteína efetora dentro da célula vegetal (McLellan *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018;

Pecrix *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Este método depende da clonagem do gene de interesse em um vetor de expressão de forma a gerar uma fusão da sequência do gene em estudo com a sequência que codifica uma proteína fluorescente. Dessa forma, será produzida uma proteína efetora quimérica contendo em sua extremidade N- ou C-terminal a sequência de aminoácidos de uma proteína fluorescente, o que possibilita a sua localização dentro da célula vegetal por meio de microscopia confocal (Petre *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Robin *et al.*, 2018).

A proteína verde fluorescente GFP (*Green fluorescent protein*) de *Aequorea victoria*, é comumente utilizada para estudos *in vivo* de localização de proteínas em plantas (Chalfie *et al.*, 1994). Diversos vetores de expressão foram criados para estudos de localização subcelular de proteínas com a utilização de microscopia confocal. Esses vetores apresentam um sítio de clonagem associado a sequências codificadoras da proteína GFP, de forma que a proteína quimérica será uma proteína fusionada à proteína fluorescente. Um dos vetores mais utilizados é o pK7FWG2 que possui a sequência do promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e proporciona uma forte expressão da proteína na célula vegetal, além de apresentar marcadores de seleção em bactéria (espectinomicina) e em planta (canamicina) (Karimi *et al.*, 2002; Tzfira *et al.*, 2005).

Após a clonagem, os vetores contendo os genes em estudo são transferidos em *A. tumefaciens*, e as agrobactérias recombinantes são utilizadas para mediar a expressão transiente das proteínas em *N. benthamiana*. A inoculação geralmente é feita com uma suspensão bacteriana que contém um clone com o gene de interesse e um segundo clone contendo um gene que codifica uma proteína marcadora de compartimentos celulares fusionada a uma segunda proteína fluorescente. Dessa forma pode-se determinar a localização da proteína em estudo comparando-a com a localização do marcador. Em tratamentos em que as duas proteínas possuírem o mesmo alvo celular será observada uma terceira coloração, devido à sobreposição das fluorescências no mesmo local (Downen *et al.*, 2009; Schornack *et al.*, 2010; McLellan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018).

A expressão transiente de proteínas mediada por *Agrobacterium* em plantas de *N. benthamiana* tem facilitado o estudo de localização subcelular de proteínas efetoras de diversos patógenos biotróficos (Choi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Pecrix *et al.*, 2018). Liu *et al.* (2016) observaram a localização do efector PEC6 de *Puccinia striiformis*, causador da ferrugem amarela do trigo, no citoplasma e núcleo das células vegetais e por meio da utilização do ensaio duplo híbrido de leveduras esses autores observaram que o

efetor interage com adenosina quinases de trigo e de *Arabidopsis thaliana* que também estão localizadas no citoplasma e núcleo das células. Petre *et al.* (2015) e Liu *et al.* (2018) avaliaram a localização subcelular de 24 proteínas candidatas a efetores do fungo *Melampsora larici-populina* e outras 83 candidatas a efetores do oomiceto *Plasmopara viticola*. Das vinte e quatro proteínas de *M. larici-populina* analisadas, apenas seis apresentaram localização considerada informativa, diferindo do controle GFP, localizando-se em locais variados como núcleo, nucléolo, corpos de acumulação no núcleo e no citosol, e cloroplasto. Dos genes de *P. viticola* analisados, 76 foram informativos, sendo a maioria das proteínas codificadas localizadas no núcleo e citosol ou apenas no núcleo, nove genes em membranas da célula vegetal e quatro no cloroplasto e uma na mitocôndria.

Embora não permitam a comprovação direta da função de uma determinada proteína candidata a efetor, os estudos de localização subcelular auxiliam a priorização dos efetores para um estudo mais detalhado de sua função por meio de outras metodologias (Lorrain *et al.*, 2018). Por exemplo, essa informação é parte integrante dos *pipelines* utilizados em efetorômica para priorizar os candidatos a efetores mais informativos, com alvos limitados na célula vegetal (Figura 2) (Petre *et al.*, 2015; Lorrain *et al.*, 2018).

Alguns estudos funcionais têm sido realizados com proteínas secretadas por *Phakopsora pachyrhizi* com o objetivo de identificar candidatas a efetores e entender a sua função. De Carvalho *et al.* (2017) analisaram a expressão de 22 genes candidatos a efetores e selecionou seis candidatos com super expressão em até 24 horas após a inoculação para analisar a capacidade de supressão da ETI e a localização subcelular das proteínas codificadas. As seis proteínas avaliadas foram capazes de suprimir ETI e apresentaram localização nuclear e citoplasmática suportando a hipótese dos autores quanto a função efetora das proteínas analisadas. Qi *et al.* (2018) avaliaram 82 proteínas secretadas por *P. pachyrhizi* em estudos de supressão da imunidade, localização subcelular e ativação da imunidade em plantas não hospedeiras e chegaram a 17 candidatas a efetores considerados como promissoras para realizar novos estudos de localização, silenciamento, caracterização bioquímica e identificação das proteínas alvo em soja. Utiyama *et al.* (2018) fizeram a avaliação funcional de seis proteínas candidatas a efetoras por meio da análise de acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e deposição de calose e observaram a função destas proteínas na supressão da PTI baseado

na redução dos níveis de ROS e calose, ambas respostas de PTI, quando foram expressas transientemente em folhas de *N. benthamiana* utilizando o sistema de secreção tipo III de *Pseudomonas fluorescens*.

Zaramela (2011) identificou genes de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas no sistema armadilha de sinal de secreção em leveduras (YST) e obteve 29 ORFs completas que codificam proteínas secretadas sem similaridade com qualquer outra proteína disponível em bancos de dados. Leite (2016) avaliou a supressão da PTI por 15 proteínas secretadas descritas por Gava (2010) e Zaramela (2011) e identificou duas proteínas (PHPA\_29 e PHPA\_43) capazes de suprimir PTI. No entanto, a análise da expressão gênica e estudos de localização subcelular dessas proteínas genes e de outras proteínas candidatas a efetores descritas por Gava (2010) e Zaramela (2011) ainda não foram efetuados. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar a expressão de genes candidatos a efetores de *Phakopsora pachyrhizi*, isolado PPUFV02, e investigar a localização dos alvos subcelulares das proteínas codificadas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção e caracterização dos genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* para os estudos funcionais

Cerca de 211 sequências obtidas a partir do secretoma de *P. pachyrhizi* durante a interação com a soja que codificam proteínas com características de proteínas efetoras foram previamente identificadas no Laboratório de Genética e Genômica de Interações Planta-Patógeno. Deste conjunto, foram selecionadas oito sequências gênicas para estudos funcionais, sendo algumas já referenciadas em outros estudos (Tabela 1).

As sequências em estudo foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) por meio do algoritmo *BlastX* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As proteínas candidatas preditas foram posteriormente analisadas em diferentes programas de predição para avaliar características que podem ser importantes para a seleção de candidatos a efetores. O programa PredGPI (Pierleoni *et al.*, 2008) foi utilizado para verificar a presença de âncoras de GPI (glicosilfosfatidilinositol) indicativas da associação da proteína à membrana celular. Os programas Phobius prediction (Kall *et al.*, 2007) e SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004) foram utilizados para prever a presença e provável posição de clivagem de peptídeo sinal. O programa TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) foi utilizado para a predição da localização subcelular e o programa TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para verificar a presença de hélices transmembranas nas proteínas.

#### 3.2 Análise da expressão gênica dos candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* isolado PPUFV02 durante a interação com a soja

Plantas de soja da cultivar Conquista com 30 dias após a emergência foram inoculadas com uma solução na concentração  $5,0 \times 10^5$  uredósporos/mL do isolado monopostular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi* e o RNA total das folhas inoculadas foi extraído de amostras coletadas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação (hpi) utilizando o kit *RNA isolation reagent* (Thermo Fisher Scientific). As amostras de RNA foram tratadas com DNase e purificadas utilizando o kit *RNeasy MinElute Cleanup* (Qiagen). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado de acordo com o protocolo do kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Thermo Fisher Scientific).

A análise da expressão gênica foi efetuada por RT-qPCR (*Real Time quantitative polymerase chain reaction*). Os genes foram amplificados utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados para a região codificadora utilizando a plataforma online da Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimeP>). Avaliou-se a eficiência da amplificação utilizando os diferentes oligonucleotídeos (Tabela 1), segundo as recomendações do manual da Applied Biosystems.

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o reagente *SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 10 µL por reação.

A quantificação relativa foi realizada em placas individuais para cada gene usando pares de oligonucleotídeos específicos para cada sequência. Todas as amostras foram submetidas à desnaturação térmica para determinar a curva de dissociação e verificar a especificidade das amplificações. Empregou-se três réplicas técnicas para cada repetição biológica e três repetições biológicas por tratamento. O gene  $\alpha$ -tubulina foi utilizado como gene de referência para normalizar os dados da RT-qPCR, empregando-se os oligonucleotídeos descritos por Kunjeti *et al.*, (2016). Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método comparativo de Ct:  $2^{-\Delta Ct}$  e as comparações efetuadas utilizando o teste estatístico t de Student.

### **3.3 Obtenção dos clones de *Agrobacterium tumefaciens* com vetor pK7FWG2 contendo os genes candidatos a efetores do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi***

Oligonucleotídeos específicos para cada um dos oito genes em estudo foram desenhados para a clonagem pelo sistema Gateway (Invitrogen) em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , sendo excluída a sequência do peptídeo sinal dos genes (Tabela 1).

A amplificação das sequências foi feita por PCR utilizando a enzima de alta fidelidade *Platinum SuperFi DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante, e utilizando como molde o cDNA sintetizado a partir de RNA total coletado as 24 e 72 hpi. Os amplicons foram analisados em gel de agarose (1%) e purificados utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

**Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nos estudos de expressão gênica e localização subcelular de diferentes candidatos a efetores do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.**

Gene	Oligonucleotídeos	Localização subcelular	RT-qPCR
<i>CSEP07</i>	CSEP07-Forward	CACCATGCATAACTGTTGFGAGCTGTCAAAG	GATAGGCGTGATGTCTCGAA
	CSEP07-Reverse	AAATGAATGGTGGCGTGGAGCAATC	CGATGCCGTGGATTGGAT
<i>CSEP09</i>	CSEP09-Forward	CACCATGAACACCCCCACCAAAGTACTG	GGAAACACCCCCACCAAAGT
	CSEP09-Reverse	ATTTTTGGAGACTTCTCTTTTAAATTTTGCAAGTGC	CCGGAGCAGACGAGTTGTTA
<i>EC23</i>	EC23-Forward	CACCATGGCTTCTACTTCGGAGCCAAGC	GAATTTGTACGGAGGTTGC
	EC23-Reverse	GAGCACGGCGACACCAATCATTAGAG	ATACGATCCCTTCTCATTCGG
<i>EC3318</i>	EC3318-Forward	CACCATGGTAACTTTAAATAGAGATCGGCCTTC	GAACTACCCAGTCTTTTCGAAG
	EC3318-Reverse	AGCTTGAGGGGCTTCAGCAGC	ACCTCTTTCGGTTGCTTG
<i>HESP-C49</i>	HESP-C49-Forward	CACCATGACTCCAAAGCTGCA GCC	GAATACCATGCTTCCGATCC
	HESP-C49-Reverse	AAAGGATAAGACAGAAATCAA AATTAC	ACGGAGTTGGCTTTTGATG
<i>PHPA_29</i>	PHPA_29-Forward	CACCATGAGACTCTCAGCTCCTAAAGCAG	CAATGGACCAGAAAGAACTACC
	PHPA_29-Reverse	ATTTTTGCAGGCTGGCATCCG	GGCATCCGTTGCAAGTTG
<i>PHPA_43</i>	PHPA_43-Forward	CACCATGGCCCCGAGGAAATCAGCGC	GTCTTACCACTTTTCAGCTG
	PHPA_43-Reverse	CAAGATGCCGACGAAGGGAACCC	GGCGTGATTTCTCCG
<i>RTP1</i>	RTP1-Forward	CACCATGGTTAGCTTTGGCAAGGGAATAAATC	GAATACCATGCTTCCGATCC
	RTP1-Reverse	ATTTGCTTCACTTTGGATGTTCTTAATGC	ACGGAGTTGGCTTTTGATG
<i><math>\alpha</math>-Tubulina</i>	$\alpha$ -Tubulina-Forward	-	CCAAGGCTTCTTCGTGTTTCAT
	$\alpha$ -Tubulina-Reverse	-	AGAGCGCCAAACCTGAAC

Os genes candidatos foram clonados no vetor de entrada pENTR TM /D-TOPO e depois foram recombinados no vetor de destino pK7FWG2, utilizando os reagentes *Gateway LR Clonase II Enzyme mix* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Os clones recombinantes foram transformados em *E. coli* DH5 $\alpha$  pelo método do choque térmico.

As sequências clonadas no vetor pK7FWG2 foram amplificadas com um par de oligonucleotídeos (Tabela 1) que se anelam em regiões do vetor que flanqueiam a região de inserção dos genes, sendo a seguir caracterizadas por sequenciamento usando *Bigdye terminator v3.1 sequencing standard kit*, no sequenciador SeqStudio Genetic Analyzer (ThermoFischer Scientific). As sequências obtidas foram montadas e analisadas no programa DNA Baser Sequence Assemble v. 3.5 (Heracle Biosoft).

Os clones que apresentaram a sequência do candidato a efetor clonada no vetor na orientação correta, sem o peptídeo sinal, sem alterações na sequência, e fusionadas *in frame* com a sequência codificadora da proteína GFP foram transferidos para *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 por meio de transformação pelo método do choque térmico.

### **3.4 Cultivo de plantas de *N. benthamiana***

Sementes de *N. benthamiana* foram semeadas em vasos de 0,5 L contendo substrato e mantidas em câmara de crescimento a 25°C até o transplântio, que ocorreu aproximadamente quatro semanas após a semeadura. Todas as plantas foram adubadas a cada duas semanas com uma formulação NPK 10-10-10.

As plantas destinadas ao experimento de localização subcelular foram transplantadas em copos de plástico de 30 mL (furados na base) e mantidas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, a 22°C, por mais quatro semanas, até serem inoculadas.

### **3.5 Expressão transiente em *N. benthamiana* das proteínas candidatas a efetores do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* fusionadas a GFP para avaliação da localização subcelular**

Os clones de *A. tumefaciens* GV3101 que continham as construções com os genes candidatos obtidos conforme descrito no tópico 3.3, os genes codificadores de proteínas marcadoras de organelas celulares específicas fusionadas à proteína fluorescente mCherry (Tabela 2), e o clone com o vetor vazio foram plaqueados em placas com meio LB (Luria Bertani) contendo os antibióticos específicos para cada clone e incubados a 28°C por dois dias. Colônias isoladas foram utilizadas para inocular tubos contendo meio LB líquido e o antibiótico específico para seleção dos clones com os vetores supracitados e estes foram incubados por 14 horas a 28°C e 220 rpm.

As proteínas utilizadas como marcadores de compartimentos celulares (PM-mCherry) tinham como alvo: a) núcleo; b) membrana plasmática; c) vacúolo; d) retículo endoplasmático, e e) plastídeos (Tabela 2). A proteína AtWWP1, de *Arabidopsis thaliana*, faz parte de um conjunto de proteínas, conservadas em plantas e animais, necessárias à interação geminivirus-hospedeiro, com localização nuclear capaz de formar corpos subnucleares via domínio C-terminal conservado (Calil, 2013). O clone contendo o gene que codifica a proteína AtWWP1 foi cedido pela professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Os demais clones foram cedidos pelo professor Jonathan Jones do “The Sainsbury Laboratory” (Inglaterra).

**Tabela 2: Clones que codificam proteínas marcadoras de compartimentos celulares fusionados à proteína fluorescente mCherry utilizados nos experimentos de localização subcelular das proteínas candidatas a efetores do isolado PPUFV02.**

Clone	Localização subcelular – Referência
pMP90:: <i>WWP1-mCherry</i>	Núcleo - Proteína AtWWP1 de <i>A. thaliana</i> (Calil, 2013)
pMP90:: <i>mp-mCherry</i>	Membrana plasmática - Proteína AtPIP2A de <i>A. thaliana</i> (Cutler <i>et al.</i> , 2000)
pMP90:: <i>vac-mcherry</i>	Vacúolo - Proteína c-TIP de <i>A. thaliana</i> (Saito <i>et al.</i> , 2002)
pMP90:: <i>pt-mCherry</i>	Plastídeo - Proteína Rubisco de <i>N. tabacum</i> (incompleta) (Dabney-Smith <i>et al.</i> , 1999)
pMP90:: <i>ER-mCherry</i>	Retículo endoplasmático - Proteínas AtWAK2 de <i>A. thaliana</i> (He <i>et al.</i> , 1999) combinada ao sinal de retenção do ER His-Asp-Glu-Leu (Gomord <i>et al.</i> , 1997)

Após o crescimento, as células bacterianas foram sedimentadas por centrifugação (5000 rpm por cinco minutos) e ressuspensas e lavadas em solução tampão 10 mM MES contendo 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 µM acetoseringona, para remover o meio de cultura com os antibióticos. Após a lavagem, as células foram sedimentadas e ressuspensas utilizando dois mL da mesma solução tampão. A concentração da suspensão bacteriana foi quantificada analisando-se a densidade ótica (OD) no espectrofotômetro *Smartspec Plus* (Bio-Rad).

A inoculação foi realizada usando uma mistura do clone de *A. tumefaciens* contendo o gene em estudo (construção pK7FWG2::*CSEP*), e o clone pMP90::*PM-mCherry* que expressa a proteína marcadora da localização subcelular (PM) específica em análise. Em cada inoculação foi utilizado um clone *CSEP* e um *PM-mCherry*, com exceção do tratamento controle, pK7FWG2 vazio, que foi inoculado separadamente. A suspensão bacteriana de cada clone pK7FWG2::*CSEP* e pMP90::*PM-mCherry* foi ajustada inicialmente para a OD<sub>600</sub> 0,2 e em seguida foram misturadas na proporção 1:1

(volume), resultando na OD<sub>600</sub> final de cada clone igual a 0,1. O clone controle foi diluído e inoculado separadamente na OD<sub>600</sub> 0,1.

A inoculação foi realizada com seringa sem agulha, na parte abaxial das duas folhas mais novas totalmente expandidas de cada planta. Para cada tratamento, pK7FWG2::*CSEP* + pMP90::*PM-mCherry*, foram realizadas quatro infiltrações, em plantas diferentes. A área infiltrada foi marcada e as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 22°C, fotoperíodo de 12 horas, por três dias

A visualização da expressão das proteínas recombinantes fluorescentes foi realizada 72 horas após a inoculação em microscópio confocal de varredura a laser modelo LSM510 META (Zeiss) do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM-UFV). A proteína GFP foi excitada a 488nm e a fluorescência capturada a 550nm e a proteína mCherry foi excitada a 561nm e fluorescência capturada entre 585 e 610nm. As imagens foram processadas com o programa Zen 2.3 lite (Zeiss).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características estruturais dos genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* selecionados para estudos funcionais

Os genes candidatos a efetores variam entre 318 a 1826 nucleotídeos (nt) com número variável de íntrons e éxons. As proteínas codificadas pelos genes *EC3318*, *PHPA\_29*, *RTP1* e *HESP-C49* apresentam identidade entre 37% e 52% com proteínas de outros patógenos da ordem Pucciniales, que engloba os fungos causadores de ferrugens. As proteínas codificadas pelos genes *PHPA\_43*, *CSEP07*, *CSEP09* e *EC23* não apresentaram identidade com outras proteínas do banco de dados do NCBI, sendo exclusivas de *P. pachyrhizi*. A quantidade de cisteína nas proteínas foi variável, de zero a 21 resíduos, sendo que *EC3318* e *PHPA43* não apresentaram este aminoácido, enquanto *EC23* foi a proteína com maior quantidade desse aminoácido. Nenhuma das proteínas possui domínio transmembrana ou âncora de GPI e todos os genes possuem uma sequência que codifica um peptídeo sinal indicando que as proteínas codificadas são secretadas pela rota clássica de secreção (Tabela 3). A seguir é apresentada a descrição resumida de cada gene analisado:

#### ***EC3318:***

O gene candidato *EC3318* possui 1035 nt divididos em três íntrons e quatro éxons. A ORF (*Open Reading Frame*) é composta por 765 nt que codifica uma proteína de 254 aminoácidos (aa) com similaridade com uma proteína hipotética (NCBI: PLW57911.1) do fungo *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Esta proteína não possui âncora de GPI, possui sinal de secreção, com possível sítio de clivagem entre os aminoácidos 25 e 26, não possui aminoácido cisteína, sendo classificada como uma proteína secretada pela rota clássica de secreção.

#### ***PHPA\_29:***

O gene candidato a efector *PHPA\_29* possui 789 nt, com quatro íntrons e cinco éxons, sendo a ORF composta por 393nt que codifica uma proteína de 130 aminoácidos, com similaridade com uma proteína hipotética (NCBI: KNE90547.1) de *Puccinia*

*striiformis* f. sp. *tritici*. Esta proteína não possui âncora de GPI, não possui domínio transmembrana, apresenta sinal de secreção, com possível sítio de clivagem entre os aminoácidos 24 e 25, possui 12 cisteínas, sendo classificada como uma proteína secretada pela rota clássica de secreção.

#### ***PHPA\_43:***

O gene candidato a efetor *PHPA\_43* possui 537 nt, com três íntrons e quatro éxons e uma ORF de 276 nt que codifica uma proteína de 91 aminoácidos que não apresentou similaridade com nenhuma outra proteína disponível no NCBI. Esta proteína não possui âncora de GPI, possui sinal de secreção, com possível sítio de clivagem entre os aminoácidos 20 e 21, não possui cisteínas, sendo classificada como uma proteína secretada pela rota clássica de secreção.

#### ***RTPI:***

O gene candidato a efetor *RTPI* possui uma sequência de 1510 nt, com sete íntrons e oito éxons e uma ORF composta por 732 nt que codifica uma proteína de 243 aminoácidos, que apresenta similaridade com diversas proteínas hipotéticas de fungos causadores de ferrugens (*Melampsora larici-populina*, *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, etc) e com as proteínas RTP (*rust transferred protein*) de *Melampsora occidentalis*, *Uromyces striatus*, *Gymnosporangium sabinae*, *Melampsora medusae* f. sp. *tremuloides*, *Hemileia vastatrix*, etc., com identidade entre 44% e 51%. Esta proteína não possui âncora de GPI, possui sinal de secreção, com possível sítio de clivagem entre os aminoácidos 24 e 25, sendo classificada como uma proteína secretada pela rota clássica de secreção.

#### ***CSEP09:***

O gene candidato a efetor *CSEP09* possui 871 nt, com quatro íntrons e cinco éxons, e uma ORF composta por 549 nt que codifica uma proteína de 182 aminoácidos com similaridade (99%) com a proteína CSEP09 de *P. pachyrhizi* depositada por Kunjeti *et al.*, (2016). Esta proteína também apresentou similaridade com a proteína CSEP08 também de *P. pachyrhizi* e com uma proteína secretada de *Melampsora larici-populina* (NCBI: XP\_007408015.1). Esta proteína não possui âncora de GPI, possui sinal de

secreção, com possível sítio de clivagem entre os aminoácidos 18 e 19, possui 12 cisteínas, sendo classificada como uma proteína secretada pela rota clássica de secreção.

#### ***EC23:***

O gene candidato a efetor *EC23* possui 1826 nt, com dez íntrons e onze éxons, e uma ORF composta por 876 nt que codifica uma proteína de 291 aminoácidos similaridade com a proteína CSEP35 de *P. pachyrhizi* (Kunjeti *et al.*, 2016). Foi encontrada similaridade com proteínas hipotéticas e secretadas de outros patógenos causadores de ferrugem, como *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (NCBI: KNF04998.1), e *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* (NCBI: PLW42217.1) com identidade de 46% e 45%. Esta proteína não possui âncora de GPI, possui sinal de secreção, com possível sítio de clivagem entre os aminoácidos 18 e 19, possui 21 cisteínas, sendo classificada como uma proteína secretada pela rota clássica de secreção.

#### ***HESP-C49:***

O gene candidato a efetor *HESP-C49* possui 796 nt, com uma ORF de 492 nt que é segmentada por quatro íntrons e que codifica uma proteína de 163 aminoácidos, com similaridade e 37% de identidade com a proteína HESP-C49 (ABB96284.1) de *Melampsora lini*. Esta proteína não possui âncora de GPI, possui sinal de secreção, com possível sítio de clivagem entre os aminoácidos 20 e 21, possui 12 cisteínas, sendo classificada como uma proteína secretada pela rota clássica de secreção.

#### ***CSEP07:***

O gene candidato a efetor *CSEP07* possui 318 nt, não possui íntrons na sequência, e codifica uma proteína de 105 aminoácidos, com identidade exclusiva (100%) com a proteína CSEP07 de *P. pachyrhizi* depositada por Kunjeti *et al.* (2016) sendo, portanto, considerada uma proteína específica de *P. pachyrhizi*. Esta proteína não possui âncora de GPI, possui sinal de secreção, com possível sítio de clivagem entre os aminoácidos 19 e 20, possui cinco cisteínas, sendo classificada como uma proteína secretada pela rota clássica de secreção.

**Tabela 3: Caracterização dos genes candidatos a efetores do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* utilizados nesse estudo.**

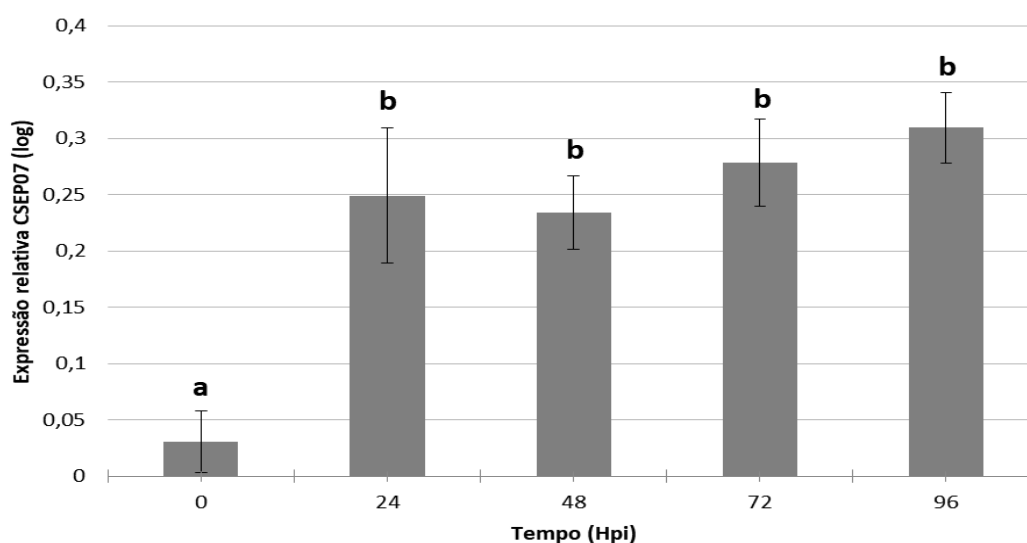
Nome publicado	Tamanho da ORF (Aminoácidos)	blastX	E-value	Identidade	PredGPI	SignalP <sup>1</sup>	TargetP	TMHMM <sup>2</sup>	Phobius <sup>3</sup>	Nº de Cisteínas	Único de <i>P. pachyrhizi</i>
<i>EC3318</i>	254	Proteína hipotética: hypothetical protein PCANC_01008 [ <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> ]	5,00E-10	49%	Não possui âncora de GPI	Sim	Rota de secreção	0	0	0	Não
<i>PHPA_29</i>	130	Proteína hipotética PSTG_16009 [ <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ]	1,00E-27	49%	Não possui âncora de GPI	Sim	Rota de secreção	0	0	12	Não
<i>PHPA_43</i>	91				Não possui âncora de GPI	Sim	Rota de secreção	0	0	0	Sim
<i>RTP1</i>	243	Proteína secretada: [ <i>Melampsora larici-populina</i> 98AG31]	8,00E-46	52%	Não possui âncora de GPI	Sim	Rota de secreção	0	0	4	Não
<i>CSEP09</i>	182	CSEP-09 [ <i>Phakopsora pachyrhizi</i> ]	7,00E-107	99%	Não possui âncora de GPI	Sim	Rota de secreção	0	0	12	Sim
<i>EC23 (CSEP35)</i>	291	CSEP-35 [ <i>Phakopsora pachyrhizi</i> ]	6,00E-167	99%	Não possui âncora de GPI	Sim	Rota de secreção	0	0	21	Sim
<i>HESP-C49</i>	163	hesp-C49 [ <i>Melampsora lini</i> ]	6,00E-20	37%	Não possui âncora de GPI	Sim	Rota de secreção	0	0	12	Não
<i>CSEP07</i>	105	CSEP 07 [ <i>Phakopsora pachyrhizi</i> ]	6,00E-71	100%	Não possui âncora de GPI	Sim	Rota de secreção	0	0	5	Sim

<sup>1</sup> SignalP: Presença (sim) ou ausência (não) de peptídeo sinal para secreção da proteína; <sup>2</sup> TMHMM – Predição de hélice transmembrana: 0 - ausência; 1 – presença; <sup>3</sup> Phobius – Predição de sinal de secreção: 0 – presença; 1 - ausência

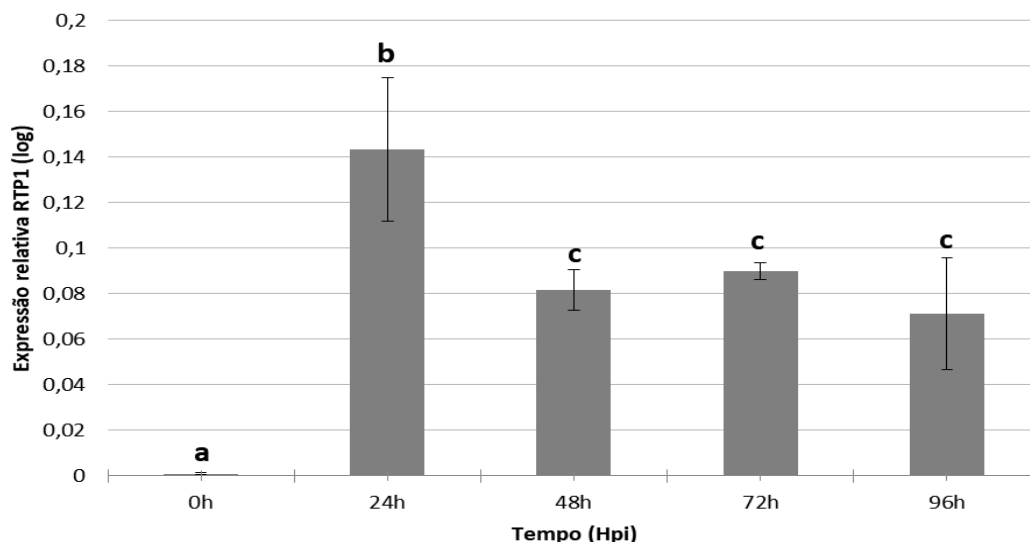
## 4.2 Análise da expressão dos genes candidatos a efetores do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* durante a interação com a soja

O valor de eficiência de amplificação dos pares de oligonucleotídeos variou de 90% a 110%. Esse valor foi considerado adequado para a sua utilização nos estudos de expressão.

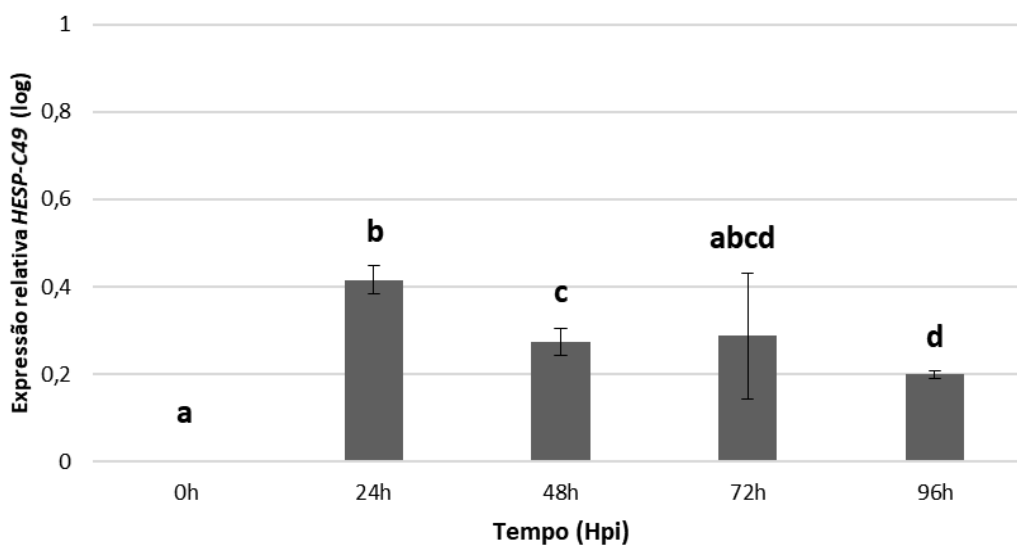
Os genes, *CSEP07*, *RTP1* e *HESP-C49* apresentaram valores de expressão relativa (log) inferiores a 1 (Figuras 3, 4 e 5), indicando que estes genes são pouco expressos nos intervalos de tempo analisados.



**Figura 3:** Expressão relativa do gene candidato *CSEP07* em diferentes tempos após a inoculação de plantas de soja da variedade Conquista com  $10^5$  uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.



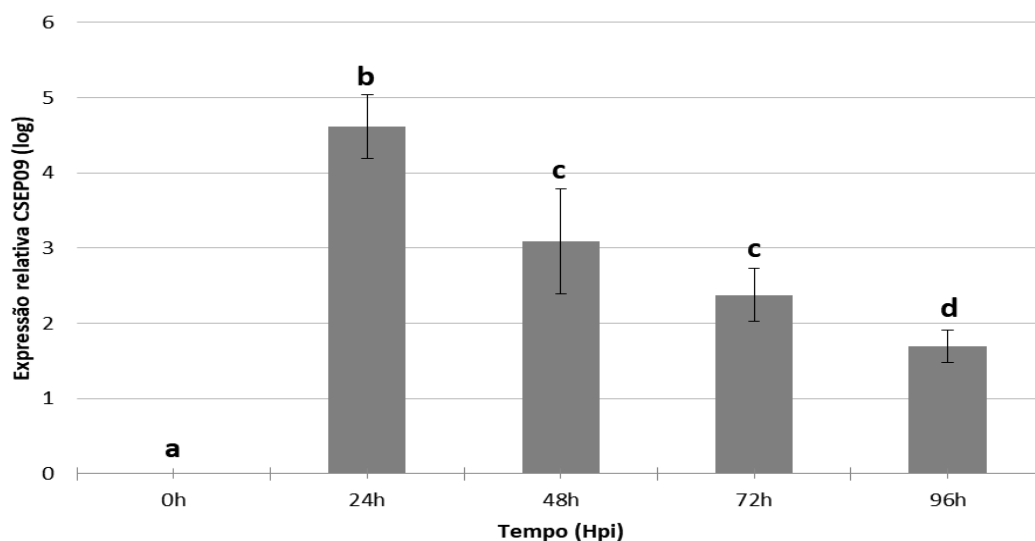
**Figura 4:** Expressão relativa do gene candidato *RTP1* em diferentes tempos após a inoculação de plantas de soja da variedade Conquista com  $10^5$  uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.



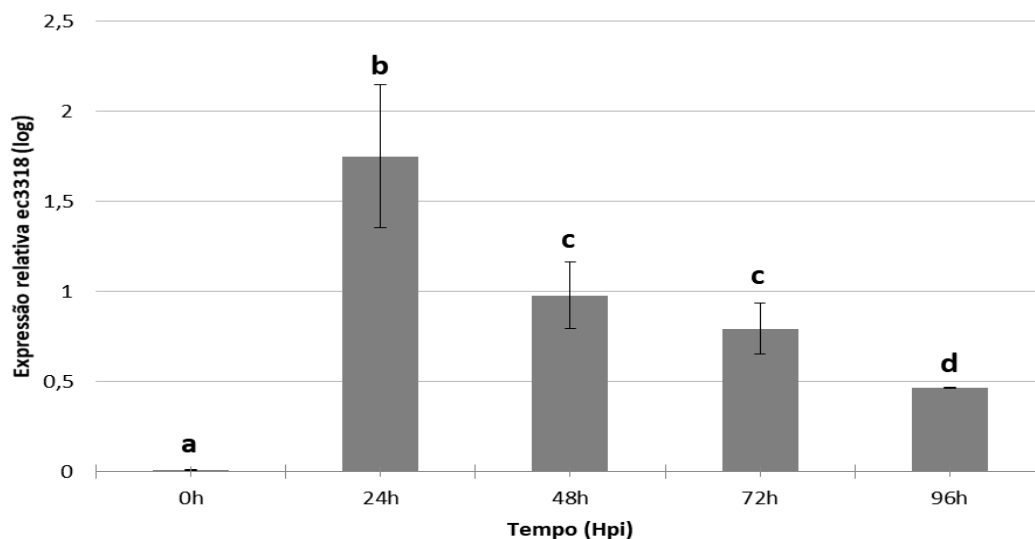
**Figura 5:** Expressão relativa do gene candidato *HESP-C49* em diferentes tempos após a inoculação de plantas de soja da variedade Conquista com  $10^5$  uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.

Os genes *CSEP09* e *EC3318* apresentaram um valor máximo de expressão em 24 hpi, que diferiu significativamente dos demais tempos avaliados (Figuras 6 e 7). Após

esse período houve uma redução linear e significativa da expressão durante todo o intervalo de tempo analisado.

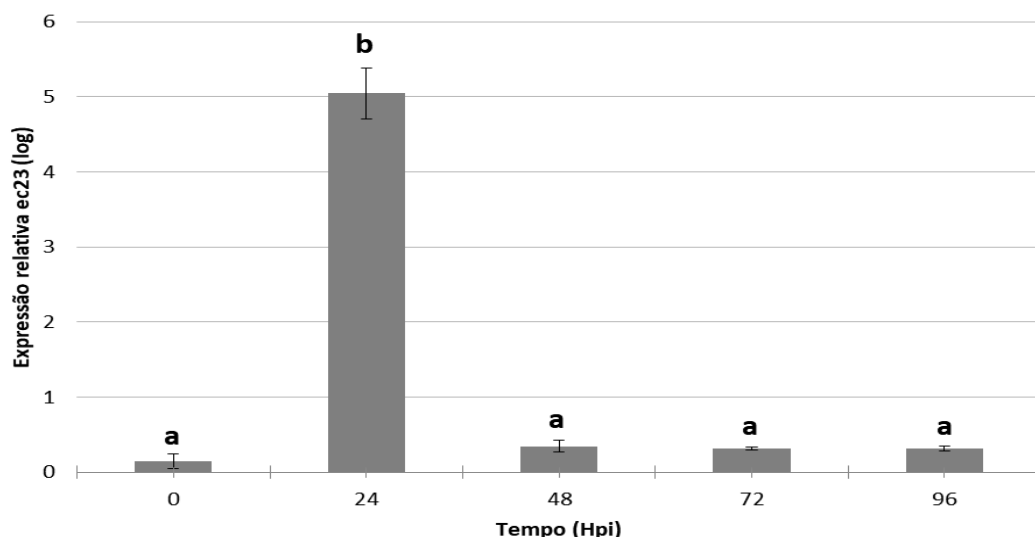


**Figura 6:** Expressão relativa do gene candidato *CSEP09* em diferentes tempos após a inoculação de plantas de soja da variedade Conquista com  $10^5$  uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.

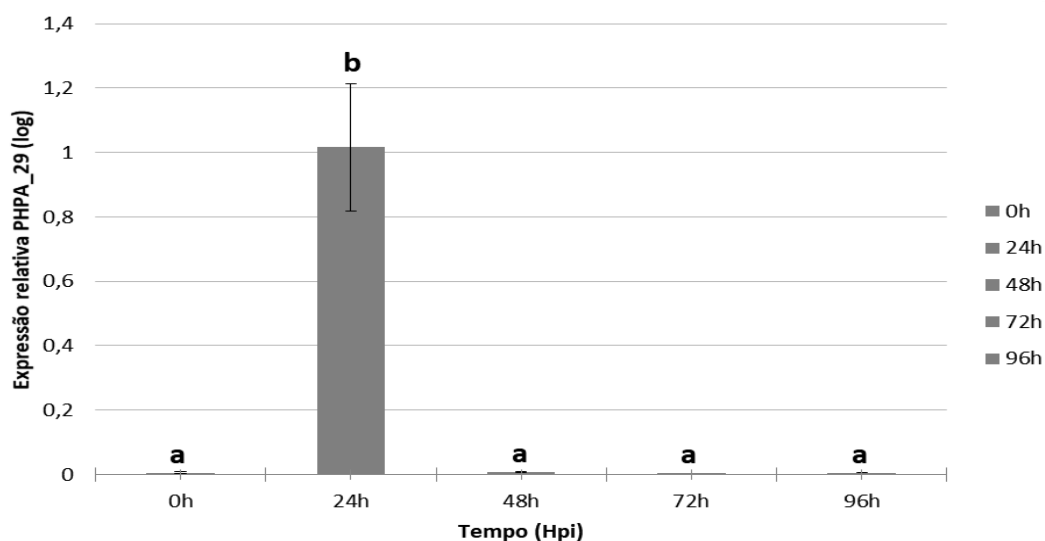


**Figura 7:** Expressão relativa do gene candidato *EC3318* em diferentes tempos após a inoculação de plantas de soja da variedade Conquista com  $10^5$  uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.

Os genes *EC23* e *PHPA\_29* apresentaram padrão de expressão similar, sendo expressos exclusivamente nas 24 hpi (Figuras 8 e 9).



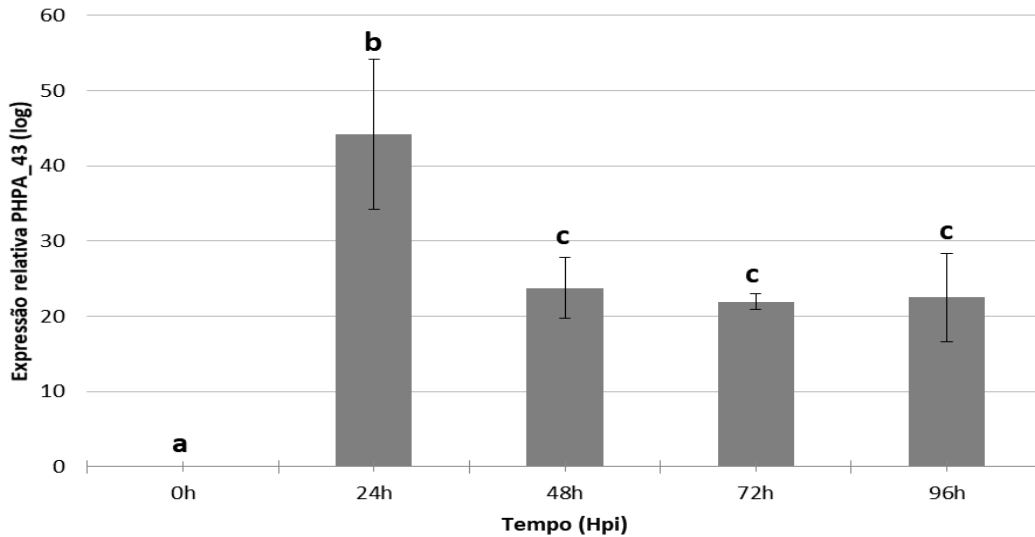
**Figura 8:** Expressão relativa do gene candidato *EC23* em diferentes tempos após a inoculação de plantas de soja da variedade Conquista com  $10^5$  uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.



**Figura 9:** Expressão relativa do gene candidato *PHPA\_29* em diferentes tempos após a inoculação de plantas de soja da variedade Conquista com  $10^5$  uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.

O gene *PHPA\_43* apresentou um padrão de expressão diferente dos demais genes. Este gene também teve seu valor máximo de expressão às 24hpi, diferindo significativamente dos demais tempos. Todavia, este gene apresentou uma expressão constante após o tempo de 48 hpi. Esse gene apresentou os maiores valores de expressão relativa dentre todos os genes candidatos avaliados. Comparando este gene com o gene

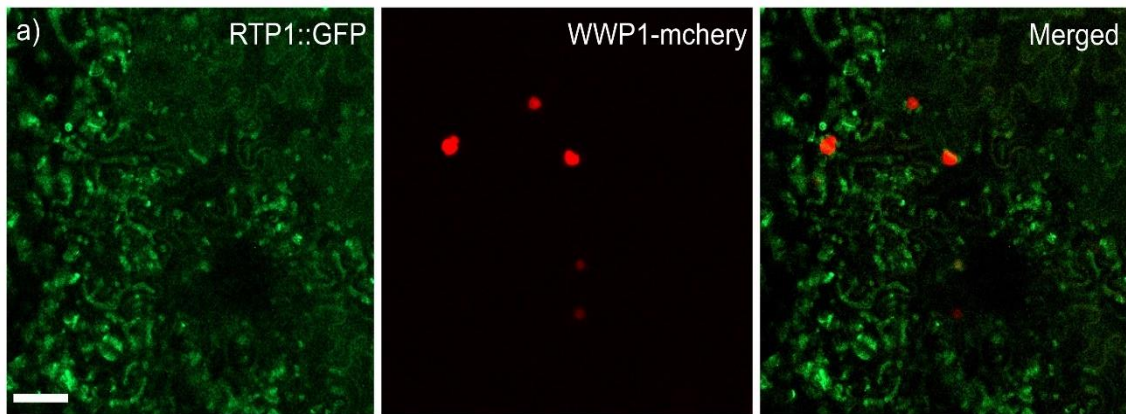
que codifica  $\alpha$ -tubulina, pode-se notar que às 24 hpi o valor de expressão do PHPA\_43 foi 40 vezes maior, e mesmo depois após 48 hpi manteve-se altamente induzido (expressão 22-24 vezes superior ao gene da  $\alpha$ -tubulina) (Figura 10).



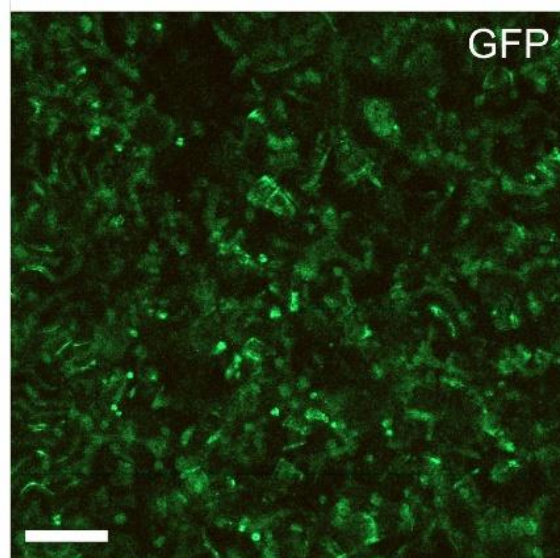
**Figura 10:** Expressão relativa do gene candidato *PHPA\_43* em diferentes tempos após a inoculação de plantas de soja da variedade Conquista com  $10^5$  uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.

#### **4.3 Análise da localização subcelular das proteínas candidatas a efetoras fusionadas a GFP em *N. benthamiana***

Das oito proteínas de *P. pachyrhizi* analisados, apenas não foi possível determinar a localização subcelular da proteína RTP1. Nos estudos com essa proteína fusionada a GFP observou-se uma fluorescência em todas as células da área inoculada, semelhante à proteína GFP não-fusionada (Figuras 11 e 12). O sequenciamento da construção pK7FWG2::*RTP1* comprovou que a sequência gênica foi clonada *in frame* com a proteína codificadora da GFP, e que a mesma não apresenta nenhuma alteração na sequência clonada.



**Figura 11:** Expressão da proteína candidata a efector RTP em folha de *N. benthamiana*. a) pK7F::*RTP1* + pMP90::*WWP1*; A primeira imagem (em verde) destaca a localização da proteína RTP1 fusionada a GFP (RTP1::GFP); a segunda imagem (em vermelho) a localização do marcador nuclear WWP1 fusionado a mCherry; e a terceira imagem (Merged) é a sobreposição das duas imagens. Escala = 20  $\mu$ m.



**Figura 12:** Expressão da proteína GFP em folhas de *N. benthamiana*. A área foi infiltrada com *A. tumefaciens* contendo o clone pK7FWG2 que expressa apenas a proteína fluorescente GFP, usado como controle nos experimentos de localização subcelular. Escala = 20  $\mu$ m.

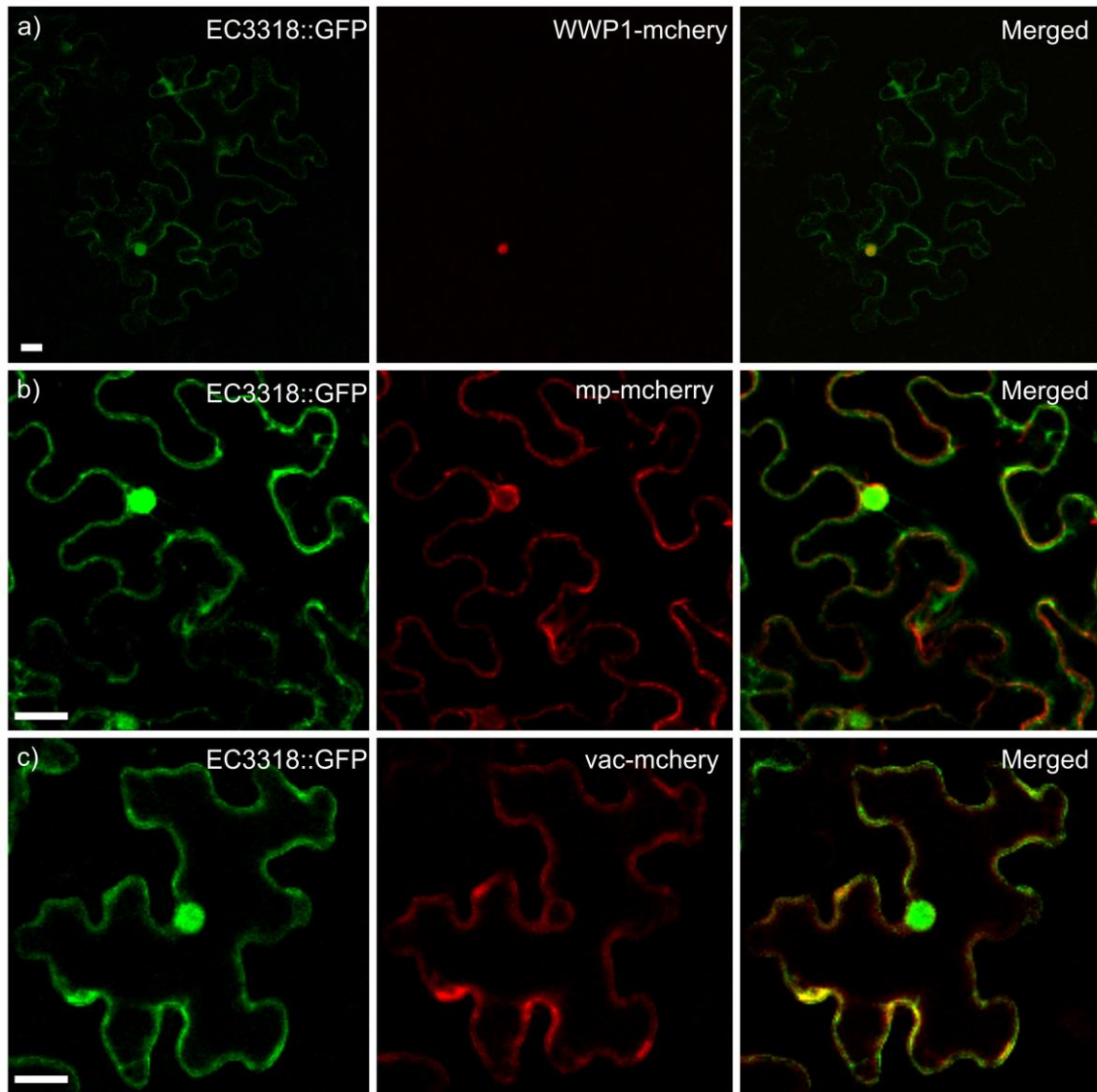
As outras sete proteínas fusionadas a GFP apresentaram localização subcelular distinta do controle GFP (Figuras 13 a 19). Para a proteína EC23 também foi feita análise conjunta com a proteína marcadora de retículo e para os as proteínas CSEP07 e CSEO09 foi feita também a análise conjunta com a proteína marcadora de plastídeo.

Os genes *EC3318*, *PHPA\_29*, *PHPA\_43*, *CSEP09*, *EC23*, *HESP-C49* e *CSEP07* codificam proteínas com localização citoplasmática, comprovada pela co-localização com a proteína marcadora de vacúolo (Figuras 13-c a 19-c). Já as proteínas *EC3318*, *PHPA\_29*, *PHPA\_43*, *CSEP09*, *HESP-C49* e *CSEP07* co-localizaram com a proteína

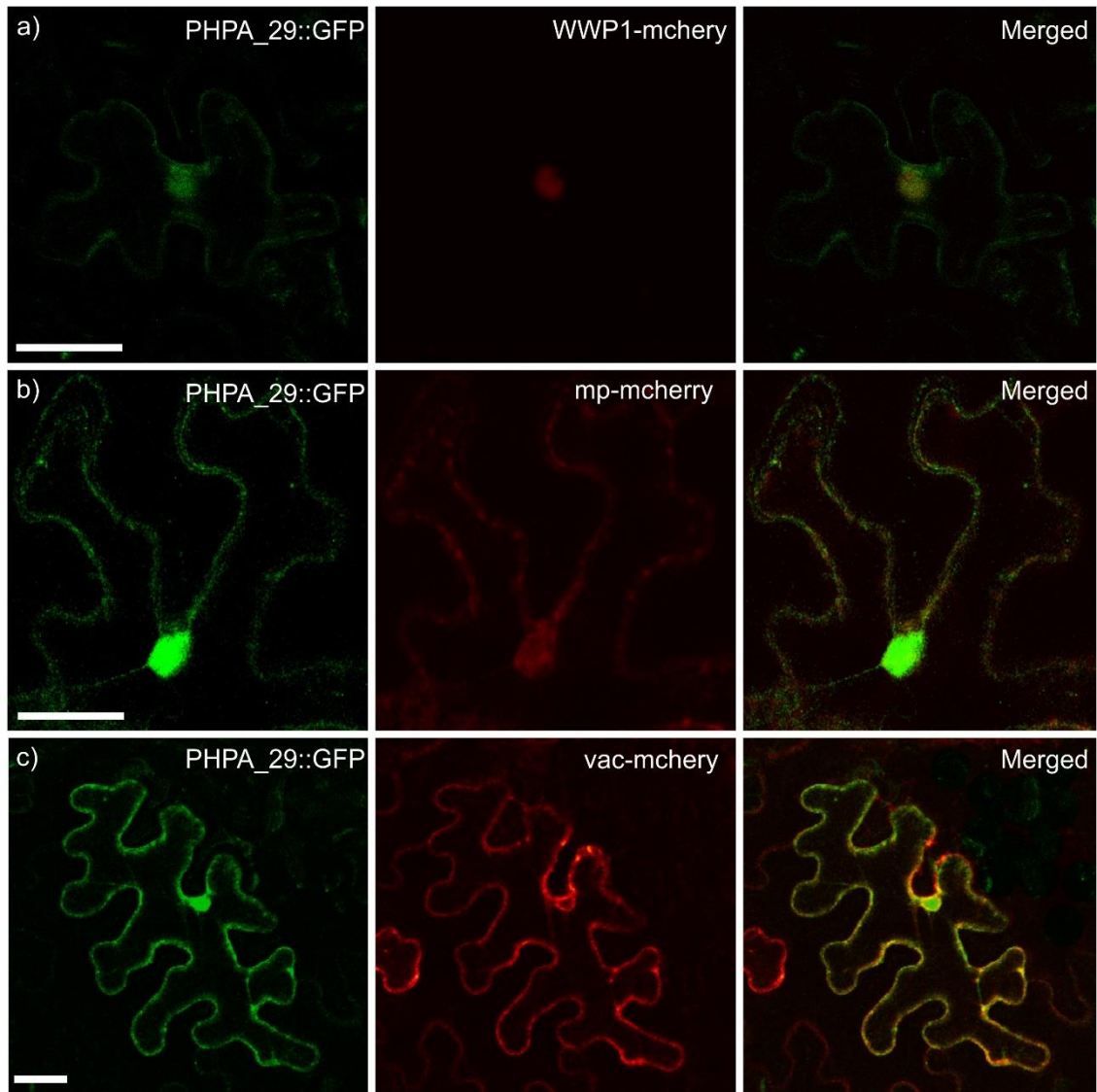
WWP1 no núcleo das células vegetais (Figuras 13-a até 19-a). A única proteína estudada que não apresentou localização no núcleo foi EC23 (Figura 17).

Nas imagens de localização das proteínas candidatas CSEP07 e CSEP09 (Figuras 16 e 19) foram observadas estruturas arredondadas, algumas vezes achatadas, que lembram o formato de cloroplastos. Por este motivo, as duas proteínas e a proteína marcadora de plastídeo foram co-expressadas em células de *N. benthamiana*. A co-expressão demonstrou que as estruturas de acúmulo das proteínas CSEP07 e CSEP09 não colocalizam nos cloroplastos (Figura 16-d e 19-d), sugerindo que essas estruturas podem ser inclusões citoplasmáticas ou ainda artefatos decorrentes da super expressão de ambas proteínas.

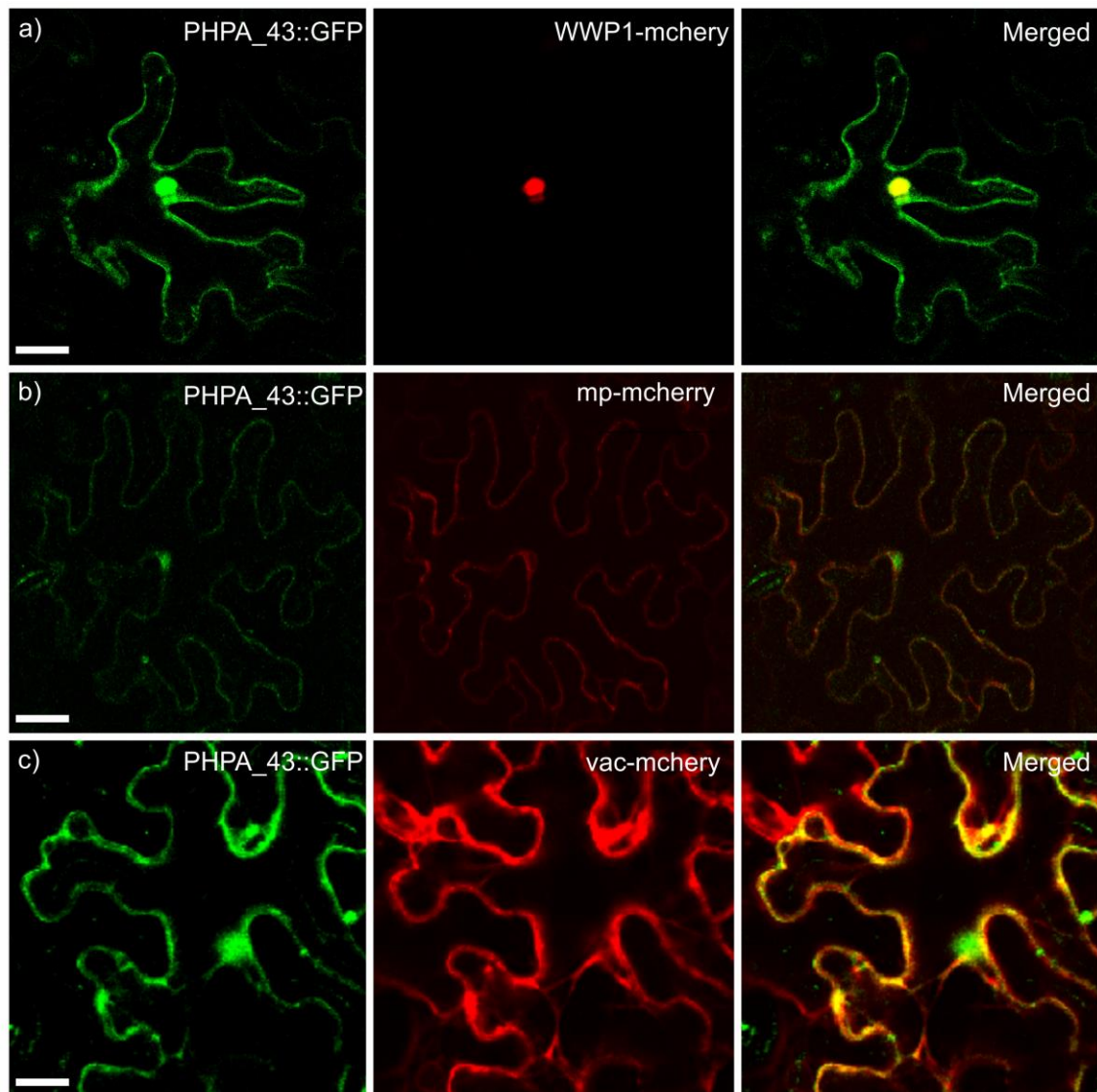
A proteína EC23 apresentou localização citoplasmática, sendo observados pequenos grânulos dessa proteína no citoplasma que pareciam estar associadas com o retículo endoplasmático (Figura 17-b). Quando essa proteína foi co-expressa com a proteína marcadora de retículo endoplasmático não foi observada sobreposição com o retículo endoplasmático (Figura 17-d).



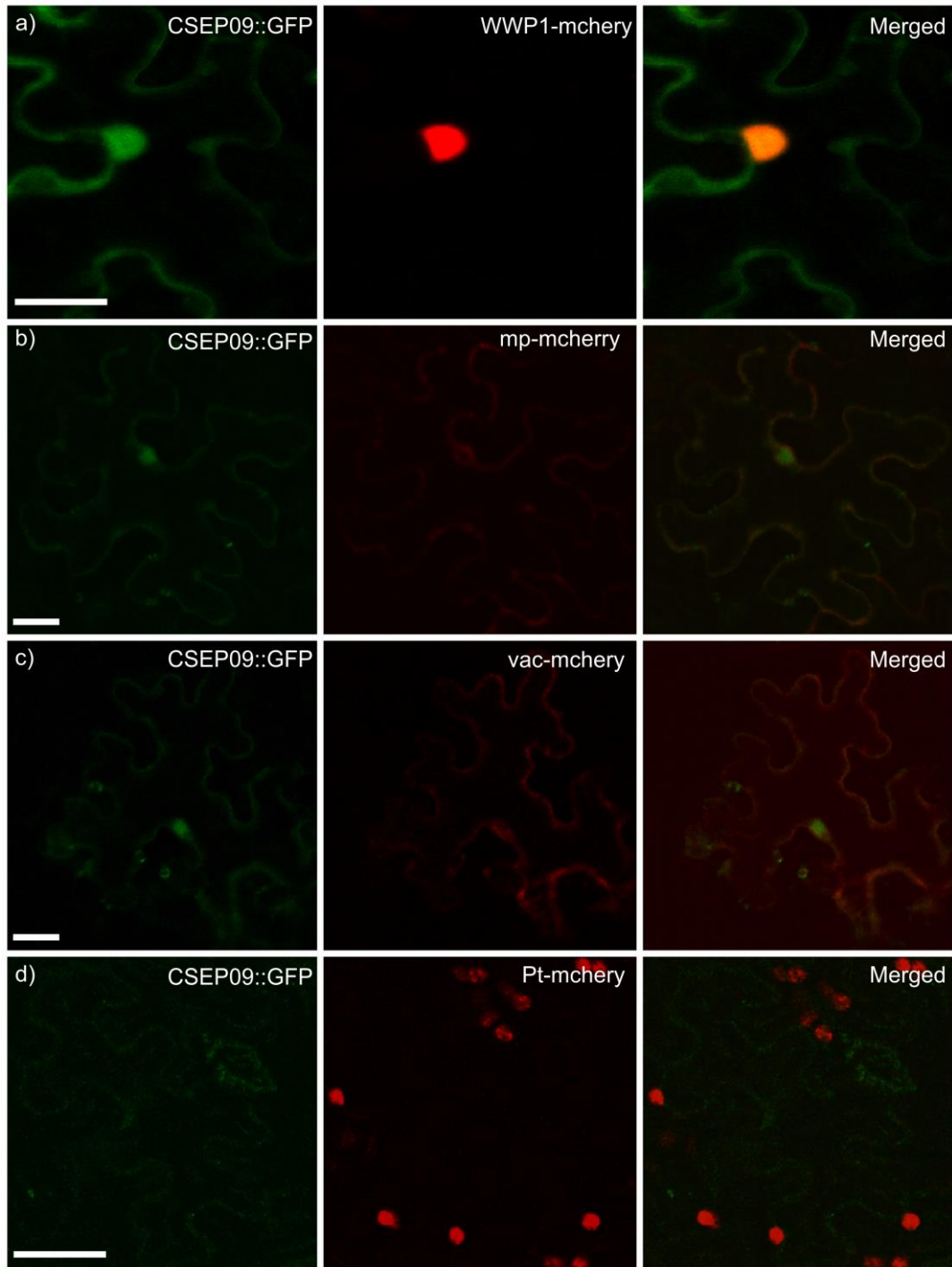
**Figura 13:** Localização subcelular da proteína candidata a efetor EC3318 em células de *N. benthamiana*. a) pK7FWG2::*EC3318* + pMP90::*WWP1* (marcador nuclear; b) pK7FWG2::*EC3318* + pMP90::*mp* (marcador de membrana plasmática) e c) pK7FWG2::*EC3318* + pMP90::*vac* (marcador de vacúolo). A primeira imagem de cada linha (em verde) destaca a localização da proteína EC3318 fusionada a GFP (EC3318::GFP); a segunda imagem (em vermelho) a localização das diferentes proteínas marcadores fusionados a mCherry; e a terceira imagem (Merged) é a sobreposição de ambas onde a coloração amarela demonstra a co-localização da proteína efetora analisada e da proteína marcadora. Escala = 20  $\mu$ m.



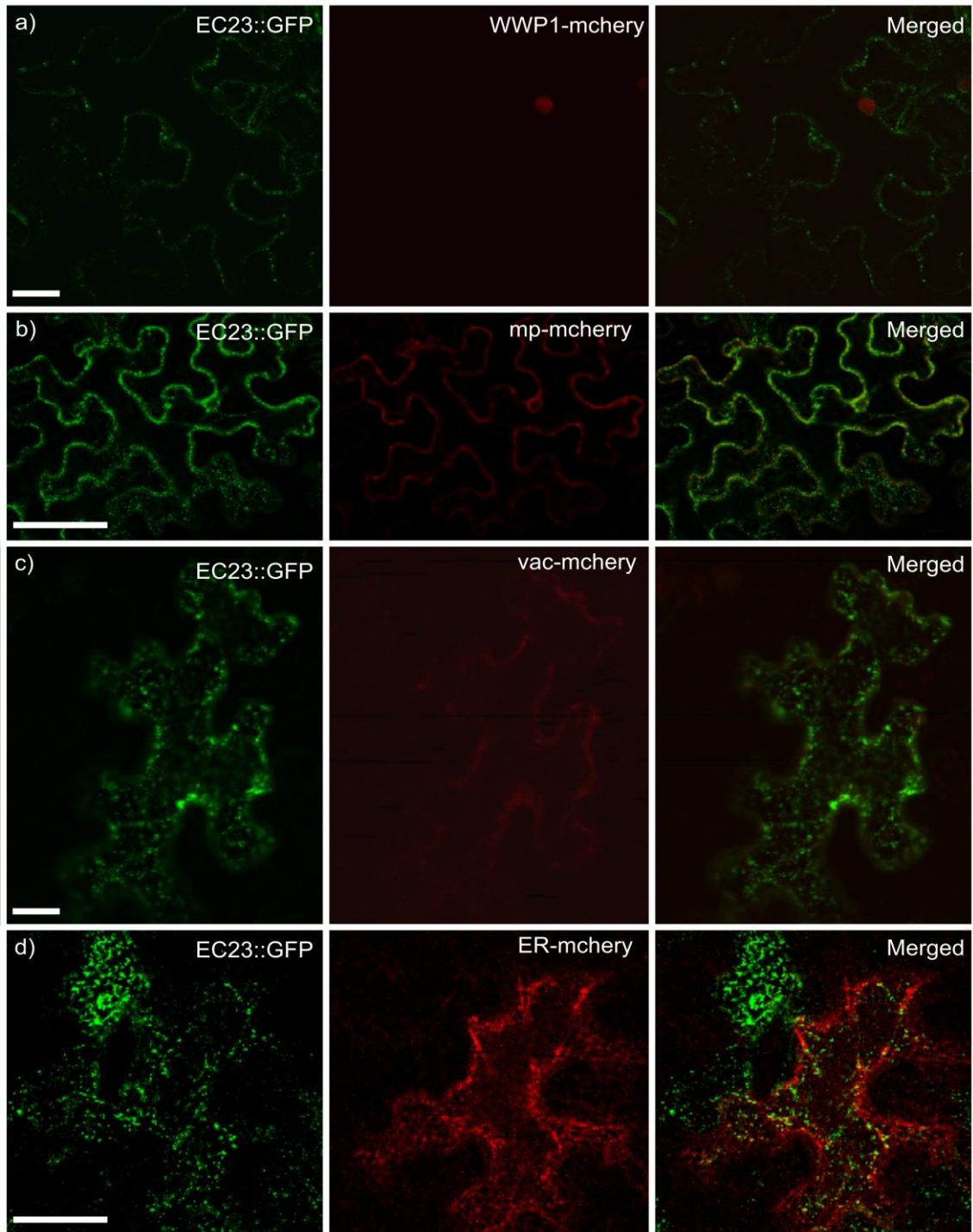
**Figura 14:** Localização subcelular da proteína candidata a efetor PHPA\_29 em células de *N. benthamiana*. a) pK7FWG2::*PHPA\_29* + pMP90::*WWP1* (marcador nuclear); b) pK7FWG2::*PHPA\_29* + pMP90::*mp* (marcador de membrana plasmática) e c) pK7FWG2::*PHPA\_29* + pMP90::*vac* (marcador de vacúolo). A primeira imagem de cada linha (em verde) destaca a localização da proteína PHPA\_29 fusionada a GFP (PHPA\_29::*GFP*); a segunda imagem (em vermelho) a localização dos diferentes marcadores fusionados a mCherry; e a terceira imagem (Merged) é a sobreposição de ambas imagens, onde a coloração amarela demonstra a co-localização da proteína efetora analisada e da proteína marcadora. Escala = 20  $\mu$ m.



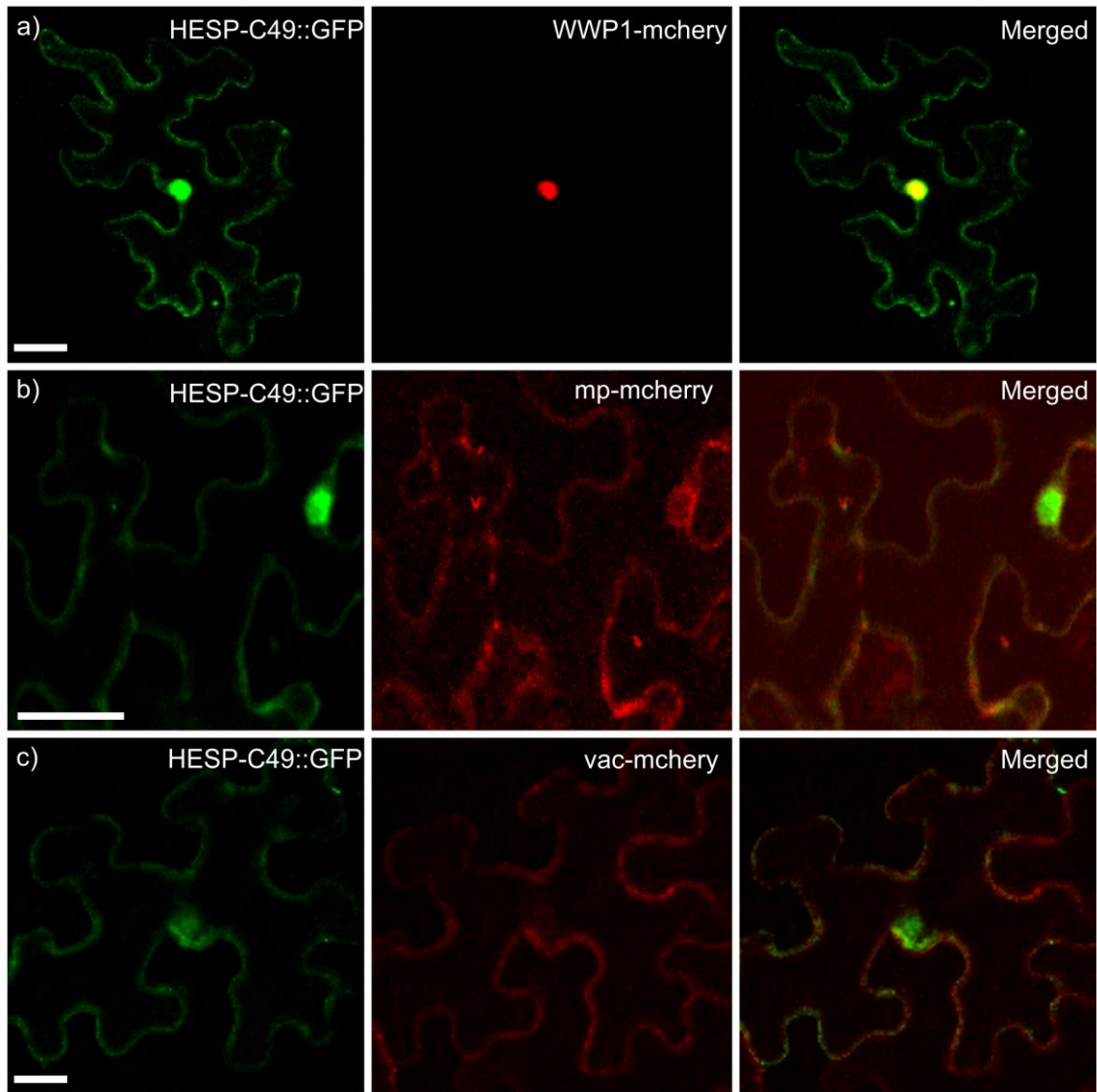
**Figura 15:** Localização subcelular da proteína candidata a efector PHPA\_43 em células de *N. benthamiana*. a) pK7FWG2::*PHPA\_43* + pMP90::*WWP1* (marcador nuclear); b) pK7FWG2::*PHPA\_43* + pMP90::*mp* (marcador de membrana plasmática) e c) pK7FWG2::*PHPA\_43* + pMP90::*vac* (marcador de vacúolo). A primeira imagem de cada linha (em verde) destaca a localização da proteína PHPA\_43 fusionada a GFP (PHPA\_43::GFP); a segunda imagem (em vermelho) a localização dos diferentes marcadores fusionado a mCherry; e a terceira imagem (Merged) é a sobreposição de ambas imagens, onde a coloração amarela demonstra a co-localização da proteína efectora analisada e da proteína marcadora. Escala = 20  $\mu\text{m}$ .



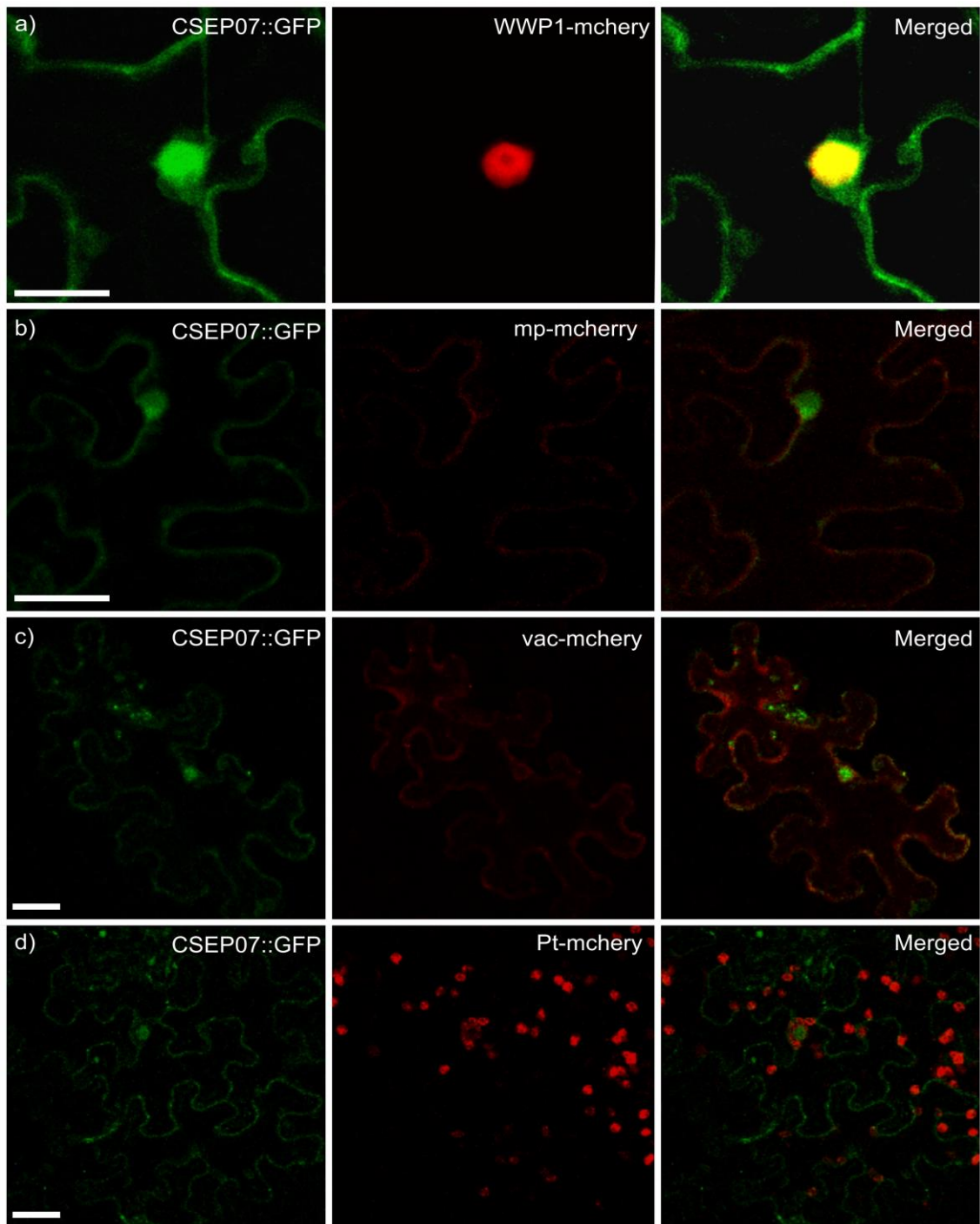
**Figura 16:** Localização subcelular da proteína candidata a efetor CSEP09 em células de *N. benthamiana*. a) pK7FWG2::*CSEP09* + pMP90::*WWP1* (marcador nuclear); b) pK7FWG2::*CSEP09* + pMP90::*mp* (marcador de membrana plasmática); c) pK7FWG2::*CSEP09* + pMP90::*vac* (marcador de vacúolo) e d) pK7FWG2::*CSEP09* + pMP90::*pt* (marcador de plastídeo). A primeira imagem de cada linha (em verde) destaca a localização da proteína CSEP09 fusionada a GFP (CSEP09::GFP); a segunda imagem (em vermelho) a localização dos diferentes marcadores fusionados a mCherry; e a terceira imagem (Merged) é o resultado da sobreposição de ambas imagens, onde a coloração amarela demonstra a co-localização da proteína efetora analisada e da proteína marcadora. Escala = 20  $\mu$ m.



**Figura 17:** Localização subcelular da proteína candidata a efetor EC23 em células de *N. benthamiana*. a) pK7FWG2::*EC23* + pMP90::*WWP1* (marcador nuclear); b) pK7FWG2::*EC23* + pMP90::*mp* (marcador de membrana plasmática); c) pK7FWG2::*EC23* + pMP90::*vac* (marcador de vacúolo) e d) pK7FWG2::*EC23* + pMP90::*ER* (marcador de retículo endoplasmático). A primeira imagem de cada linha (em verde) destaca a localização da proteína ec23 fusionada a GFP (EC23::GFP); a segunda imagem (em vermelho) a localização dos diferentes marcadores fusionados a mCherry; e a terceira imagem (Merged) é a sobreposição de ambas as imagens. A coloração amarela, quando ocorre, indica a co-localização da proteína efetora analisada e da proteína marcadora. Escala = 20  $\mu$ m.



**Figura 18:** Localização subcelular da proteína candidata a efetor HESP-C49 em células de *N. benthamiana*. a) pK7FWG2::*HESP-C49* + pMP90::*WWP1* (marcador nuclear); b) pK7FWG2::*HESP-C49* + pMP90::*mp* (marcador de membrana plasmática) e c) pK7FWG2::*HESP-C49* + pMP90::*vac* (marcador de vacúolo). A primeira imagem de cada linha (em verde) destaca a localização da proteína HESP-C49 fusionada a GFP (HESP-C49::GFP); a segunda imagem (em vermelho) a localização dos diferentes marcadores fusionados a mCherry; e a terceira imagem (Merged) é o resultado da sobreposição de ambas imagens, onde a coloração amarela resulta da co-localização da proteína efetora analisada e da proteína marcadora. Escala = 20  $\mu$ m.



**Figura 19:** Localização subcelular da proteína candidata a efetor CSEP07 em células de *N. benthamiana*. a) pK7FWG2::*CSEP07* + pMP90::*WWP1* (marcador nuclear); b) pK7FWG2::*CSEP07* + pMP90::*mp* (marcador de membrana plasmática); c) pK7FWG2::*CSEP07* + pMP90::*vac* (marcador de vacúolo) e d) pK7FWG2::*CSEP07* + pMP90::*pt* (marcador de plastídeo). A primeira imagem de cada linha (em verde) destaca a localização da proteína CSEP07 fusionada a GFP (CSEP07::GFP); a segunda imagem (em vermelho) a localização dos diferentes marcadores fusionados a mCherry; e a terceira imagem (Merged) é o resultado da sobreposição de ambas imagens, onde a coloração amarela resulta da co-localização da proteína candidata e da proteína marcadora. Escala = 20  $\mu$ m.

## 5 DISCUSSÃO

Os genes *EC3318*, *PHPA\_29*, *PHPA\_43*, *CSEP09*, *RTP1*, *EC23*, *HESP-C49* e *CSEP07*, selecionados para estudos funcionais, são exclusivos de *P. pachyrhizi* ou possuem similaridade apenas com genes de outros fungos causadores de ferrugens, fato que é interpretado como uma indicação de possíveis papéis dessas proteínas na virulência e especificidade de hospedeiro exclusivas de *P. pachyrhizi* ou de espécies causadoras de ferrugens, como os efetores da família *RTP*. As proteínas codificadas por estes genes também não apresentam âncora de GPI e domínio transmembrana, indicando que estas proteínas não estão associadas a membranas, sendo, portanto, proteínas solúveis secretadas.

Os experimentos de análise de expressão foram realizados nas primeiras 96 horas de interação entre *P. pachyrhizi*-soja com base em estudos prévios nesse patossistema. Este intervalo de tempo compreende as etapas de germinação do esporo, penetração, formação dos haustórios e colonização do mesofilo e representam aproximadamente metade do tempo de um ciclo de *P. pachyrhizi* (Bromfield, 1984; Koch e Hoppe, 1983). Em concordância que essa escolha de tempos de amostragem, todos os candidatos a efetores, exceto *CSEP07* e *HESP-C49*, apresentaram um pico de expressão com 24 hpi, uma expressão condizente com o início de formação dos haustórios, principal local de síntese e secreção de efetores. Essas proteínas podem estar associadas com a supressão de respostas de defesa que ocorrem no início da infecção, como o reconhecimento de PAMPs e ativação da PTI.

Os genes *CSEP07* e *HESP-C49* apresentaram expressão menor que o gene endógeno em todos os tempos analisados e não apresentaram diferença estatística na expressão entre os tempos de 24 hpi e os tempos posteriores. O resultado de expressão obtido com o gene *CSEP07* foi condizente com o resultado observado por Kunjeti *et al.* (2016) que também avaliou a expressão deste gene do isolado GA-05 de *P. pachyrhizi* (isolado na Georgia-EUA em 2005) em plantas inoculadas de soja. Neste mesmo trabalho também foi avaliada a expressão do gene *CSEP09* que também apresentou resultado similar ao obtido na nossa análise realizada com o isolado PPUFV02, em que há expressão máxima desse gene ocorreu 24 hpi, seguida da redução constante da sua expressão até 96 hpi.

Os genes *PHPA\_29* e *EC23* foram induzidos apenas 24 hpi e neste mesmo tempo, o gene *PHPA\_43* foi expresso 44 vezes mais do que o gene endógeno, o que também

indica um papel importante destes genes na etapa inicial da patogênese. A atividade das proteínas codificadas pelos genes *PHPA\_29*, *PHPA\_43* como supressoras do sistema imune vegetal foi comprovada por Leite (2016) e de *EC23* por Qi *et al.* (2018). Esta capacidade de supressão da PTI e sua especificidade de expressão temporal suportam uma atividade efetora na infecção de soja por *P. pachyrhizi*. Todavia, considerando os picos de expressão observados na fase inicial da infecção, seria interessante uma maior amostragem no intervalo de tempo entre 0 e 24 hpi pra determinar se a indução desses genes ocorre em uma momento anterior à formação dos haustórios como foi visto para outros genes nas análises realizadas por Kunjeti *et al.* (2016) e por De Carvalho *et al.* (2017).

As proteínas *EC3318*, *PHPA\_29*, *PHPA\_43*, *CSEP09*, *HESP-C49* e *CSEP07* se localizaram tanto no núcleo quanto no citoplasma da célula vegetal, de forma condizente com outros estudos de localização subcelular de proteínas secretadas por patógenos biotróficos que demonstram que o núcleo e o citoplasma são os principais alvos das proteínas candidatas a efetoras. Liu *et al.* (2018) observou que 64 das 76 proteínas candidatas a efetores de *Plasmopara viticola* (PvRXLR) se localizaram no núcleo, no citoplasma ou em ambos identificando esses compartimentos como os mais comuns para o acúmulo das proteínas efetoras. Petre *et al.* (2016) trabalhando com 16 proteínas candidatas a efetores de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* identificou apenas cinco candidatas informativas, sendo que três com localização específica no núcleo e outras duas localizadas no núcleo e algum outro compartimento celular. O efector *PEC6*, de *Puccinia striiformis*, por exemplo, ao ser expresso em células vegetais se localizou no núcleo e no citoplasma. Esse efector é capaz de interagir com uma adenosina quinase, cuja localização também é nuclear e citoplasmática, e tem função de supressor da PTI (Liu *et al.*, 2016). A localização de efetores no núcleo das células vegetais não é surpreendente, pois acredita-se que uma de suas funções seja afetar a transcrição de genes ao interagir com fatores transcricionais que regulam respostas de defesa (McLellan *et al.*, 2012).

A proteína *RTP1* de *P. pachyrhizi* analisada não apresentou uma localização subcelular específica, contrastando com os resultados de Kemen *et al.* (2005). Esses autores verificaram que a proteína *RTP1* de *Uromyces fabae* com fusão da GFP na extremidade N-terminal apresentou localização nuclear ou citoplasmática dependendo do estágio de desenvolvimento do haustório. A ausência de localização específica pode ser explicada por diferentes motivos. Primeiro, no nosso estudo *RTP1* foi fusionada com GFP

na região C-terminal enquanto no estudo de Kemen *et al.* (2005), a fusão foi na região N-terminal. A fusão com a proteína fluorescente pode afetar um domínio essencial para interação da proteína do patógeno com o seu alvo na planta, como foi observado por Qi *et al.* (2016) com EC23. A fusão C-terminal da proteína EC23 à proteína fluorescente afetou a interação com a proteína-alvo (*GmSPL121*), a qual foi reestabelecida quando a proteína fluorescente foi fusionada na porção N-terminal. Outro motivo pode ser a falta de interação da proteína efetora com uma proteína da planta. A interação da proteína efetora pode ser muito específica, podendo ocorrer apenas com proteínas do hospedeiro natural e não interagir com homólogos de *N. benthamiana* (Dong *et al.*, 2014). A expressão de uma única proteína, na ausência de infecção, também pode ser vista como motivo para a proteína não ser destinada a um compartimento alvo. É possível que diferentes proteínas efetoras do patógeno e do hospedeiro interajam, ou que durante a infecção a ação de uma proteína na célula do hospedeiro afete a atividade de uma segunda proteína. É também possível que proteínas RTP1 de diferentes espécies de fungos causadores de ferrugens tenham evoluído diferentes funções na interação. Por último, a ausência de localização pode ser devido a um erro de predição; assim é possível que uma proteína predita como secretada, não seja realmente secretada (Petre *et al.*, 2015). Essa possibilidade poderia ser excluída por experimentos que comprovem a secreção da proteína predita, como sistema armadilha de secreção em leveduras utilizado por Zaramela (2011).

Trabalhos de localização subcelular por meio da expressão transiente em plantas modelo tem sido usado com sucesso na identificação de proteínas secretadas de fungos e oomicetos associadas com organelas como os cloroplastos (Petre *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018). Os cloroplastos têm formato arredondado a levemente achatado que por vezes podem ser confundidos com agregados citoplasmáticos. No estudo de localização das proteínas CSEP07 e CSEP09, evidenciou-se esses pequenos agregados. Porém, não se observou a co-localização dessas proteínas com a proteína marcadora de plastídeos, evidenciando a importância do uso conjunto de marcadores de organelas específicas para evitar a interpretação equivocada da localização subcelular.

A proteína EC23 apresentou uma localização distinta das demais, sem acúmulo no núcleo e com a formação de estruturas pequenas e pontuais. No estudo de localização subcelular realizado por Qi *et al.* (2016), no qual essa proteína foi fusionada à GFP na extremidade N-terminal, evidenciou-se também uma localização citoplasmática com

forte agregação da proteína. Estudos de complementação bimolecular da fluorescência (BiFC) realizados por Qi *et al* (2018) demonstraram que a proteína EC23 interage com o fator de transcrição *GmSPL121* e regula negativamente as respostas de defesa na soja e que a proteína EC23 também é capaz de interagir consigo mesma formando dímeros no citoplasma, que puderam ser visualizados como pequenos agregados. A partir da co-expressão do fator de transcrição *GmSPL121* e da proteína EC23 em *N. benthamiana*, Qi *et al* (2018) identificou que a interação entre EC23 e o fator de transcrição *GmSPL121* ocorre no núcleo da célula vegetal para regular as respostas de defesa na soja. É possível, portanto, que a localização citoplasmática observada para a proteína EC23 seja devido a formação de dímeros no citoplasma devido a super expressão da proteína EC23 que é necessária para visualização da fluorescência no estudo de localização subcelular e que esse resultado talvez não seja observado no sistema natural onde o nível de expressão da proteína EC23 é menor. A ausência de localização específica de EC23 também fortalece a necessidade de estudos adicionais empregando-se a fusão da GFP na porção N-terminal das proteínas para avaliar se a ausência de localização específica observada no nosso trabalho está relacionada com a fusão da GFP no domínio C-terminal das proteínas.

Outros estudos funcionais são necessários para agregar informações sobre os efeitos da expressão destes genes *in planta* e a sua função na patogênese. Por exemplo, estudos citológicos de deposição de calose, e acumulação de espécies reativas de oxigênio, supressão da imunidade vegetal (PTI e ETI) e silenciamento gênico com genes candidatos a efetores podem dar contribuir para o entender se as proteínas codificadas induzem ou suprimem respostas de defesa nas plantas, atuando como efetores. Estudos de co-imunoprecipitação poderiam, por exemplo, identificar as proteínas-alvo do hospedeiro que interagem com as proteínas candidatas a efetores.

A caracterização e validação de efetores por meio de abordagem genéticas é, de modo geral, difícil pois muitos efetores atuam de maneira redundante, de modo que a deleção de um gene efector pode ter impacto quantitativo na virulência do patógeno difícil de ser detectado. No caso específico dos fungos causadores de ferrugens, fatores complicadores adicionais são a sua natureza biotrófica e condição nuclear dicariótica. Assim uma alternativa seria a análise de mutantes virulentos naturais e induzidos por meio de uma abordagem genômica comparativa com foco na identificação de efetores reconhecidos pelo sistema imune vegetal, ou seja, que são codificados pelos genes de avirulência (Chen *et al.*, 2018). Estudos de expressão e de localização, como os efetuados

no presente trabalho, podem contribuir para a identificação dos melhores candidatos em uma região genômica associada com um ganho de virulência, facilitando estudos posteriores de validação de função, como a co-expressão dos genes candidatos com genes de resistência para observação da reação de hipersensibilidade (Lorrain *et al.*, 2018).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. **Importância Econômica e Social.** Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=importancia-economica-e-social&area=NC0yLTI>>. Acesso em: 24/11/18.

AGROSTAT. **Estatísticas de comércio exterior do agronegócio brasileiro.** Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>>. Acesso em: 29/12/2018.

ALHORAIBI, H.; BIGEARD, J.; RAYAPURAM, N.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Plant Immunity: The MTI-ETI Model and Beyond. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 30, p. 39, 2018.

ANDRADE, P.J.M.; ANDRADE, D.F.A.A. **Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira.** Circular técnica 11. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Chapadão do Sul: Fundação Chapadão, 11 p., 2002.

ASAI, T.; TENA, G.; PLOTNIKOVA, J.; WILLMANN, M.R.; CHIU, W.L.; GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T.; AUSUBEL, F.M.; SHEEN, J. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. **Nature**, v. 415, p. 977, 2002.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, p. 783-795, 2004.

BEZERRA, A.R.G.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; SOARES, M. M. Importância Econômica. In: **Soja: do plantio à colheita.** [Editado por: SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A.] – Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015. p. 333.

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

BREEN, S.; WILLIAMS, S.J.; OUTRAM, M.; KOBE, B.; SOLOMON, P.S. Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1. **Trends in Plant Sciences**, v. 22, p. 871-879, 2017.

BROMFIELD, K.R. **Soybean Rust**. St. Paul, MN: American Phytopathological Society. 65 p. 1984.

CALIL, I.P. **Caracterização funcional da proteína AtWWP1, componente de uma interconexão de fatores da interação geminivírus-hospedeiro envolvido na formação de corpos subnucleares**. 56 f. Dissertação de mestrado (Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802-805, 1994.

CHEN, J.; UPADHYAYA, N.M.; ORTIZ, D.; SPERSCHNEIDER, J.; LI F.; BOUTON, C.; BREEN, S.; DONG, C.; XU, B.; ZHANG, X.; MAGO, R.; NEWELL K.; XIA X.; BERNOUX, M.; TAYLOR, J.M.; STEFFENSON, B.; JIN, Y.; ZHANG, P.; KANYUKA, K.; FIGUEROA, M.; ELLIS, J.G.; PARK, R.F.; DODDS, P.N. Loss of *AvrSr50* by somatic exchange in stem rust leads to virulence for Sr50 resistance in wheat. **Science**, v. 358, p. 1607-1610, 2018.

CHILDS, S.P.; KING, Z.R.; WALKER, D.R.; HARRIS, D.K.; PEDLEY, K.F.; BUCK, J.W.; BOERMA, H.R.; LI, Z. Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, p. 27-41, 2017.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim de monitoramento agrícola**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 29/07/2019.

Consórcio Antiferrugem. **Ferrugem em números**. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/#/main>>. Acesso em: 04/01/2019.

COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 537, 2016.

CUTLER, S.; EHRHARDT, D.; GRIFFITTS, J.; SOMERVILLE, C. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 3718-3723, 2000.

DABNEY-SMITH, C.; VAN DEN WIJNGAARD, P.W.; TREECE, Y.; VREDENBERG, W.J.; BRUCE, B.D. The C terminus of a chloroplast precursor modulates its interaction with the translocation apparatus and PIRAC. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 32351-32359, 1999.

DALLA LANA, F.; PAUL, P.A.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M.; DA SILVA, L.H.C.P.; SIQUERI, F.V.; FORCELINI, C.A.; JACCOUD-FILHO, D.S.; MIGUEL-WRUCK, D.S.; BORGES, E.P.; JULIATTI, F.C.; CAMPOS, H.D.; NUNES, J.JR.; CARNEIRO, L.C.; CANTERI, M.G.; ITO, M.F.; MEYER, M.C.; MARTINS, M.C.; BALARDIN, R.S.; FURLAN, S.H.; CARLIN, V.J.; DEL PONTE, E.M. Meta-Analytic Modeling of the Decline in Performance of Fungicides for Managing Soybean Rust after a Decade of Use in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, p. 807-817, 2018.

DANGL, J.L.; HORVATH, D.M.; STASKAWICZ, B.J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, p. 746-751, 2013.

DE CARVALHO, M.C.; COSTA NASCIMENTO, L.; DARBEN, L.M.; POLIZEL-PODANOSQUI, A.M.; LOPES-CAITAR, V.S.; QI M.; ROCHA C.S.; CARAZZOLLE, M.F.; KUWAHARA, M.K.; PEREIRA, G.A.; ABDELNOOR, RV.; WHITHAM, SA.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C. Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, p. 363-377, 2017.

DE WIT, P.J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p. 2726- 2732, 2007.

DE WIT, P.J. *Cladosporium fulvum* effectors: weapons in the arms race with tomato. **Annual Review of Phytopathology**, v. 54, p. 1-23, 2016.

DE WIT, P.J.; SPIKMAN, G. Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. **Physiological Plant Pathology**, v. 21, p. 1-11, 1982.

DESLANDES, L.; RIVAS, S. The plant cell nucleus: a true arena for the fight between plants and pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p. 42-48, 2011.

DONG, S.; STAM, R.; CANO, L.M.; SONG, J.; SKLENAR, J.; YOSHIDA, K.; BOZKURT, T.O.; OLIVA, R.; LIU, Z.; TIAN, M.; WIN, J.; BANFIELD, M.J.; JONES,

A.M.; VAN DER HOORN, R.A.; KAMOUN, S. Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen. **Science**, v. 343, p. 552-555, 2014.

DOWEN, R.H.; ENGEL, J.L.; SHAO, F.; ECKER, J.R.; DIXON, J.E. A family of bacterial cysteine protease type III effectors utilize acylation-dependent and independent strategies to localize to plasma membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 23, p. 15867-15879, 2009.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, p. 1005-1016, 2000.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/sojaemnumeros/>>. Acesso em: 24/01/18.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja** – Região Central do Brasil 2012 e 2013. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2013. p. 264.

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

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; DE 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**, v.117, p. 545–553, 2008.

GAVA, S.G. **Identificação e caracterização de genes do fungo *Phakopsora pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas na fase pré-biotrófica da patogênese**. 53 f. Monografia (Bacharelado em Bioquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

GLAZEBROOK, J.; ROGERS, E.E.; AUSUBEL, F.M. Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. **Annual review of Genetics**, v. 31, p. 547-569, 1997.

GODOY, C.V.; BUENO, A.F.; GAZZIERO, D.L.P. Brazilian soybean pest management and threats to its sustainability. **Outlooks on Pest Management**, v. 26, p. 113-117, 2016.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v. 11 p. 169-177, 2010.

GOMORD, V.; DENMAT, L.A.; FITCHETTE-LAINÉ, A.C.; SATIAT-JEUNEMAITRE, B.; HAWES, C.; FAYE, L. The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. **The Plant Journal**, v. 11, p. 313-325, 1997.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1773, 1996.

HARTMAN, G.L.; WEST, E.D.; HERMAN, T.K. Crops that feed the world 2. Soybean – worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v.3, p. 5-17, 2011.

HE, Z.H.; CHEESEMAN, I.; HE, D.; KOHORN, B.D. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1–5*, are expressed in specific organs of Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 1189-1196, 1999.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina. Embrapa Soja, 5. ed., 2014. p. 76.

HENNING, P. **Einige neue japanische Uredinales**. Hedwigia, v. IV (Suppl.), p.107–108, 1903.

HYTEN, D.L.; HARTMAN, G.L.; NELSON, R.L.; FREDERICK, R.D.; CONCIBIDO, V.C.; NARVEL, J.M.; CREGAN, P.B. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 47, p. 837–840, 2007.

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

JELENSKA, J.; YAO, N.; VINATZER, B.A.; WRIGHT, C.M.; BRODSKY, J.L.; GREENBERG, J.T. AJ domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. **Current Biology**, v. 17, p. 499-508, 2007.

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

JONES, J.D.; VANCE, R.E.; DANGL, J.L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. **Science**, v. 354, p. 6395, 2016.

KAKU, H.; NISHIZAWA, Y.; ISHII-MINAMI, N.; AKIMOTO-TOMIYAMA, C.; DOHMAE, N.; TAKIO, K.; MINAMI, E.; SHIBUYA, N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 11086-11091, 2006.

KALL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E.L.L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W429-W432, 2007.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 193-195, 2002.

KEMEN, E.; KEMEN, A.C.; RAFIQI, M.; HEMPEL, U.; MENDGEN, K.; HAHN, M.; VOEGELE, R.T. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 1130-1139, 2005.

KOCH, E.; EBRAHIM-NESBAT, F.; HOPPE, H.H. 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.

KOECK, M.; HARDHAM, A.R.; DODDS, P.N. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. **Cellular microbiology**, v. 13, p. 1849-1857, 2011.

KUNJETI, S.G.; IYER, G.; JOHNSON, E.; LI, E.; BROGLIE, K.E.; RAUSCHER, G.; RAIRDAN, G.J. Identification of *Phakopsora pachyrhizi* candidate effectors with virulence activity in a distantly related pathosystem. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 269, 2016.

LEVY, C. Epidemiology and chemical control of soybean rust in southern Africa. **Plant Disease**, v. 89, p. 669–674, 2005.

LEITE, L.N. **Identificação de genes de *Phakopsora pachyrhizi* que codificam efetores supressores da imunidade ativada por PAMPs**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2016.

LI, S.; SMITH, J.R.; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, p. 133–142, 2012.

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, n. 4, p. 379-393, 2014.

LIU, C.; PEDERSEN, C.; SCHULTZ-LARSEN, T.; AGUILAR, GB.; MADRIZ-ORDEÑANA, K.; HOVMØLLER, MS.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The stripe rust fungal effector PEC 6 suppresses pattern-triggered immunity in a host species-independent manner and interacts with adenosine kinases. **New Phytologist**, v. 9, p. 1294, 2016.

LIU, Y.; LAN, X.; SONG, S.; YIN, L.; DRY, I.B.; QU, J.; XIANG, J.; LU, J. In Planta functional analysis and subcellular localization of the oomycete pathogen *Plasmopara viticola* candidate RXLR effector repertoire. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 286, 2018.

LORRAIN, C.; GONÇALVES DOS SANTOS, K.C.; GERMAIN, H.; HECKER, A.; DUPLESSIS, S. Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. **New Phytologist**, v. 222, p. 1190-1206, 2018.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

McLELLAN, H.; BOEVINK, PC.; ARMSTRONG, MR.; PRITCHARD, L.; GOMEZ, S.; MORALES, J.; WHISSON, S.C.; BEYNON, J.L.; BIRCH, P.R. An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription

factors from the endoplasmic reticulum to the nucleus. **PLoS Pathogens**, v. 9, n.10, p. e1003670, 2013.

MEDINA, J. C. *et al.* Introdução e evolução da soja no Brasil. In: **A soja no Brasil**. [Editado por: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C.] 1. ed. Instituto de tecnologia de alimentos, 1982. p. 1062.

MITCHUM, M.G.; HUSSEY, R.S.; BAUM, T.J.; WANG, X.; ELLING, A.A.; WUBBEN, M.; DAVIS, E.L. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. **New Phytologist**, v. 199, p. 879-894, 2013.

Mycobank. **Mycobank database: Fungal database, nomenclature & Species banks**. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=134256>>. Acesso em: 04/01/2019

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.

PAUL, C.; HILL, C.B. Comparisons of visual rust assessments and DNA levels of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean genotypes varying in rust resistance. **Plant Disease**, v. 95, p. 1007-1012, 2011.

PETRE, B.; SAUNDERS, D.G.; SKLENAR, J.; LORRAIN, C.; WIN, J.; DUPLESSIS, S.; KAMOUN, S. Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, p. 689-700, 2015.

PETRE, B.; SAUNDERS, D.G.; SKLENAR, J.; LORRAIN, C.; KRASILEVA, K.V.; WIN, J.; DUPLESSIS, S.; KAMOUN, S. Heterologous expression screens in *Nicotiana benthamiana* identify a candidate effector of the wheat yellow rust pathogen that associates with processing bodies. **PloS One**, v. 11, e0149035, 2016.

PIERLEONI, A.; MARTELLI, P.L.; CASADIO, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 392, 2008.

POUEYMIRO, M.; GENIN, S. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 44-52, 2009.

QI, M.; LINK, T.I.; MÜLLER, M.; HIRSCHBURGER, D.; PUDAKE, R.N.; PEDLEY, K.F.; BRAUN, E.; VOEGELE, R.T.; BAUM, T.J.; WHITHAM, S.A. A small cysteine-rich protein from the Asian soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, suppresses plant immunity. **PLoS Pathogens**, v. 12, e1005827, 2016.

QI, M.; GRAYCZYK, J.P.; SEITZ, J.M.; LEE, Y., LINK, T.I.; CHOI, D.; PEDLEY, K.F.; VOEGELE, R.T.; BAUM, T.J.; WHITHAM, S.A. Suppression or activation of immune responses by predicted secreted proteins of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, p. 163-174, 2018.

QIU, L.J.; CHANG, R.Z. **The origin and history of soybean**. In: The soybean: botany, production and uses. – [Editado por: GURIQBAL, S.] – Ludhiana, India: Ed. Punjab Agricultural University, 2010. p. 512.

RADICS, J.; KÖNIGSMAIER, L.; MARLOVITS, T.C. Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 21, p. 82, 2014.

RANF, S.; GISCH, N.; SCHÄFFER, M.; ILLIG, T.; WESTPHAL, L.; KNIREL, Y.A.; SÁNCHEZ-CARBALLO, P.M.; ZÄHRINGER, U.; HÜCKELHOVEN, R.; LEE, J.; SCHEEL, D. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Immunology**, v. 16, p. 426, 2015.

ROBIN, G.P.; KLEEMANN, J.; NEUMANN, U.; CABRE, L.; DALLERY, J.F.; LAPALU, N.; O'CONNELL, R.J. Subcellular localization screening of *Colletotrichum higginsianum* effector candidates identifies fungal proteins targeted to plant peroxisomes, Golgi bodies and microtubules. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 562, 2018.

SAITO, C.; UEDA, T.; ABE, H.; WADA, Y.; KUROIWA, T.; HISADA, A.; FURUYA, M.; NAKANO, A. A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 29, p. 245-255, 2002.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **Journal of Phytopathology**, v. 132, n. 4, p. 339-342, 1991.

SANTOS, O.S. **A cultura da soja**. 1: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Rio de Janeiro: Globo, 1988. p. 299.

SCHNEIDER, R.W.; HOLLIER, C.A.; WHITAM, H.K.; PALM, M.E.; MCKEMY, J.M.; HERNÁNDEZ, J.R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, v. 89, p. 774–774, 2005.

SCHOLTENS-TOMA, I.M.J.; DEWIT, G.J.M.; DE WIT, P.J.G.M. Characterization of elicitor activities of apoplastic fluids isolated from tomato lines infected with new races of *Cladosporium fulvum*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 95, p. 161-168, 1989.

SCHORNACK, S.; VAN DAMME, M.; BOZKURT, T.O.; CANO, L.M.; SMOKER, M.; THINES, M.; GAULIN, E.; KAMOUN, S.; HUITEMA, E. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 17421-17426, 2010.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M.G.; SEDIYAMA, C.S.; GOMES, J.L.L. **Cultura da Soja – Parte I**. Viçosa, MG: UFV, Imp. Univ., 1985. p. 96.

SEDIYAMA, T. Origem, evolução e importância econômica. In: **Tecnologia de produção e usos da soja**. – [Editado por: SEDIYAMA, T.] – Londrina, PR: Mecnas, 2009. p. 1-5.

SILVA, D.C.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R.L.; ARIAS, C.A.; NEPOMUCENO, A.L.; DI 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.

SLAMINKO, T.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; BONDE, M.R.; HARTMAN, G.L. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Disease**, v. 92, p. 767–771, 2008.

SPERSCHNEIDER, J.; DODDS, P.N.; TAYLOR, J.M.; DUPLESSIS, S. Computational Methods for Predicting Effectors in Rust Pathogens. In: **Wheat Rust Diseases** Springer New York, 2017. p. 73-83.

THOMMA, B.P.; VAN ESSE, H.P.; CROUS, P.W.; DE WIT, P.J. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, p. 379-393, 2008.

TMHMM Server 2.0. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>>  
Acesso em: 01/02/2019.

TZFIRA, T1.; TIAN, G.W.; LACROIX, B.; VYAS, S.; LI, J.; LEITNER-DAGAN, Y.; KRICHEVSKY, A.; TAYLOR, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSKEY, V. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 503, 2005.

UTIYAMA, A.S.; ABE, V.Y.; DARBEN, L.M.; CARVALHO, K.; CARVALHO, M.C.C.G.; MARCELINO-GUIMARAES, F.C. Avaliação funcional de proteínas candidatas a efetores de *Phakopsora pachyrhizi* por meio da análise de espécies reativas a oxigênio (ROS) e deposição de calose. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 13., Londrina. Resumos expandidos. Londrina: Embrapa Soja, 2018.

USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: <[www.usda.gov](http://www.usda.gov)>. Acesso em: 24/01/18.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; OLIVER, R.P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, p. 196-206, 2014.

WANG, S.; MCLELLAN, H.; BUKHAROVA, T.; HE, Q.; MURPHY, F.; SHI, J.; SUN, S.; VAN WEYMERS, P.; REN, Y.; THILLIEZ, G.; WANG, H.; CHEN, X.; ENGELHARDT, S.; VLEESHOUWERS, V.; GILROY, E.M.; WHISSON, S.C.; HEIN, I.; WANG, X.; TIAN, Z.; BIRCH, P.R.J.; BOEVINK, P.C. *Phytophthora infestans*

RXLR effectors act in concert at diverse subcellular locations to enhance host colonization. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, p. 343-356, 2018.

WU, C.H.; DEREVNINA, L.; KAMOUN, S. Receptor networks underpin plant immunity. **Science**, v. 360, p. 1300-1301, 2018.

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

ZARAMELA, L.S. **Caracterização do secretoma de *Phakopsora pachyrhizi* expresso durante a interação com a soja**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.