

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de
Austropuccinia psidii

Mariana da Silva Lopes

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Mariana da Silva Lopes
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de
Austropuccinia psidii

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **MARIA CAROLINA QUECINE VERDI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Lopes, Mariana da Silva

Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de *Austropuccinia psidii* / Mariana da Silva Lopes. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

71 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Interação planta-patógeno 2. Ferrugem 3. Eucalipto 4. RT-qPCR I. Título

À minha família pelo incentivo, compreensão, amor e companheirismo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades, por sempre guiar o meu caminho e estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha querida orientadora Maria Carolina Quecine Verdi que não mediu esforços para me auxiliar em cada passo do projeto, pelo apoio, confiança, paciência e pelos conselhos nos momentos difíceis.

Ao meu coorientador Ronaldo José Durigan Dalio pelo apoio fundamental, instruções, sugestões e por sua prontidão em auxiliar.

Ao professor João Lúcio de Azevedo, pelo exemplo de vida e profissional.

À toda minha família, pelo apoio e união. Vocês são e sempre serão minha base.

A todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório Genética de Microrganismos, Bruna, Bia, Jack, Rê, Helena, Jéssica, Joelma, Renatinha, Paula, Sarina, Everthon, Rafa, Daniel, Giulio, Tiago, pelo agradável convívio, auxílio e pelas engraçadas conversas.

Um agradecimento especial para o grupo *Puccinia*, Isa, Bruno, Andressa, Carolzinha e Gustavo, pela amizade, troca de conhecimentos, esforço para cuidar das nossas plantinhas e solucionar os infindáveis desafios da “saga Puccinia”.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Labate e Dra. Mônica Teresa Veneziano Labate por disponibilizarem o laboratório e equipamentos para condução dos experimentos e análises.

Ao técnico Carlinhos, do Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas, pela ajuda e disposição nas inúmeras quantificações.

À Lívia Maria Franceschini e Fernando Correr pelo auxílio nas análises de bioinformática.

Aos funcionários do Viveiro de Mudas do Departamento de Ciências Florestais, Donizete Aparecido Sabino e Natanael da Silva Duarte pelo cuidado com as nossas mudas e suporte no processo de clonagem.

Às minhas amigas Isa, Cris, Kelly e Lu pelas conversas, conselhos e risadas. Mesmo não estando tão próximas como gostaríamos, devido nossa corrida vida de pós-graduandas, sabemos que podemos contar uma com a outra.

A todos os funcionários do Departamento de Genética pelo suporte.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e a todos os professores pelos ensinamentos e contribuição na minha formação acadêmica.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas”

O Pequeno Príncipe

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1. SETOR FLORESTAL E EUCALIPTOCULTURA	11
2.2. AUSTROPUCCINIA PSIDII	11
2.2.1. <i>Sintomatologia e desenvolvimento da doença em eucalipto</i>	13
2.2.2. <i>Ciclo de vida</i>	14
2.2.3. <i>Estruturas de infecção e desenvolvimento in vitro</i>	15
2.3. INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO	17
2.3.1. <i>Efetores: definição, importância e métodos de estudo</i>	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.4. AMOSTRAS BIOLÓGICAS	25
2.5. PREDIÇÃO IN SILICO DE CANDIDATOS A EFETORES	25
2.6. SELEÇÃO DE CANDIDATOS A EFETORES.....	26
2.6.1. <i>Desenho e validação de primers</i>	27
2.7. EXPRESSÃO DOS EFETORES	29
2.7.1. <i>Bioensaio de desenvolvimento in vitro</i>	29
2.7.2. <i>RT-qPCR</i>	30
3. RESULTADOS	33
3.1. PREDIÇÃO IN SILICO DE CANDIDATOS A EFETORES.....	33
3.2. SELEÇÃO DOS CANDIDATOS	35
3.2.1. <i>Validação dos primers</i>	38
3.3. EXPRESSÃO DOS EFETORES	38
3.3.1. <i>Bioensaio de desenvolvimento in vitro</i>	38
3.3.2. <i>RT-qPCR</i>	40
4. DISCUSSÃO	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	67

RESUMO

Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de *Austropuccinia psidii*

Austropuccinia psidii (sin *Puccinia psidii*) é um fungo biotrófico capaz de infectar diversos gêneros de mirtáceas. É uma ferrugem (Pucciniales) nativa da América do Sul que apresenta ampla distribuição e rápida dispersão geográfica, alcançando atualmente a Austrália, centro de diversidade das mirtáceas. Este patógeno tem alarmado a comunidade científica devido à vasta capacidade de dispersão e por causar perdas econômicas consideráveis em culturas de interesse comercial, com destaque na eucaliptocultura. Apesar de sua importância, estudos relacionados ao patossistema *A. psidii* - *Eucalyptus* ainda são incipientes e o entendimento das bases moleculares envolvidas na interação planta-patógeno é essencial para adoção de medidas de controle eficazes e duradouras. Atualmente, a busca por candidatos a efetores tem crescido consideravelmente, pois são moléculas capazes de alterar a fisiologia do hospedeiro, suprimindo ou ativando os mecanismos de defesa. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi identificar *in silico* genes candidatos a efetores e validá-los por meio de análise de expressão por RT-qPCR. Para predição dos genes candidatos a efetores foi utilizado o genoma parcial de *A. psidii* e uma *pipeline* específica, baseada em diversos parâmetros, tais como: presença do peptídeo sinal, ausência de domínio transmembrana e superfície de ancoragem e pequeno tamanho. Foram identificados 2.886 candidatos, dos quais 13% apresentaram similaridade com Pucciniales. As categorias mais importantes de localização preditas foram apoplasto (87,3%), cloroplasto (7%) e núcleo (4,1%). Oito candidatos foram selecionados para análise de expressão após mineração em dados de RNA-seq. Os ensaios foram realizados *in vitro* com uredósporos de duas populações distintas de *A. psidii*, uma proveniente de eucalipto (MF-1) e outra de *S. jambos* (GM-J1); as amostras foram coletadas em 6, 12 e 24 horas após inoculação (h.a.i.). O perfil de expressão dos candidatos variou entre os tempos investigados, dois mostraram altos valores de expressão em todos os tempos, enquanto quatro foram mais expressos nos tempos iniciais (6 e 12 h.a.i.), apresentando diminuição ou repressão a partir de 24 h.a.i. Os tempos iniciais correspondem às fases de germinação e pré-penetração, confirmando assim a predição desses quatro candidatos como apoplásticos. Foi observado um perfil diferencial de expressão entre as duas populações do patógeno, o que sugere uma provável modulação pelo hospedeiro de origem na expressão dos candidatos a efetores, fato ainda pouco abordado na literatura e que deve ser melhor investigado. Apesar do trabalho ter sido realizado *in vitro*, foi possível selecionar forte candidatos para continuidade dos estudos, incluindo a validação *in planta* e caracterização funcional. Os dados são de relevante importância em vista a escassez de informações biológicas desse patossistema e fornecem uma visão inicial de como esses efetores atuam na interação planta-patógeno e em diferentes hospedeiros.

Palavras-chave: Interação planta-patógeno; Ferrugem; Eucalipto; RT-qPCR

ABSTRACT

In silico identification and transcriptional profile of effector candidate genes from***Austropuccinia psidii***

Austropuccinia psidii (sin *Puccinia psidii*) is a biotrophic pathogen that infects several genera of Myrtaceae. It is a rust (Pucciniales) native from South America displaying abroad geographic distribution, including Australia, Myrtaceae diversity center. This pathogen has alarmed the scientific community due the wide dispersion ability and the considerable economic losses in crops of commercial interest, highlighting eucalyptus crop. Despite its importance, studies with the *A. psidii-Eucalyptus* pathosystem are still incipient and the knowledge about the molecular basis involved in the plant-pathogen interaction is essential to adoption of effective and durable control measures. Currently, the search for effector candidates has increased considerably because they are molecules that alter the host physiology, suppressing or activating the defense response. In this way, the aim of this study was identifying in silico effectors candidate genes and validates them through expression analysis by RT-qPCR. To predict the effector candidate genes were used the draft genome of *A. psidii* and a specific pipeline, based on several parameters, such as, presence of signal peptide, absence of transmembrane domain and anchorage surface, and small size. Were identified 2.886, of which 13% are similar to Pucciniales. The predicted localization categories most important were apoplast (87.3%), chloroplast (7%) e nucleus (4.1%). Eight candidates were selected for expression analysis after mining in RNA-seq data. The assays in vitro were carried out using uredospores from two distinct populations of *A. psidii*, one from eucalyptus (MF-1) and other from *S. jambos* (GM-J1); the samples were collected 6, 12 and 24 hours after inoculation (h.a.i). The expression profile of the candidates was distinct among the times investigated; two showed high expression values in all times, while four were more expressed in the early times (6 and 12 h.a.i) exhibiting decreasing or repression 24 h.a.i. The early times corresponds to the germination and pre-penetration steps, confirming the prediction of these four candidates as apoplastics. A different expression profile was found among the two pathogen populations, suggesting a probable modulation by the origin host in the expression of effectors candidate, fact little approached in the literature and that should be more investigated. Although the search had been realized in vitro, it was possible select potential effectors candidates for further studies, including in plant validation and functional characterization. The data are of relevant importance in view of the scarcity of biological information of this pathosystem and provide an initial vision of how these effectors act in the plant-pathogen interaction and in different hosts.

Keywords: Plant-pathogen interaction; Rust; Eucalyptus; RT-qPCR

1. INTRODUÇÃO

Há uma grande diversidade de microrganismos na Terra, os quais atuam em diversos nichos ecológicos desempenhando inúmeras funções nos ecossistemas. Muitos microrganismos adaptaram-se a explorar as plantas como nichos, devido à variedade de microhabitats que estas apresentam, tais como, filosfera, rizosfera e endosfera (Montesinos, 2003), associada à disponibilidade de nutrientes e abrigo. Apesar de todas as plantas estudadas apresentarem microrganismos associados (Strobel et al., 2004) os quais podem trazer inúmeros benefícios às plantas, uma pequena fração, os denominados patógenos, foi capaz de superar os mecanismos de resistência e causar doenças em plantas (Montesinos, 2003; Ferreira et al., 2006).

Patógenos de plantas incluem bactérias, fungos e nematoides (Agris, 2005), sendo que os fungos são considerados os patógenos mais importantes entre os eucariotos (Ferreira et al., 2006). De acordo com o estilo de vida podem ser classificados como necrotróficos, hemibiotróficos e biotróficos (Agris, 2005). Os fungos biotróficos obtêm seus nutrientes de células vivas do hospedeiro, sendo inteiramente dependentes do mesmo para crescimento e reprodução (Catanzariti et al., 2006), dessa forma, seu estudo torna-se muito mais laborioso devido à dificuldade de cultivá-los *in vitro* (Quecine et al., 2014).

As ferrugens (Basidiomicetos da ordem Pucciniales) constituem o grupo mais diverso de patógenos biotróficos (Duplessis et al., 2011) e apresentam grande importância pelo fato de atacarem culturas de expressiva relevância econômica (Kolmer et al., 2009). *Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken conhecida como Ferrugem das Mirtáceas, infecta pelo menos 56 gêneros de mirtáceas (Machado et al., 2015), sendo os danos econômicos mais significativos na cultura do eucalipto. No Brasil, a eucaliptocultura representa aproximadamente 72% das florestas plantadas, com uma produtividade de 39 m³/ha.ano (IBÁ, 2015) e os danos causados pela doença podem ocasionar reduções entre 15 a 35% do incremento anual (Auer et al., 2016). Além disso, a preocupação com essa ferrugem tem crescido após a sua detecção na Austrália: centro de origem do eucalipto e centro de diversidade das mirtáceas (Carnegie et al., 2010).

Apesar da importância de *A. psidii*, pouco conhecimento se tem da sua biologia. Esforços têm sido realizados para sequenciamento do genoma do patógeno (Quecine et al., 2012; Tan et al., 2014), o qual pode elucidar as bases moleculares da interação planta-patógeno. Sabe-se que durante o processo de infecção ocorre uma batalha a nível molecular; enquanto os hospedeiros tentam reconhecer e impedir a germinação e prosseguimento da infecção, os patógenos tentam suprimir o reconhecimento pelo hospedeiro. Dentro desse contexto, as moléculas efetoras merecem destaque, pois podem suprimir o sistema de defesa das plantas para garantir o desenvolvimento da doença. Obviamente, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de reconhecer tais moléculas, o que estabelece o modelo zigue-zague na interação planta-patógeno (Hogenhout et al., 2009; Jones e Dangl, 2006).

Atualmente, há um grande esforço para caracterizar esses efetores, uma vez que fornecem um melhor entendimento sobre a patogenicidade, resistência e especificidade com os hospedeiros (Ellis et al., 2009). Além disso, os efetores têm sido alvo de novas estratégias de controle de doenças. É conhecido que cada efector contribui de forma parcial para a virulência final e muitos podem apresentar redundância funcional. Apesar disso, existem alguns efetores denominados de “fundamentais”, os quais desempenham contribuição relevante para a virulência (Dangl et al., 2013) e podem ser empregados no controle de doenças por meio da obtenção de hospedeiros resistentes (Dalió et al., 2014).

Considerando a importância dessas moléculas na interação planta-patógeno aliado ao escasso conhecimento a respeito da biologia do fungo *A. psidii*, o objetivo do presente trabalho foi identificar, *in silico*, genes candidatos a efetores presentes no genoma de *A. psidii* e validá-los por meio de análise de expressão gênica (RT-qPCR) durante o desenvolvimento *in vitro* de duas populações distintas do patógeno.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Setor florestal e Eucaliptocultura

O setor florestal apresenta grande importância no cenário mundial e brasileiro. No mundo a área florestal compreende 3.999 milhões de hectares (ha), dos quais 291 milhões de hectares correspondem as florestas plantadas (FAO, 2015). O Brasil apresenta 7,74 milhões de hectares de florestas plantadas, sendo esse setor responsável por 91% da madeira produzida com fins industriais, movimentando um PIB de R\$7,8 mil/ ha e com geração de 610 mil empregos diretos (IBÁ, 2015).

A madeira proveniente do setor florestal é destinada a diversos segmentos produtivos, tais como, produção de celulose, painéis de madeira reconstituída e compensada, pisos laminados, indústria moveleira e setor energético (carvão vegetal e biomassa). De todos os segmentos, o que merece destaque é o de produção de celulose, pois 34% de toda área plantada é destinada a esse setor, o que confere ao Brasil a quarta posição mundial entre os principais produtores (IBÁ, 2015) e o primeiro produtor mundial de celulose de eucalipto (fibra curta). Vale destacar que 64% da celulose produzida no país é exportada.

Dos 7,74 milhões de ha de florestas plantadas 72% correspondem ao gênero *Eucalyptus*. O eucalipto é uma mirtácea nativa da Austrália que foi introduzido no Brasil em 1825 com fins ornamentais (Andrade, 1961). Devido sua adaptabilidade, a espécie foi cultivada no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul a partir de 1868, para produção de lenha. A expansão a nível comercial ocorreu no início do século XX em resposta ao desenvolvimento da malha ferroviária (Pereira et al., 2000).

Atualmente, os plantios de eucalipto apresentam uma produtividade anual de 39 m³/ha, sendo os principais estados produtores Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (IBÁ, 2015). O segmento apresentou crescimento de 0,3% ao ano entre 2008 – 2014 em resposta aos programas de melhoramento genético clássico. Tais índices de produtividade e crescimento devem-se a alta adaptabilidade da espécie às condições climáticas e edáficas brasileiras (Da Silva, 2010).

2.2. *Austropuccinia psidii*

A. psidii (conhecido como *Puccinia psidii*), agente causal da ferrugem das mirtáceas, é um fungo basidiomiceto da ordem Pucciniales, sendo seu gênero recentemente reclassificado por Beenken (2017) baseado em análises filogenéticas moleculares e morfológicas. O patógeno é capaz de infectar cerca de 244 espécies de mirtáceas, distribuídas em 56 gêneros (Machado et al., 2015), tal fato difere das demais ferrugens, as quais apresentam, geralmente, dois hospedeiros.

A. psidii foi originalmente descrita em goiaba (*Psidium guajava*) em Santa Catarina por Winter (1884), portanto é considerada nativa da América do Sul (Coutinho et al., 1998; Glen et al., 2007). Atualmente, é encontrada praticamente no mundo todo, sendo reportada na Flórida, Califórnia, Havai, Cuba, República Dominicana, Jamaica, Porto Rico e Trindade, Argentina, Brasil, Equador, Colômbia, Venezuela, Paraguai, Uruguai, China, Japão e Austrália (Coutinho et al., 1998; Carnegie et al., 2010; Morin et al., 2014). Os últimos relatos indicam sua presença na África do Sul (Roux et al., 2013), Nova Caledônia (Giblin, 2013) e Indonésia (Mctaggart et al., 2016).

Na Austrália *A. psidii* foi registrada em 2010, infectando os hospedeiros *Agonis flexuosa*, *Callistemon viminalis* e *Syncarpia glomulifera* (Carnegie et al., 2010). Desde sua introdução, a ferrugem das mirtáceas tem se difundido rapidamente pelas regiões climaticamente favoráveis, representando uma séria ameaça à flora nativa, já que o país é considerado centro de diversidade das mirtáceas (Glen et al., 2007; Morin et al., 2014).

No Brasil, apesar de ter sido reportada pela primeira vez em 1884, foi detectada em eucalipto somente em 1912, sendo comprovadamente descrita em 1944 (Joffily, 1944). Os primeiros surtos iniciaram-se em 1973 em viveiros e plantios de *E. grandis* com menos de um ano e meio de idade, e desde então, surtos esporádicos e severos atingiram plantações e viveiros nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, sul da Bahia e São Paulo (Ferreira, 1983). Estima-se que os ataques podem causar até 60% de redução no crescimento (Dianese et al., 1984) e reduções de 20-40% em termos de produção de volume de madeira (Takahashi, 2002; Santos, 2006; Masson, 2009).

Pouco se sabe sobre a história evolutiva de *A. psidii*, e ainda não há respostas concretas que expliquem como este patógeno foi capaz de infectar o eucalipto - um hospedeiro não nativo - em um tempo evolutivamente pequeno, considerando a introdução do mesmo no Brasil. A teoria mais aceita é o processo de *host jump*, que consiste no deslocamento do patógeno entre hospedeiros distantes taxonomicamente (Stukenbrock e McDonald, 2008). Inicialmente, foi proposto que *A. psidii* tenha se deslocado da goiabeira, onde foi primeiramente descrito, para o eucalipto (Castro et al., 1983), entretanto, Graça et al. (2013) rejeitaram essa hipótese com base em estudos com marcadores microssatélites e discutem a possibilidade de o processo ter ocorrido a partir de jameiro.

Estudos genéticos e moleculares com a espécie são ainda incipientes. Atualmente, este grupo de pesquisa tem direcionado esforços para a aplicação das ômicas no entendimento da interação planta-patógeno (Projeto FAPESP 2014/16804-4). Até o momento o genoma do patógeno foi sequenciado em três plataformas distintas de sequenciamento: 454 (Roche) (Quecine et al., 2012), MiSeq (Illumina) e SMRT (PacBio) (dados não publicados). Por meio de uma montagem híbrida o tamanho do genoma foi estimado em 630 Mb, cerca de 10x maior em relação a outras espécies de basidiomicetos, com uma cobertura de 17x. A partir dos dados do genoma foram investigados genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, o que possibilitou o desenvolvimento de uma estratégia de diferenciação *in vitro* do patógeno, permitindo a análise de seu transcriptoma posteriormente (Bini, 2016). Além disso, foi realizado um estudo aprofundado do papel dos elementos transponíveis na expansão do genoma (Tsui, 2015), bem como, a análise do genoma mitocondrial, no qual foi detectado genes relacionados à virulência do patógeno (Almeida et al. – dados não publicados).

Paralelamente aos estudos genômicos, o transcriptoma proveniente da diferenciação morfológica *in vitro*, até 24 horas após a inoculação, foi obtido pelo sequenciamento na plataforma HiSeq (Illumina) (Bini, 2016). Foi detectada a presença de proteases, quitinases e lipases, as quais estão envolvidas na degradação da parede celular do hospedeiro e crescimento do patógeno. Tais dados, juntamente com dados de expressão *in vivo* (em andamento,) poderão elucidar o controle de expressão de genes regidos nos primeiros estágios de infecção. Estudos do proteoma proveniente de uredósporos de frutos de goiabeira e folhas de eucalipto indicou a presença de proteínas exclusivas e outras diferencialmente expressas de acordo com o hospedeiro de origem, indicando uma modulação da expressão gênica relacionada à variabilidade fisiológica dessas populações (Quecine et al. 2016).

2.2.1. Sintomatologia e desenvolvimento da doença em eucalipto

Em eucalipto, *A. psidii* infecta somente folhas jovens, sendo um problema em viveiros e plantios com até dois anos de idade (Alfenas et al., 2009, Auer et al., 2016). Os principais sintomas em hospedeiros altamente suscetíveis são deformações, necroses, hipertrofias e perda da dominância apical (Ferreira, 1983) (Figura 1c).

Em hospedeiros suscetíveis, a primeira manifestação da doença é a presença de pequenas pontuações verde-claras. Após alguns dias, essas pontuações tornam-se pústulas, as quais ficam carregadas de uma massa de esporos de coloração amarela, característica que confere o nome “ferrugem” e é utilizada para diagnose da doença (Figura 1a e 1b) (Ferreira, 1983). Em hospedeiros resistentes, dois processos podem ser detectados: a imunidade na qual não há a formação de pústulas nem de lesões necróticas e a reação de hipersensibilidade, com a formação de lesões necróticas sem esporulação (Ferreira, 1983; Glen et al., 2007).



Figura 1. Sinais e sintomas de *Austropuccinia psidii* em eucalipto. (a) Uredósporos em folhas, (b) pústulas com uredósporos, (c) morte apical. Figura retirada de Glen et al. (2007).

As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença são temperaturas entre 18 - 25° C e umidade relativa superior a 90%, sendo que maiores taxas de germinação são obtidas quando ocorrem no escuro (Alfenas et al., 2009, Ruiz et al., 1989). Assim, a disseminação da doença é favorecida pela expansão das áreas de plantios para regiões quentes e úmidas, bem como o uso de espécies suscetíveis em sucessivos plantios (Junghans, 2000).

Quanto aos métodos de controle, o método mais adequado é o controle genético por meio do uso de genótipos resistentes. É importante destacar que existe uma alta variabilidade intra e interespecífica em relação a resistência; dentro de uma única espécie pode haver genótipos resistentes e suscetíveis (De Carvalho et al., 1998; Alfenas et al. 2009). O controle químico é executado apenas em viveiros e em plantios de alto valor comercial (Auer et al., 2016). Os produtos químicos registrados pertencem aos grupos químicos das estrobilurinas (trifloxistrobina e azoxistrobina) e triazóis (tebuconazol e ciproconazol) (AGROFIT, 2017).

2.2.2. Ciclo de vida

As ferrugens podem apresentar um ciclo de vida composto por cinco etapas (macrocíclicas) ou por um ciclo simplificado (microcíclicas). Este ciclo pode depender de um único hospedeiro (ferrugens autoécias) ou se completar através de dois hospedeiros distintos (ferrugens heteroécias). As ferrugens macrocíclicas completas apresentam cinco estruturas esporogênicas e esporos distintos, sendo eles: espermagônio/espermácias, écio/eciósforo, urédia/uredósporos, télio/teliósporos e basídia/basidiósporos. O ciclo completa-se em dois hospedeiros distintos e distantes filogeneticamente. Os basidiósporos infectam os hospedeiros alternativos, enquanto os eciósporos infectam os hospedeiros que sofrerão os danos da infecção, e o ciclo prossegue nos mesmos até a meiose ocorrer (Figueiredo e Passador, 2008).

O ciclo de vida de *A. psidii* é atípico comparado às outras espécies de ferrugens. *A. psidii* tem sido considerada uma ferrugem autoécia e macrocíclica com ciclo incompleto (Coutinho et al., 1998; Glen et al., 2007), não tendo sido detectado o estágio de espermagônio, nem o hospedeiro alternativo no qual esse estágio deveria ocorrer (Hennen et al., 2005; Morin et al., 2014) (Figura 2). O estágio aecial só foi observado por Figueiredo (2001 apud Glen et al., 2007), sendo os eciósporos indistinguíveis dos uredósporos. Simpson et al. (2006) propõem que ambos os estágios devem ocorrer em um hospedeiro alternativo desconhecido.

Os teliósporos são de ocorrência rara, sendo formados apenas em condições desfavoráveis a doença (Auer et al., 2016). Essas estruturas foram encontradas naturalmente em jambeiro e jabuticabeira (Ferreira, 1983), e em algumas espécies de eucalipto e mirtáceas nativas da Austrália sob condições artificiais (Carnegie e Lidbetter, 2012; Morin et al., 2014). Basidiósporos só foram detectados em jambo (Ferreira, 1983, Figueiredo, 2001 apud Glen et al., 2007; Morin et al., 2014, McTaggart et al., 2017), os quais não foram capazes de infectar os hospedeiros *Agonis flexuosa* e *S. jambos* (Morin et al., 2014).

Recentemente, um genótipo de *A. psidii* da África do Sul foi capaz de causar infecção em jambo a partir dos basidiósporos, fortalecendo a hipótese de que o ciclo possa ser realizado em um único hospedeiro (autoecidade) assim como tem sido observado em outras espécies da família Sphaerophragmiaceae (McTaggart et al., 2017). De qualquer maneira, o que se observa na natureza, em vários isolados de *A. psidii*, é uma alta taxa de reprodução clonal, sendo os mesmos mantidos por reprodução assexuada por meio dos uredósporos (Graça et al., 2013).

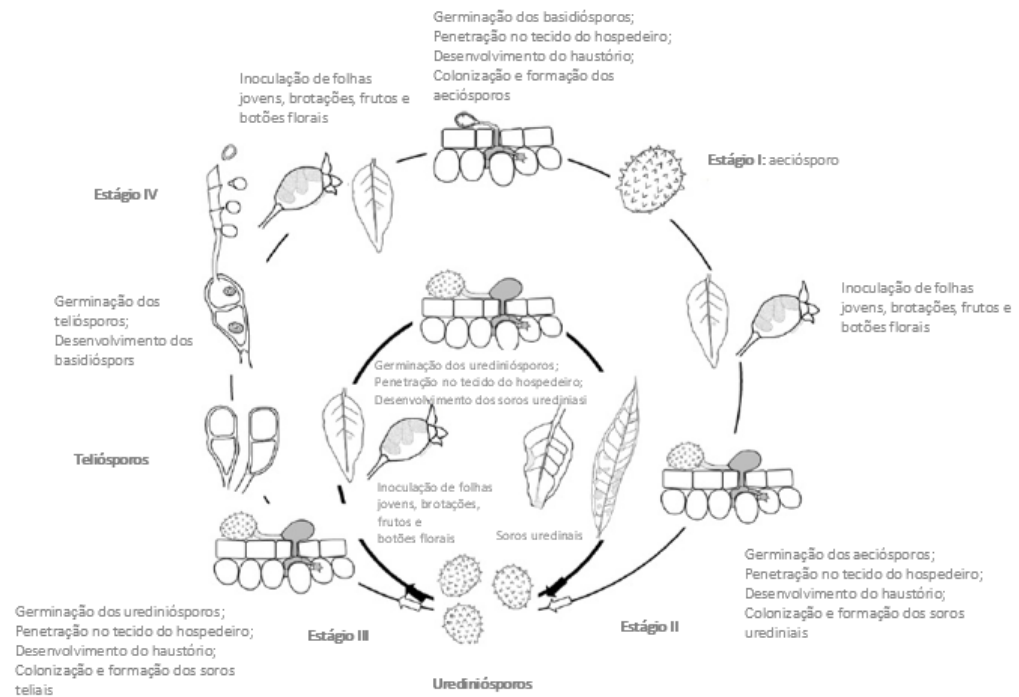


Figura 2. Ciclo de *A. psidii* com ausência do estágio espermagonial (Estágio 0). Figura modificada de Glen et al. (2007).

2.2.3. Estruturas de infecção e desenvolvimento *in vitro*

Durante o processo de infecção ocorre, primeiramente, o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno por meio de sinais químicos e físicos da superfície foliar (Wietholter et al., 2003). Em fungos biotróficos, após o reconhecimento ocorre a germinação com a formação do tubo germinativo e geralmente, a infecção prossegue com a formação do apressório (estrutura responsável pelo rompimento da cutícula). A partir do apressório desenvolvem-se sequencialmente: i) hifa de penetração, a qual estabelece o primeiro contato com o interior da planta, ii) vesícula subestomática, iii) hifa de infecção, iv) célula mãe do haustório e v) haustório, por meio do qual ocorre a captação dos nutrientes e permite ao fungo multiplicar-se dentro do hospedeiro (Ferreira et al., 2006) (Figura 3).

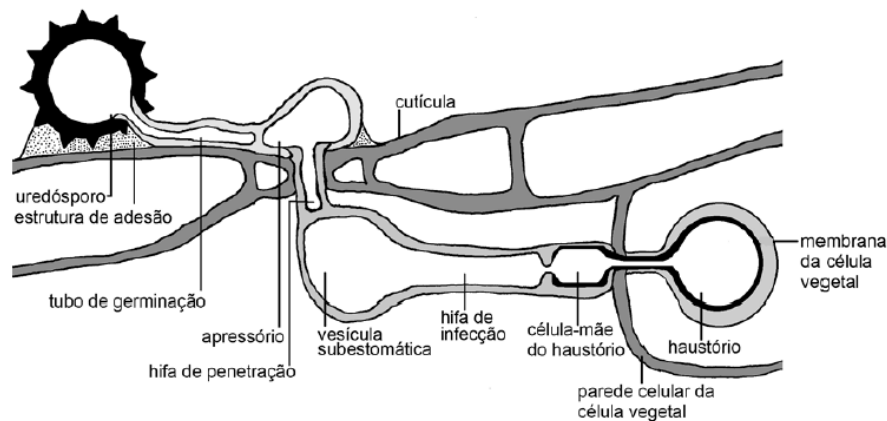


Figura 3. Estruturas de infecção formadas por patógenos biotróficos. Figura retirada de Bini (2016).

No patossistema *A. psidii* – *E. grandis*, a germinação em genótipos suscetíveis foi observada entre 3 a 6 horas após a inoculação (h.a.i) e a formação do apressório entre 6 a 12 h.a.i. No tempo 12 h.a.i houve a penetração por meio da hifa de penetração e entre 18 - 24 h.a.i ocorreu o desenvolvimento do haustório (Xavier et al. 2001; Leite, 2012). Se por um lado, o desenvolvimento das estruturas de infecção de fungos biotróficos ocorre de maneira espontânea *in vivo*, o mesmo não ocorre *in vitro*, pois o processo é bem mais limitado e dispendioso.

Vários estudos realizados com fungos biotróficos buscam germiná-los e diferenciá-los *in vitro* com o uso de membranas ou compostos que simulem a composição da cera cuticular. Link e Voegelé (2008) detectaram o desenvolvimento da célula mãe do haustório de *U. fabae* em membranas de polietileno, enquanto Tessmann e Dianese (2002) identificaram um composto extraído da cera cuticular de folhas de jambeiro que aumenta a germinação de *A. psidii* 88% em relação ao controle. Bini (2016) verificou a germinação, bem como a formação de apressórios e hifas de penetração quando os uredósporos de *A. psidii* são plaqueados em membranas de diálise dispostas em placas de Petri contendo meio ágar-água (8g/L) acrescido de uma fonte lipídica (azeite de oliva – 0,5%). Assim, as membranas funcionam como um estímulo físico para o desenvolvimento do patógeno, enquanto o azeite, (composto por ácidos graxos) mimetiza a composição bioquímica da cera cuticular (Figura 4).

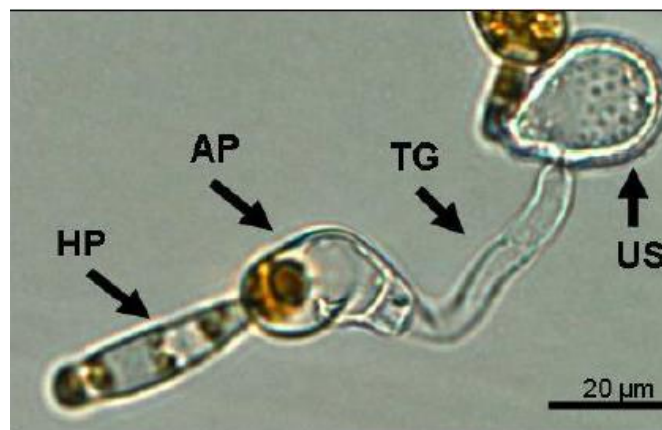


Figura 4. Estruturas de infecção após 24 horas de incubação em membrana de diálise, sobre meio ágar-água acrescido de 0,5% de azeite de oliva. US: uredósporos, TG: tubo germinativo, AP: apressório, HP: hifa de penetração. Figura retirada de Bini (2016).

2.3. Interação planta-patógeno

As plantas não apresentam um sistema imune composto por células móveis, entretanto, tais fatos não as tornam mais vulneráveis aos ataques de patógenos. Elas apresentam um complexo sistema de defesa que inclui mecanismos de resistência pré e pós formados (Pascholati, 2011).

Os mecanismos pré-formados são inatos, ou seja, presentes nas plantas independente do contato com o patógeno. Esses mecanismos impedem, principalmente, a germinação e penetração do patógeno e podem ser divididos em barreiras físicas/estruturais e bioquímicas. Entre as barreiras físicas podem-se citar os filamentos de actina do citoesqueleto, estômatos, tricomas e cutícula, enquanto as barreiras bioquímicas envolvem a presença de metabólitos secundários, como alcaloides, terpenoides, fenóis e glicosídeos (Pascholati, 2011).

Os mecanismos de defesa pós formados, como o próprio nome diz, é ativado após o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, e impede a penetração e colonização no interior da planta. Esses mecanismos incluem as aposições na parede celular e nos vasos (papilas, lignificação e tiloses) e camadas de abscisão e cortiça. Entre os mecanismos bioquímicos compreendem-se as reações de hipersensibilidade, indução de espécies reativas de oxigênio, produção de fitoalexinas e ativação de genes de defesa (Pascholati, 2011).

O reconhecimento do patógeno ou potencial patógeno pelo hospedeiro ocorre por meio de padrões moleculares liberados pelos mesmos, que são moléculas essenciais para adaptação do microrganismo, tais como xilanas e oligossacarídeos (glucanas e quitina) Quando esses padrões moleculares estão relacionados a um microrganismo não necessariamente patogênico eles são denominados de MAMPs (*Microbe Associated Molecular Patterns*), em contrapartida, quando os padrões estão especificamente associados a patógenos eles são chamados de PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) (Medzhitov e Janeway, 1997; Win et al., 2012; Dalio et al., 2014). O reconhecimento pode ainda ocorrer por meio dos DAMPs (*Damaged Associated Molecular Patterns*) que são moléculas liberadas pelo hospedeiro em resposta ao ataque do patógeno, como por exemplo, monômeros de pectina gerados pela quebra da parede celular (Ma et al., 2012).

O reconhecimento desses padrões ocorre por meio de receptores de membrana do tipo PRRs (*PAMP-recognition receptor*) que geralmente possuem repetições ricas em leucina no domínio extracelular (LRR) (Beck et al., 2012) e ativam a primeira linha de defesa das plantas, denominada PTI (*Pamp-Triggered Immunity*) (Hogenhout et al., 2009) (Figura 5). Essa resposta inicia-se pela ligação entre o domínio extracelular do receptor com a molécula ligante (PAMP), gerando uma mudança conformacional na estrutura do receptor e ativando uma cascata de sinalização citoplasmática que envolve o influxo de Ca^{2+} e a modificação do pH. Os eventos subsequentes envolvem o efluxo de ânions, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a expressão de genes envolvidos com a biossíntese de peptídeos e compostos antimicrobianos que são mediados e co-regulados por proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) e MAP quinases, respectivamente (Dalio et al., 2014). Além disso, outras respostas que podem ser ativadas são a produção de etileno, fechamento dos estômatos e indução dos mecanismos pós-formados estruturais (Zipfel e Robatzek, 2010).

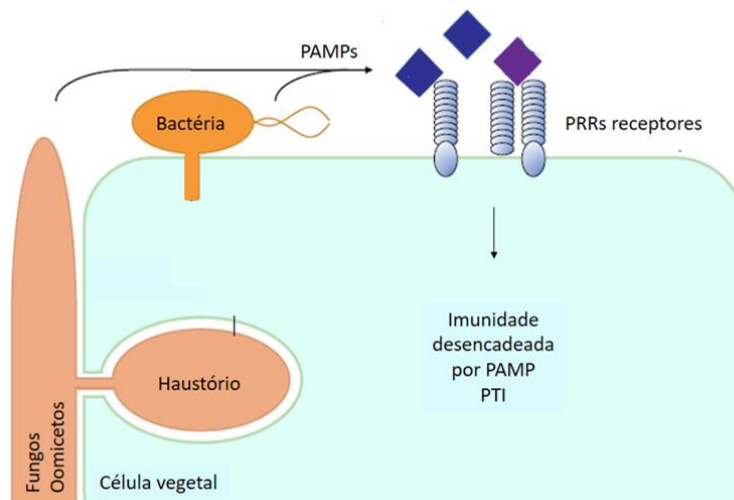


Figura 5. O reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) pelos receptores de membrana PRRs ativam a primeira linha de defesa denominada de PTI. Figura modificada de Win et al. (2012).

Para subverter esse sistema de defesa, o patógeno deve impedir esse reconhecimento, o que pode ser alcançado pela liberação de moléculas específicas, denominadas efetoras, que são capazes de burlar o sistema de defesa, resultando em suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS - *Effector-Triggered Susceptibility*) (Birch et al., 2008) (Figura 6a). Entretanto, as plantas, ao longo da evolução, desenvolveram mecanismos para reconhecer essas moléculas. Esse reconhecimento é mediado por proteínas R e ativam a segunda linha de defesa, conhecida como ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Howden e Huitema, 2012; Boller e He, 2009) (Figura 5b).

Os efetores apoplásticos são geralmente reconhecidos pelos mesmos receptores PRRs que identificam os PAMPs, ao passo que os efetores citoplasmáticos são reconhecidos por proteínas R intracelulares NB-LRR (*Nucleotide Binding-leucin rich repeat*), também denominados de receptores, que apresentam domínio central de ligação a nucleotídeo (NB) e outro rico em leucina (LRR) (Win et al., 2012). Esse reconhecimento pode ser dito direto, de acordo com a teoria gene-a-gene, quando ocorre a interação entre o efector e o receptor/proteína R (Flor, 1971; Boller e Felix, 2009; Obwald et al., 2014). O reconhecimento indireto, também conhecido como modelo guarda, ocorre quando uma proteína R monitora um alvo do efector e reconhece a modificação sofrida no alvo do efector ou o complexo efector-alvo do efector (Jones e Takemoto, 2004; Jones e Dangl, 2006; Win et al., 2012) (Figura 6b).

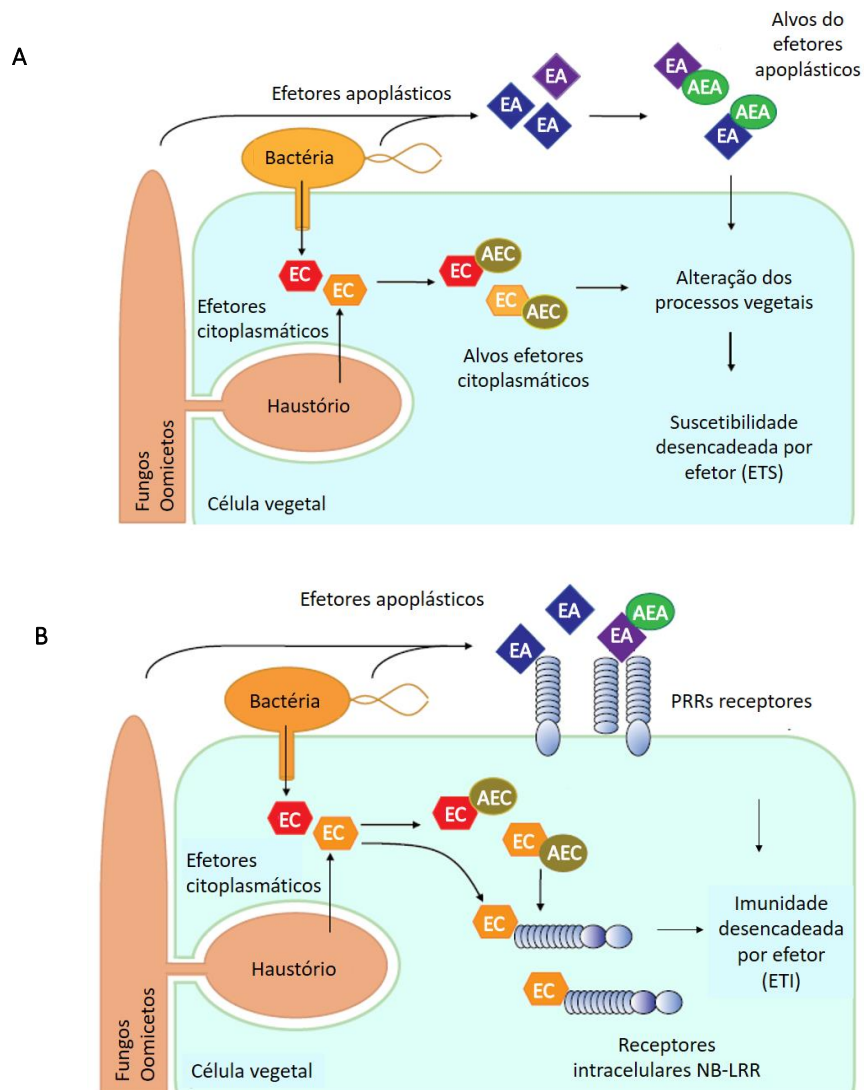


Figura 6. Esquema exemplificando a interação entre efetores apoplásticos e citoplasmáticos com seus respectivos alvos, desencadeando a suscetibilidade dirigida por efetores (ETS) (a) e o reconhecimento dos mesmos por receptores do tipo PRRs e NB-LRRs, respectivamente, conduzindo a imunidade dirigida por efetores (ETI) (b). Observa-se que tal reconhecimento pode ser direto por meio do reconhecimento do efetores (teoria gene-a-gene) ou indireto com o reconhecimento do complexo efetores-alvo (modelo guarda) (b). EA: efetores apoplásticos; AEA: alvo do efetores apoplástico; CE: efetores citoplasmáticos; AEC: alvo do efetores citoplasmático. Figura modificada de Win et al. (2012).

A ETI ativa vias de sinalizações semelhantes a PTI, dependente de MAP quinases e com amplificação dos sinais por meio de hormônios como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) resultando na ativação dos mecanismos pós formados, principalmente, nos fatores de transcrição dos genes de defesa, que conduzem à resistência sistêmica adquirida ou induzida (Tsuda e Katagiri, 2010).

Enquanto a PTI permite que as plantas respondam de maneira rápida e eficientemente a uma ampla gama de patógenos (Roux et al., 2014), a ETI é considerada uma resposta imune mais prolongada pois é composta por uma rede de setores interligados, assim quando uma via de sinalização mediada por determinado hormônio é comprometida, outra via pode ser ativada (Tsuda e Katagiri, 2010).

Esse modelo de interação é conhecido como *zigue-zague* (Jones e Dangl, 2006) pois enquanto novos efetores emergem para impedir o reconhecimento e manipular os sistemas de defesa das plantas, novas

proteínas R são selecionadas, definindo uma constante “corrida armamentista” e uma contínua coevolução na interação planta-patógeno (Coll et al., 2011) (Figura 7).

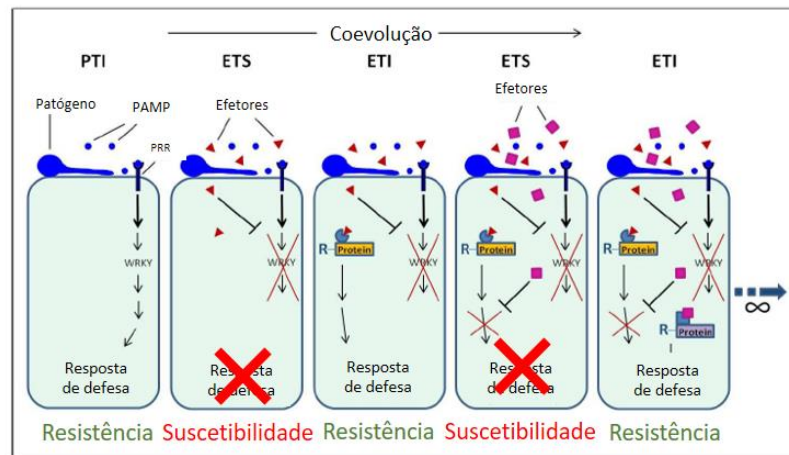


Figura 7. Esquema do modelo zigue-zague de interação planta-patógeno. Figura modificada de Dalio et al. (2014).

2.3.1. Efetores: definição, importância e métodos de estudo

A origem do termo efetor está vinculada à contradição estabelecida no termo avirulência. Os fatores de avirulência foram assim denominados, após terem sido detectados induzindo reações de hipersensibilidade, entretanto, a dualidade encontra-se, no fato, de que muitos desses fatores também contribuem para virulência em relações compatíveis ou de suscetibilidade. Dessa forma, o termo avirulência tem sido recentemente substituído pelo termo efetor (Hogenhout et al., 2009; Dalio et al., 2014).

A definição de efetores mais utilizada pela comunidade científica e adotada nesse estudo é a proposta por Kamoun (2006), na qual efetores são definidos como “moléculas secretadas capazes de alterar a estrutura e função das células do hospedeiro, podendo suprimir a resposta de defesa do hospedeiro, facilitando a infecção e colonização, ou ativar os mecanismos de defesa”. Tem se discutido que a maioria das proteínas liberadas durante a infecção, e, principalmente, as proteínas liberadas pelos haustórios de fungos biotróficos são fortes candidatos a efetores (Ellis et al., 2009; Jiang, 2011). Uma definição mais ampla foi proposta recentemente por Dalio (2014): “efetores são moléculas liberadas ou associadas a um organismo que modificam a fisiologia de outro organismo”. Esta definição fundamenta-se no fato de que nem todos os efetores são secretados e nem todo organismo alvo é um hospedeiro.

Os efetores podem ser classificados em apoplásticos ou citoplasmáticos. Os efetores apoplásticos restringem-se ao espaço extracelular atuando nos espaços intercelulares (Win, 2012), são ricos em cisteína e, geralmente, espécie-específicos (De Jonge et al., 2011). Os efetores citoplasmáticos agem no interior das células do hospedeiro (Win, 2012), sendo transportados via haustórios em fungos biotróficos (Panstruga e Dodds, 2009). No citoplasma podem atuar em diversos compartimentos subcelulares (Win, 2012), sendo essa localização fundamental para determinação da função do efetor (Jiang, 2011).

Entre as diferentes funções dos efetores pode-se citar: inibição de enzimas (hidrolases) no apoplasto, inibição de ativação de PRRs, inibição de cascatas de sinalização mediadas por MAP-quinases, modificação do transcriptoma relacionado às respostas de defesa, reprogramação transcricional, degradação

de componentes/proteínas relacionadas à defesa e interferência na secreção de proteínas e tráfego vesicular (Gohre e Robatzek, 2008).

A estrutura básica de um efector secretado é a presença do sinal de secreção ou sinal de exportação celular no N-terminal e o domínio C-terminal, também denominado de porção funcional. O sinal de exportação (sinal de secreção N-terminal) pode ser composto por várias partes, tais como, um peptídeo sinal que direciona a proteína para via secretória e um sinal de direcionamento para uma organela ou compartimento subcelular do hospedeiro (*host-organelle targeting*). A maioria dos efetores não possui um domínio significativo N-terminal, entretanto, alguns efetores citoplasmáticos podem conter um motivo adicional no N-terminal, tais como RxLR de Oomicetos, os quais medeiam a translocação para o interior da célula (Ellis et al., 2009) e [YWF]xC descritos em *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Melampsora larici-populina* e *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, (Godfrey et al., 2010). A porção funcional (C-terminal) é heterogênea e desempenha diversos papéis na modulação do hospedeiro (Jiang, 2011) (Figura 8).

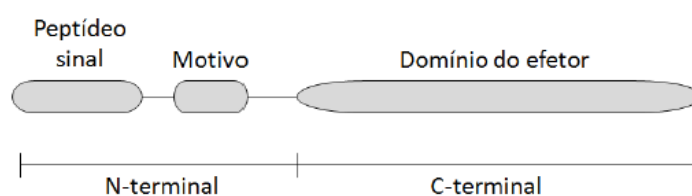


Figura 8. Estrutura típica de um efector citoplasmático. No N-terminal há a presença do sinal de exportação, o qual apresenta o peptídeo sinal que conduz a secreção do efector e pode conter ainda sinais de direcionamento para os compartimentos celulares do hospedeiro. Motivos adicionais podem ser encontrados no N-terminal, como RxLR e [YWF]xC. O domínio C-terminal consiste na porção funcional do efector e apresenta grande heterogeneidade. Figura retirada de Dalio et al. (2014).

As principais características dos efetores são seu pequeno tamanho, sinal de secreção N terminal e presença de resíduos de cisteína (Ellis et al., 2009). O peptídeo sinal N-terminal é composto por aproximadamente 20 aminoácidos, podendo variar de 16 - 30, e consiste na sequência que direciona a proteína para o retículo endoplasmático de onde ela seguirá pela via secretória. Essas sequências possuem alguns aminoácidos carregados positivamente e 6 - 12 resíduos hidrofóbicos, sendo removidas da proteína madura pela peptidase sinal (Lodish et al., 2012). O pequeno tamanho e os resíduos de cisteína estão relacionados à secreção. Ao passo que proteínas muito grandes são dificilmente secretadas, os resíduos de cisteína conferem estabilidade no meio extracelular, por intermédio da formação de pontes dissulfeto (Povolotskaya e Kondrashov, 2010).

Os efetores são poucos conservados quanto a estrutura primária e, conseqüentemente, possuem baixa similaridade com sequências de outras proteínas depositadas nos bancos de dados, o que torna um problema, e ao mesmo tempo, um critério de identificação (Ellis et al., 2009). Essa baixa conservação está relacionada com as regiões em que estes genes estão inseridos no genoma, geralmente regiões repetitivas ou suscetíveis a eventos de transposição (Jiang, 2011). Tal mecanismo faz com que os genes efetores estejam sujeitos a uma elevada taxa de evolução, a qual é fundamental para adaptação do patógeno frente a evolução de mecanismos de defesa e novos hospedeiros, garantindo uma contínua coevolução na interação planta-patógeno.

O avanço das tecnologias de sequenciamento aliada ao desenvolvimento da bioinformática tem contribuído para predição *in silico* de candidatos a efetores. *Pipelines* específicas têm sido propostas para

predição, por meio do uso de programas como SignalP, TMHMM, GPISom e Target P, os quais detectam, respectivamente, o peptídeo sinal, motivos transmembranas, sinais de ancoragens e sinais de direcionamento mitocondrial. A predição é realizada através de proteomas preditos, que podem ser obtidos do genoma sequenciado (Cantu et al., 2011; Duplessis et al., 2011; Saunders et al., 2012) ou de transcriptomas que analisam os genes que estão sendo expressos em determinada condição, tais como no desenvolvimento das estruturas de infecção, *in vivo* ou *in vitro* (Catanzariti et al., 2006; Kleemann et al., 2008; Cantu et al., 2013, De Carvalho et al., 2017). Estudos mais antigos utilizavam a técnica de Armadilha de Sinal de Secreção (YST) para prever e comprovar a atividade secretora de proteínas expressas em condições específicas (Lee et al., 2006; Link e Voegelé, 2008; Da Silva, 2010).

Após a predição *in silico* de candidatos a efetores, principalmente de predições que utilizam dados do genoma, há a necessidade de validá-los por meio de técnicas como Reação da Polimerase em Cadeia Quantitativa (qPCR) para verificar se tais genes são expressos, como realizado por Duplessis et al., 2011, Wang et al., 2011 e Cantu et al., 2013. Posteriormente, é realizada a caracterização funcional, sendo o método mais utilizado para este fim a expressão transiente via *Agrobacterium* em folhas de *Nicotiana benthamiana* (Torto et al., 2003; Vleeshouwers et al., 2008; Oh et al., 2009; Wang et al., 2011). A localização subcelular pode ser determinada por meio da técnica de microscopia confocal de genes candidatos marcados com a proteína verde fluorescente (GFP) (Doehlemann et al., 2009; Schornack et al., 2010; Caillaud et al., 2012). Além disso, a translocação dos efetores e a interação destes com moléculas/proteínas da planta têm sido detectadas por imunolocalização e coimunoprecipitação (Kemen et al., 2005; Win et al., 2011).

Os efetores melhor caracterizados são as proteínas de avirulência de diferentes patógenos. As proteínas Avr2 e Avr4 de *Cladosporium fulvum* são efetores apoplásticos que atuam inibindo proteases e quitinases no apoplasto de tomate, respectivamente (Shabab et al., 2008; Van Den Burg et al., 2006). A proteína Avr3 de *Fusarium oxysporum*, também conhecida como Six3, é essencial para virulência do patógeno na ausência da proteína de resistência correspondente I-3 (Rep et al., 2004). Formas variantes de Avr1b de *Phytophthora sojae* e Avr3a de *P. infestans* são capazes de suprimir a morte celular na planta (Dou et al., 2008; Bos et al., 2006), enquanto Avr567 de *M. lini* induz reações de hipersensibilidade, quando ocorre o reconhecimento pela proteína R L5, L6 ou L7 (Wang et al., 2007).

Alguns estudos realizaram a predição de candidatos a efetores com espécies de ferrugens. Catanzariti et al. (2006) identificaram 20 proteínas expressas secretadas pelo haustório (HESPs) em *M. lini*. Cantu et al. (2011) detectaram 1088 seqüências que codificam para potenciais proteínas efetoras no secretoma de *P. striiformis* f. sp. *tritici*. Duplessis et al. (2011) verificaram que o secretoma de *M. larici-populina* é composto por 1184 SSPs (*small secreted protein*) e o de *P. graminis* por 1106, sendo que 40% dos genes SSP de *M. populina* e 45% dos genes de *P. graminis* são super expressos *in planta*, evidenciando seu possível papel como efetor.

Os estudos dos efetores têm ganhado destaque devido sua aplicabilidade no controle de doenças em plantas. Sabe-se que cada efetor contribui de forma parcial para a virulência final e muitos podem apresentar redundância funcional, alterando a mesma via no hospedeiro, assim, a perda de alguns genes efetores podem não contribuir, de forma significativa, para perda da virulência do patógeno. Apesar disso, existem alguns efetores denominados de “fundamentais”, os quais desempenham contribuição relevante para a virulência e são distribuídos amplamente na população de um patógeno (Dangl et al., 2013). Estes efetores podem ser empregados no controle de doenças por meio da detecção dos genes R correspondentes, os quais

podem ser selecionados e/ou transferidos aos hospedeiros, a fim de obter plantas com resistência a uma ampla variedade de estirpes do patógeno, conferindo uma resistência mais durável (Dalió et al., 2014).

Outra estratégia que pode ser utilizada para controle de doenças é o uso de receptores do sistema imune, tais como receptores PRRs e NLRs (*NOD-like receptors* ou *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*), sendo que os NLRs reconhecem PAMPs ou MAMPs no ambiente intracelular. A transferência de um PRRs para uma espécie receptora que não o possua amplia o repertório de PRRs da espécie e pode conferir resistência a uma ampla gama de patógenos. Por outro lado, os receptores NLRs são transferidos por meio da implantação simultânea de vários genes NLRs. Essa técnica é conhecida como empilhamento e a resistência é mais durável, já que para ser vencida mutações em vários genes efetores serão necessárias (Dangl et al., 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

2.4. Amostras biológicas

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” da ESALQ-USP. Foi utilizada a linhagem monopustular MF-1 de *A. psidii*, proveniente de uma população de campo do município de Itapetininga – SP, a qual foi fornecida pela Cia Suzano de Papel e Celulose e isolada por Leite (2012). Uredósporos isolados de *Syzygium jambos* (GM-J1) fornecidos pela EMBRAPA Meio Ambiente (Jaguariúna – SP) também foram utilizados no estudo.

2.5. Predição *in silico* de candidatos a efetores

Para predição dos genes candidatos a efetores foi utilizado o genoma parcial (*draft*) da linhagem monopustular MF-1 de *A. psidii*, o qual foi previamente obtido pelo sequenciamento na plataforma 454 Life Science (Roche) (Quecine et al., 2012). Por meio da montagem no programa Newbler obteve-se 167.528 *contigs*, dos quais 102.354 não foram anotados, 21.524 anotados como proteínas hipotéticas e 43.650 foram anotados com funções específicas pelo programa de anotação automática Blast2Go (Conesa et al., 2005). A primeira etapa da análise consistiu na busca de candidatos a efetores nos *contigs* anotados por meio de palavras-chaves relacionadas a efetores (*effector like*, *supressor*, *induce*, *necrosis*). Posteriormente, todas as sequências (anotadas, não anotadas e hipotéticas) foram analisadas por meio de uma *pipeline* específica (Figura 9).

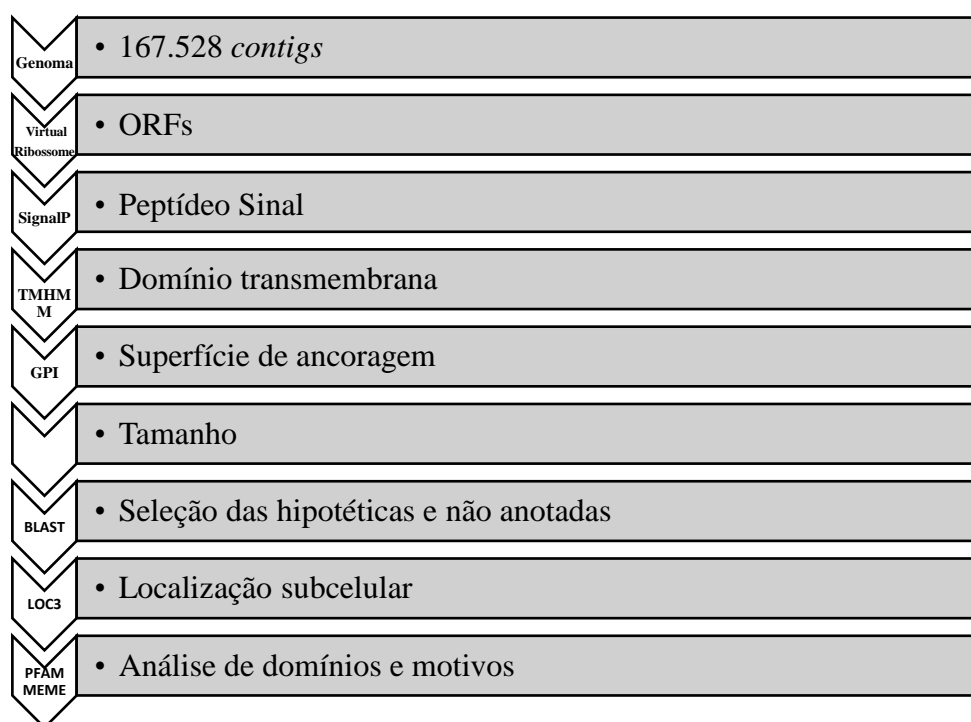


Figura 9. Pipeline utilizada na predição *in silico* dos candidatos a efetores de *A. psidii*. As setas a esquerda referem-se aos programas utilizados e os retângulos a direita as características preditas e analisadas.

A primeira etapa da *pipeline* consistiu na busca pelas ORFs (*Open Reading Frame*) dos 167.358 *contigs* no programa Virtual Ribosome (Wernersson, 2006). Os parâmetros selecionados para a predição dessas ORFs foram: análise em todos os frames, código genético padrão e códon inicial restrito (metionina). De acordo com esses parâmetros foi selecionada somente uma ORF para cada sequência, sendo esta predita como a mais provável e com maior número de aminoácidos.

As sequências das ORFs (em aminoácidos) foram utilizadas para busca do peptídeo sinal no software *SignalP* V3.0 (Bendtsen et al., 2004). Os algoritmos de análise foram Rede Neural (NN) e Modelo Oculto de Markov (HMM) e o valor de probabilidade da predição foi definido para $sprob > 0,5$ segundo HMM. Posteriormente, as sequências que apresentaram o peptídeo sinal foram triadas no programa TMHMM V2.0 (Krogh et al., 2001) e GPISom (Fankhauser e Maser, 2005) de acordo com os parâmetros padrões, para remover as sequências que apresentavam domínio transmembrana e superfície de ancoragem, respectivamente. Ao término dessas etapas, obteve-se o secretoma predito de *A. psidii* e foram selecionadas as proteínas secretadas com tamanho entre 5-50 KDa (Quilo Dalton). Esse valor foi calculado admitindo-se que cada aminoácido possui o peso médio molecular de 113 Daltons e corresponde a 45-440 resíduos de aminoácidos. A amplitude de tamanho dos efetores é muito variável na literatura, entretanto todos admitem que efetores são proteínas secretadas de pequeno tamanho (Saunders et al., 2012).

Ao final dessa *pipeline* obteve-se o número de candidatos a efetores, sendo que os candidatos das proteínas hipotéticas e não anotadas foram selecionados para análises posteriores. A localização subcelular dos candidatos foi predita por meio do programa LocTree3 (Goldberg et al., 2014) e a presença de domínios e novos motivos foi verificada com auxílio dos softwares PFAM ($e\text{-value} < 0,01$) (Finn et al., 2016) e MEME (Bailey et al., 2009), respectivamente. Foi realizada uma predição adicional com o software *EffectorP* (Sperschneider et al. 2016). Todas as análises foram realizadas utilizando-se os parâmetros padrões dos respectivos programas. Na análise *de novo* de motivos foi selecionado como parâmetro a busca por somente um motivo com tamanho entre 4 - 10 aminoácidos.

2.6. Seleção de candidatos a efetores

Devido ao grande número de candidatos preditos após a seleção por tamanho e com o objetivo de selecionar alguns para análise de expressão, todos os candidatos foram comparados com 10.551 genes diferencialmente expressos por meio de um tBlastn local. Tais dados de RNA-seq foram previamente obtidos da diferenciação *in vitro* das estruturas de infecção do patógeno durante os tempos iniciais de desenvolvimento (0 - 24 horas após inoculação) (Bini, 2016). Dos 10.551 genes diferencialmente expressos, 6.133 apresentavam similaridade com sequências de ferrugens 1.405 com sequências de diversos organismos (incluindo patógenos, plantas e invertebrados) e 3.013 não anotados. Os transcritos foram analisados em duas comparações de intervalo de tempo: 12-0h e 24-12h, e estes 10.551 foram diferencialmente expressos em, pelo menos, um dos intervalos descritos.

Selecionou-se os candidatos que apresentaram similaridade (similaridade $> 40\%$ e $e\text{-value} < 10^{-3}$) com transcritos que foram previamente anotados como efetores ou com transcritos não anotados e hipotéticos que apresentavam peptídeo sinal, ausência de domínio transmembrana e regulação positiva em, pelo menos, um dos tempos analisados (12-0h ou 24-12h). A presença do peptídeo sinal e ausência de

domínio transmembrana nesses transcritos foi verificada por meio da análise dos resultados do *InterproScan* obtidos pelo programa Blast2GO. (Figura 10).

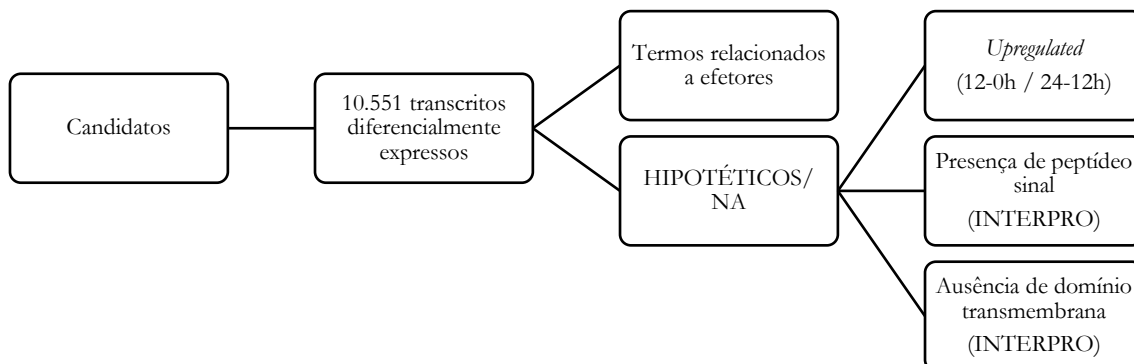


Figura 10. Etapas para seleção dos candidatos a efetores. Foi realizado um *blast* de todos os candidatos contra o conjunto de 10.551 transcritos diferencialmente expressos (Bini, 2016). Selecionou-se apenas os candidatos que apresentaram similaridade com transcritos previamente anotados como efetores e aqueles anotados como hipotéticos ou não anotados que apresentassem regulação positivamente, presença de peptídeo sinal e ausência de domínio transmembrana.

Para análise de expressão foram selecionados quinze candidatos, os quais apresentaram diferentes localizações subcelulares previstas pelo programa LocTree3 (apoplasto, núcleo, mitocôndria e cloroplasto) e ausência de domínios PFAM.

2.6.1. Desenho e validação de *primers*

Para os 15 candidatos selecionados foram desenhados *primers* específicos pelo programa OligoPerfect™ Designer (<http://goo.gl/2nrzy2>). Os parâmetros utilizados foram: tamanho entre 17-23 pb, temperatura de anelamento entre 57-63°C, concentração de CG entre 30-60, tamanho do produto entre 100-300 pb e região de análise correspondente à região da ORF predita. O número de *primers* desenhados para cada candidato variou de 1-3 dependendo da sequência do mesmo (Tabela 1). Para verificar a existência de dímeros foi utilizado o software Oligo Analysis Tool (<http://goo.gl/37JHNg>).

Tabela 1. Sequências de *primers* dos 15 candidatos selecionados para análise de expressão.

<i>Primer</i>	SEQUENCIA 5' – 3'
00372F	T C G C A G A T C G T A G C A T T G A C
00372R	A C G C T A G C G A C C A A A A T G T C
61240F1	C A C A C T A C T T G A A A A A G G C C A C T
61240R1	G G T G C A T G T T G T T G T G T C G T
61240F2	C A C A C T A T T T A A G A A A A A C T A C T
61240R2	G G T G C A T G T T G T G G T G T C A T
15800F1	A A A T T G A C A A G G C T C G G T T G
15800F2	A A A T T A A C A A G G C T C G G T T G
15800R1	T T G G C C A T T G T C A T T G T T T G
60547F1	T A G C G A C T T G T C C A C A A C G A
60547R1	G C T G A G C C T G C T T A T G C T T C
60547F2	T G A A G C A T A A G C A G G C T C A G
60547R2	C T C C C T C C A A G C T T C C T C T T
36972F1	C T C G A G T G T C C A G G T C C A A T
36972R1	T T A G C G C C T A C T C T G G T G C T
36972F2	C T C G A G C G T C C A A G T C C A A T
36972R2	T T A G C G C C T A C T C T G G T G G T
00732F	T A G C G C C T A C T C T G G T G G T T
00732R	G C G G A T T T T G A C G T T T
06376F1	G A G A C G C T C T C A A C A A C T
06376R1	T G G A T G C T G A C T T G A T C C T G
06376F2	A A T A A G C T A C T A A A C A G A T
06376R2	C A T A T G A T A C T T T G A G C G A T C
06376F3	T G A A T T C A T C T G C C T G G T T G
06376R3	T T T C C T G A G C A A A A C A G C A A
22413F	T C A A G A A T C C C A C T T A C C A A C A
22413R	T T T T G T G C C A T G T A T T T G C T G
22739F	A T C A G C G A T A G G G A T G A T G C
22739R	A G G T G C T T T A G T G C C T T C C A
27121F	C G T C G A T A G A G C T G C A A A C A
27121R	G T C C T G G A C T A G G T G G T G G A
27121F2	G C C A T T T C T C T C T G C T C C A C
27121R2	C A T T C C T C G G C T C T T T T G A C
71650F	T T T G A A T G A T T G A C G C G A G A
71650R	T C T A T C C G G T A T C G G T C C T T
127358F	G C C T G A A G T T C C A A G A C C A C
127358R	G T T G T T T G T T G A G C G C A G T C
27148F	C A G C A A C C A A A G G A C G A T T T
27148R	A A G T T T C C A A G A A G G C A C G A
27148F2	C A T C G A T C T G C T T T C C A C A A
27148R2	T G A G C C C A A G A G G C C T A G T A
06850F	A T C T T G C C T G C T T G G A T T T G
06850R	G T A T G A G T G G G T G G T G C T C A
00755F	A C T T T G C C G C T T G C T T A A A A
00755R	G G G A C G T A G T G G G A A A T T G A

Para validação da melhor temperatura de anelamento foi realizada uma PCR nos gradientes de temperatura de 52°, 55°, 58°, 60° e 62°C utilizando como *template* DNA fúngico de MF-1. As reações foram realizadas no volume final de 25 µL contendo Taq DNA Buffer 1X, 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 5 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,5 U de Taq Polimerase e 50 ng de DNA *template*. As amostras foram submetidas a PCR em termociclador *Profex PCR System (Applied Biosystems)* programado para os seguintes ciclos: desnaturação inicial de 94°C por 2', 40 ciclos de amplificação constituído por 30'' a 94°C; 30'' a 52 - 62°C e 30'' a 72°C, e extensão final de 72°C por 10'.

Os *amplicons* foram purificados com o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE) conforme as instruções do fabricante, quantificados em nanodrop2000 (Termo Fisher) e a integridade

verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. As amostras foram enviadas para sequenciamento do tipo Sanger em equipamento ABI3130 DNA *Analysers* (*Applied Biosystems*) no Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia (ESALQ/USP). As sequências geradas foram alinhadas com seus respectivos *contigs* por meio do programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

Para verificar se os *primers* eram adequados para amplificação de amostras de cDNA, foi realizado um pré-teste utilizando cDNA obtidos de RNA de *A. psidii* extraído após 24h de cultivo *in vitro*. Os *primers* que não apresentaram amplificação foram testados com os demais tempos de desenvolvimento *in vitro* do patógeno (6 e 12 h.a.i.).

2.7. Expressão dos efetores

Para validar os resultados da predição *in silico*, oito dos 15 candidatos a efetores selecionados, foram analisados quanto a sua expressão durante o desenvolvimento *in vitro* do patógeno. Foram utilizadas duas populações do patógeno, uma proveniente de eucalipto (MF-1) e outra de jambo (GM-J1). Já é descrito na literatura a especificidade de certos isolados a seus respectivos hospedeiros. Uredósporos de goiaba não infectam eucalipto e vice-versa (Ferreira, 1983) e uredósporos de eucalipto infectam com baixos níveis de incidência jameiro (dados pessoais não publicados). Diante disso, a expressão gênica pode ser modulada diferencialmente de acordo com o hospedeiro.

2.7.1. Bioensaio de desenvolvimento *in vitro*

O bioensaio foi realizado como proposto por Bini (2016), com modificações, no qual os uredósporos foram plaqueados em membranas de diálise dispostas em placas de Petri com meio ágar-água acrescido de azeite de oliva. As membranas funcionam como um estímulo físico para o desenvolvimento do patógeno, enquanto o azeite, composto por ácidos graxos, mimetiza a composição bioquímica da cera cuticular.

Cada repetição biológica foi representada por uma placa de Petri independente, tendo sido realizado quatro repetições biológicas para cada tempo analisado (0, 6, 12 e 24 horas após inoculação), totalizando 16 placas. Em cada placa foi adicionado 20 mL de meio ágar-água (8g/L) acrescido de 0,5% de azeite de oliva, sobre o qual foram colocados três fragmentos de membrana de diálise. Para cada placa, 7 mg de uredósporos foram plaqueados nos três fragmentos de membrana com auxílio de pincel (Figura 11) e as placas foram mantidas na temperatura de 20°C no escuro até os respectivos tempos de amostragem.



Figura 11. Esquema do experimento para germinação e diferenciação *in vitro* das estruturas de infecção de *A. psidii*. O azeite (oliva) simula a composição da cera cuticular, enquanto as membranas funcionam como estímulo físico. Cada placa representa uma repetição biológica. AA= ágar-água.

O experimento foi realizado com uredósporos isolados de eucalipto (MF-1) e de jambo (GM-J1). Os tempos de amostragem foram selecionados de acordo com estudos anteriores que analisaram a dinâmica do desenvolvimento do fungo *in vivo* e *in vitro* (Leite, 2012; Bini, 2016) (Tabela 2). Por se tratar de um fungo biotrófico, a diferenciação de *A. psidii* ocorre até 24 horas após a inoculação em placa, sendo observados indícios de morte celular 48 h.a.i (Bini, 2016). O desenvolvimento das estruturas fúngicas nos respectivos tempos foram verificadas e fotografadas em microscópio com câmera digital acoplada (*Optika Italy*).

Tabela 2. Comparação do desenvolvimento das estruturas de infecção de *A. psidii* em ensaios *in vivo* e *in vitro*.

	Estruturas <i>in vivo</i> (Leite, 2012)	Estruturas <i>in vitro</i> (Bini, 2016)
6 h.a.i	Apressórios	-
12 h.a.i	Vesícula subestomática	Tubos germinativos
24 h.a.i	Célula mãe do haustório	Apressórios e hifa de penetração

2.7.2. RT-qPCR

As amostras foram coletadas nos respectivos tempos e maceradas em nitrogênio líquido. A extração de RNA foi realizada com o *Rneasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) segundo o protocolo do fabricante; a quantificação e integridade do material foram analisadas no equipamento nanodrop2000 (Thermo Scientific) e em gel de agarose 1%.

A fita de cDNA foi sintetizada com o *Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas). As reações foram preparadas com 5 pmol de oligo (DT)₁₈ *primer* (100µM), 1 µg de RNA e água livre de RNase para totalizar um volume de 12 µL. As reações foram incubadas a 65°C por cinco minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de *Reaction Buffer* (5X), 20 U de *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/µL), 1 mM de dNTP mix (10mM) e 200 U de *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* (200 U/µL), totalizando um volume final de 20 µL. As amostras foram submetidas a PCR em termociclador *Profex PCR System* (*Applied Biosystems*) programado para os seguintes ciclos: 25°C por 5', 49°C por 60' e 72°C por 5'.

Para determinar a melhor diluição de cDNA a ser utilizada nos ensaios de qPCR foi realizado um pré-teste utilizando-se duas diluições (1:10 e 1:20) e três pares de *primers*, um normalizador - Beta-tub (Bini,

2016) e dois candidatos a efetores (15800 e 36972). Com base na pequena diferença de CTs (*threshold cycle*) entre ambas as diluições, a diluição 1:20 foi selecionada para ser utilizada nas reações (Figura 12).

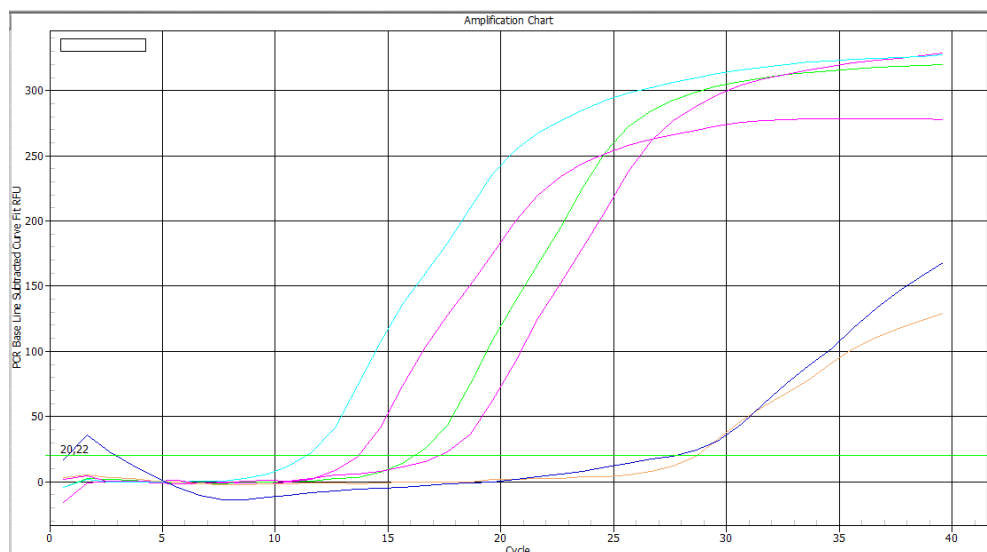


Figura 12. Teste de amplificação para determinar a concentração do RNA a ser utilizada nos qPCRs subsequentes. Da esquerda para direita: azul-claro: diluição 1:10 cDNA com *primer* candidato15800 (Ct=10,63), pink: diluição 1:20 cDNA com *primer* candidato15800 (Ct= 12,77), verde: diluição 1:10 cDNA com *primer* endógeno Beta-tub (Ct=15,35), rosa: diluição 1:20 cDNA com *primer* endógeno Beta-tub (Ct=17,74), azul: diluição 1:10 cDNA com *primer* candidato 36972 (Ct=27,67), amarelo: diluição 1:20 cDNA com *primer* candidato 36972 (Ct=29,67).

As reações de qPCR foram preparadas em um volume final de 12,5 μ L contendo 6,25 μ L de *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG*, 10 pmol de cada par de *primer*, 2,5 μ L cDNA (1:20) e 1,75 μ L água ultrapura. As amostras foram amplificadas em aparelho *iCycler IQ[®] Real-Time PCR Detection System (Bio Rad)* programado para as seguintes condições: 95°C por 15' (1X); 95°C por 20", 58°C por 30", 72°C por 30" (45X); e 71 ciclos de 60° - 95°C, com aumento progressivo de 0,5°C por ciclo (*melting*).

As 16 amostras (quatro biológicas dos quatro tempos) foram feitas em duplicata e dez *primers* foram analisados, sendo oito candidatos a efetores e dois genes normalizadores endógenos (beta-tubulina e fator de alongação) (Bini, 2016). As eficiências das reações foram analisadas através do programa *LinRegPCR 11.0* e os valores da expressão relativa foram calculados pelo método Pfaffl com o auxílio do *software REST (Relative Expression Software Tool)* (Pfaffl e Horgan, 2001). A normalização dos genes de referência foi calculada com base na média geométrica dos valores de $E(\text{ref})^{\Delta\text{CT}}$ e a expressão diferencial foi calculada pelo *Pairwise Fixed reallocation Randomisation Test* com valor de *bootstrap*=1000.

3. RESULTADOS

3.1. Predição *in silico* de candidatos a efetores

Do *draft* do genoma obteve-se 167.328 *contigs*, dos quais 102.354 não foram anotados, 21.524 foram classificados como proteínas hipotéticas e 43.647 são proteínas anotadas com funções específicas pelo programa Blast2Go (Conesa et al., 2005). A primeira etapa da análise consistiu na busca de candidatos a efetores nas sequências anotadas por meio de palavras chaves relacionadas a efetores (*effector like*, *suppressor*, *induce*, *necrosis*). Por essa abordagem não foi encontrado nenhum candidato a efector.

Com base nos resultados obtidos, utilizou-se uma *pipeline* específica para predição. Por meio da análise do *SignalP*, *TMHMM* e *GPISom*, das 167.328 sequências analisadas, 5.546 foram preditas como proteínas secretadas, compondo o secretoma de *A. psidii*. Após a seleção por tamanho (5-50 KDa) obteve-se o valor de 3.907 candidatos a efetores, dos quais 2.886 são proteínas classificadas como não-anotadas ou hipotéticas e 1.021 são proteínas com funções específicas (Tabela 3).

De forma mais detalhada, das 43.647 sequências anotadas, 2.442 apresentaram peptídeo sinal, das quais 1.550 não apresentaram hélice transmembrana e destas, 1.245 não apresentaram superfície de ancoragem. Por meio da seleção por tamanho, 1.021 *contigs* foram preditos como candidatos a efetores (Tabela 3). Destes candidatos, 729 estão anotados com termos relacionados a elementos transponíveis (*transposons* ou *retrotransposons*) e 292 apresentam diferentes classificações proteicas. Algumas classificações proteicas já têm sido descritas para candidatos a efetores, incluindo enzimas que possuem motivos relacionados à atividade enzimática (quinases, hidrolases, ubiquitina ligase, acetiltransferase) e inibitória (inibidor de quinases), além de proteínas relacionadas à patogenicidade (GTPases) (Tabela 4). Como tais funções não são exclusivas de efetores, uma investigação mais detalhada deverá ser realizada, futuramente, para confirmar tal funcionalidade. Assim, devido as diferentes anotações apresentadas, essas 1.021 sequências não foram selecionadas *a priori* para análises posteriores (predição de localização e motivos e seleção para análise de expressão).

Quanto a análise das sequências não anotadas ou anotadas como proteínas hipotéticas, das 123.878 sequências, 8.450 apresentaram o peptídeo sinal, das quais 5.114 não apresentaram domínio transmembrana e destas, 4.301 não apresentaram superfície de ancoragem. Pela seleção por tamanho obteve-se o valor final de 2.886 candidatos a efetores (Tabela 3), dos quais 419 são anotados como hipotéticos e 2.467 não anotados. Dos 419 candidatos hipotéticos, 83,1% apresentam similaridade com sequências hipotéticas de *P. graminis*, 6,9% com *Melampsora larici-populina*, 6,7% com outros fungos e 3,3% com outros organismos.

Tabela 3. Número de sequências preditas de acordo com cada parâmetro analisado pela *pipeline*.

Parâmetros de predição	Nº DE SEQUÊNCIAS		
	NA/HIP	ANOTADAS	TOTAL
Presença de peptídeo sinal	8.450	2.442	10.892
Ausência de domínio transmembrana	5.114	1550	6.664
Ausência de superfície de ancoragem	4.301	1.245	5.546
Tamanho entre 45-440 aa	2.886	1.021	3.907

Nota: NA= não anotada e HIP= hipotética.

Tabela 4. Proteínas com atividade enzimática, inibidora ou relacionada à patogenicidade das 292 proteínas anotadas descritas como candidatas a efetores.

Anotação	Número de sequências
Serina / serina protease quinase	4
Hidrolase	19
Ubiquitina ligase	1
Acetiltransferase	2
Inibidor de quinase	1
Isomerase	2
GTPase	1
GTP- <i>binding</i>	1

Por meio da predição da localização subcelular realizada no programa LocTree3, 2.519 candidatos foram preditos como secretados, ou seja, que atuam no apoplasto, 202 atuam nos cloroplastos, 119 no núcleo, 23 no citoplasma, 21 nas mitocôndrias e 2 na membrana plasmática (Tabela 5).

Tabela 5. Predição da localização subcelular dos 2.886 candidatos por meio do programa LocTree3 (Goldberg et al., 2014).

Localização subcelular	Número de candidatos
Apoplasto / secretado	2.519
Citoplasma	23
Cloroplasto	202
Membrana plasmática	2
Mitocôndria	21
Núcleo	119

Nove domínios PFAM foram encontrados em 13 candidatos ($e\text{-value} < 10^{-5}$) (Tabela 6), sendo que cinco deles estão relacionados com proteínas que podem ser encontradas em elementos transponíveis, como *gag*, *pol*, RNAse H (PF13358.5, PF05699.13, PF00075.23, PF08284.10, PF00098.22, PF12907.6).

Tabela 6. Domínios PFAM detectados em 13 dos 2886 candidatos preditos.

NºPFAM	ID	Descrição	Nº DE SEQUÊNCIAS	<i>P-value</i>
PF13358.5	DDE_3	<i>DDE superfamily endonuclease</i>	1	1.3e-13
PF05699.13	Dimer_Tnp_hAT	<i>hAT family C-terminal dimerization region</i>	3	6.8e-07 5.0e-05 4.8e-09
PF08022.11	FAD_binding_8	<i>FAD-binding domain</i>	2	1.8e-06 9.9e-10
F14222.5	MOR2-PAG1_N	<i>Cell morphogenesis N-terminal</i>	1	7.2e-68
PF08030.11	NAD_binding_6		1	2.5e-06
PF00075.23	RNase_H	<i>RNase H</i>	1	5.1e-06
PF08284.10	RVP_2	<i>Retroviral aspartyl protease</i>	1	9.6e-08
PF00098.22	zf-CCHC	<i>Zinc knuckle</i>	3	3.7e-05 2.6e-05 3.2e-06
PF12907.6	zf-met2	<i>Zinc-binding</i>	1	6.7e-11

A análise *de novo* realizada no MEME revelou a presença de quatro novos motivos, os quais foram encontrados em 164 candidatos. O motivo mais frequente foi QNQAVR, presente em 108 candidatos, dos quais 85% apresentaram o primeiro aminoácido do motivo nas posições 25 e 29. O motivo KTAQMWFQNH foi encontrado em 12 candidatos, TVSVQHSTRH em 24 e IFCDISGYNA em 20. As posições mais frequentes do primeiro aminoácido foram: 46 para KTAQMWFQNH (75%), 17 para TVSVQHSTRH (87,5%) e extremamente variável para IFCDISGYNA (Tabela 7).

Tabela 7. Análise *de novo* de motivos realizada no MEME (Bailey et al., 2009). Número de sítios refere-se ao número de candidatos que apresentaram o respectivo motivo.

Motivos	<i>e-value</i>	Posição 1º aa	Nº de sítios
QNQAVR	1.4e ⁻¹⁶⁸ - 2,2 e ⁻²⁰⁷	25-44	108
KTAQMWFQNH	3.1e-066	46-57	12
TVSVQHSTRH	1.4e-127	17-33	24
IFCDISGYNA	4.9e-054	15-109	20

Nota: aa refere-se a resíduos de aminoácidos.

3.2. Seleção dos candidatos

Para seleção dos candidatos para análise de expressão foi realizado um tBlastn local dos 2.886 candidatos contra um banco de dados de 10.551 transcritos diferencialmente expressos ao longo do desenvolvimento *in vitro* do patógeno nas primeiras 24 horas após inoculação (Bini, 2016). No total, 1.426 sequências foram alinhadas com similaridade > 41%, sendo que 859 alinharam com sequências de transcritos não anotados e 535 com transcritos anotados (214 com anotação relacionada a elementos de transposição e 246 hipotéticos).

Para refinar os resultados, foi realizada uma mineração nos transcritos (como descrito no item 3.3). Inicialmente, buscou-se por palavras-chave relacionadas a efetores nos transcritos anotados, tendo sido encontrado 14 sequências com este critério, entretanto apenas uma delas (DN15565 – *effector candidate*) apresentou similaridade com um dos candidatos. Posteriormente, foram selecionados todos transcritos anotados como hipotéticos ou não anotados que eram regulados positivamente, apresentavam peptídeo sinal e ausência de sinal transmembrana. Por essa abordagem foram detectados 329 transcritos, porém apenas 30 apresentaram similaridade com as sequências dos candidatos ($e\text{-value} < 10^{-3}$ e similaridade > 40%).

Ao término dessa mineração obteve-se 31 candidatos, sendo que 15 foram selecionados para análise de expressão: o que apresentou similaridade com o transcrito DN15565 (anotado como *effector candidate*) e 14 anotados como hipotéticos ou não anotados. Destes 14 candidatos, quatro apresentaram similaridade com transcritos que são *upregulated* em ambos os tempos, um com transcrito *upregulated* no tempo 12-0h e *downregulated* no tempo 24-12h e 9 com transcritos que apresentaram regulação positiva no tempo 12-0h e não foram diferencialmente expressos no intervalo 24-12h. Nenhum candidato selecionado apresentou domínio PFAM e motivo e quanto à localização subcelular, dez são secretados/apoplásticos, dois nucleares, dois cloroplastidiais e um mitocondrial (Tabela 8).

Tabela 8. Descrição dos 15 candidatos selecionados para análise de expressão. Para cada candidato há o respectivo transcrito encontrado pelo resultado do tBlastn com o tipo de regulação nos tempos analisados (12-0h e 24-12h (Bini, 2016). A anotação, predição do peptídeo sinal (PEP.S), hélice transmembrana (TMH), superfície de ancoragem (GPI) e localização celular (LOC3) também são fornecidos.

CANDIDATO	ANOTAÇÃO	PEP.S	TMH	GPI	LOC3	TRANSCRITO (HIT)	12-0h	24-12h
22739	HIPOTÉTICA	+	-	-	secretado	DN15565 <i>(effector candidate)</i>	<i>DOWN</i>	<i>ni</i>
00372	NA	+	-	-	secretado	DN2543	<i>UP</i>	<i>UP</i>
00732	NA	+	-	-	secretado	DN17397	<i>UP</i>	<i>ni</i>
00755	HIPOTÉTICA	+	-	-	cloroplasto	DN15196	<i>UP</i>	<i>ni</i>
15800	HIPOTÉTICA	+	-	-	secretado	DN21936	<i>UP</i>	<i>DOWN</i>
36972	NA	+	-	-	secretado	DN17397	<i>UP</i>	<i>ni</i>
60547	NA	+	-	-	secretado	DN16381	<i>UP</i>	<i>ni</i>
61240	HIPOTÉTICA	+	-	-	secretado	DN17620	<i>UP</i>	<i>ni</i>
06850	NA	+	-	-	núcleo	DN18161	<i>UP</i>	<i>ni</i>
127358	NA	+	-	-	secretado	DN18350	<i>UP</i>	<i>UP</i>
22413	NA	+	-	-	secretado	DN16864	<i>UP</i>	<i>UP</i>
27121	NA	+	-	-	núcleo	DN14768	<i>UP</i>	<i>ni</i>
27148	NA	+	-	-	mitocôndria	DN17154	<i>UP</i>	<i>ni</i>
06376	NA	+	-	-	secretado	DN15525	<i>UP</i>	<i>UP</i>
71650	NA	+	-	-	cloroplasto	DN14137	<i>UP</i>	<i>ni</i>

Nota: As palavras e símbolos possuem os seguintes significados: *Up*=*upregulated* (regulação positiva); *DOWN*=*downregulated* (regulação negativa); *ni*= ausência de expressão diferencial; + (presença); - (ausência).

3.2.1. Validação dos primers

Para os 15 candidatos a efetores selecionados para análise de expressão, foram desenhados um total de 23 pares de *primers*. Todos os *primers* foram otimizados quanto a melhor temperatura de anelamento por meio de reações de PCR utilizando-se DNA de MF-1 como *template*. Dos 23 pares de *primers*, quinze amplificaram nas temperaturas testadas e os mesmos correspondem a doze candidatos, pois para três candidatos (15800, 06376 e 27148) dois pares de *primers* foram otimizados. Neste caso, selecionou-se aleatoriamente o primeiro par (F1/R1).

Os 12 candidatos foram amplificados com os respectivos *primers* por meio de reações de PCR e os *amplicons* foram purificados e sequenciados. Os *amplicons* sequenciados alinharam com as ORFs de seus respectivos *contigs*, demonstrando que a sequência-alvo foi amplificada. Entretanto, por meio do pré-teste de amplificação utilizando amostras cDNA dos diferentes tempos (6, 12 e 24 h.a.i) somente oito genes candidatos foram amplificados, os quais foram utilizados na análise de expressão (Tabela 9). Provavelmente, os quatro candidatos que não amplificaram com amostras de cDNA devem ter sido desenhados em regiões intrônicas. Todos os oito candidatos apresentaram similaridade com transcritos regulados positivamente no intervalo 12-0h e em relação à localização seis são secretados, um é nuclear e o outro cloroplastidial (Tabela 8 e 9).

Tabela 9. Descrição dos oito candidatos utilizados na análise de expressão, com seus respectivos IDs, tamanho (em aa), anotação, localização predita pelo LocTree3 e predição pelo EffectorP.

ID	TAMANHO DA ORF	ANOTAÇÃO	PREDIÇÃO LOC3
00372	198	NA	secretado
00732	91	NA	secretado
00755	70	HIPOTÉTICA	cloroplasto
15800	81	HIPOTÉTICA	secretado
36972	98	NA	secretado
60547	114	NA	secretado
127358	57	NA	secretado
27121	257	NA	núcleo

Nota: NA significa não anotada.

3.3. Expressão dos efetores

3.3.1. Bioensaio de desenvolvimento *in vitro*

Por meio do desenvolvimento *in vitro* do patógeno, os tempos analisados foram 0, 6, 12 e 24 h.a.i., sendo que o tempo 0 h.a.i corresponde ao controle, com a presença dos uredósporos não germinados (Figuras 13a e 14a). Em ambos os experimentos, em 6 h.a.i iniciou-se a formação dos tubos germinativos (Figuras 14b e 14b), 12 h.a.i foi possível observar alguns apressórios (Figuras 13c, 13d e 14c, 14d) e finalmente 24 h.a.i há a presença de apressórios e uma abundância de grandes tubos germinativos. (Figuras 13e, 13f e 14e e 14f). Diferentemente de Bini (2016) não foi possível verificar a formação da hifa de

penetração no tempo 24 h.a.i, devido a maior quantidade de inóculo utilizado neste estudo, o que implica em um menor espalhamento e, conseqüentemente, em menor diferenciação.

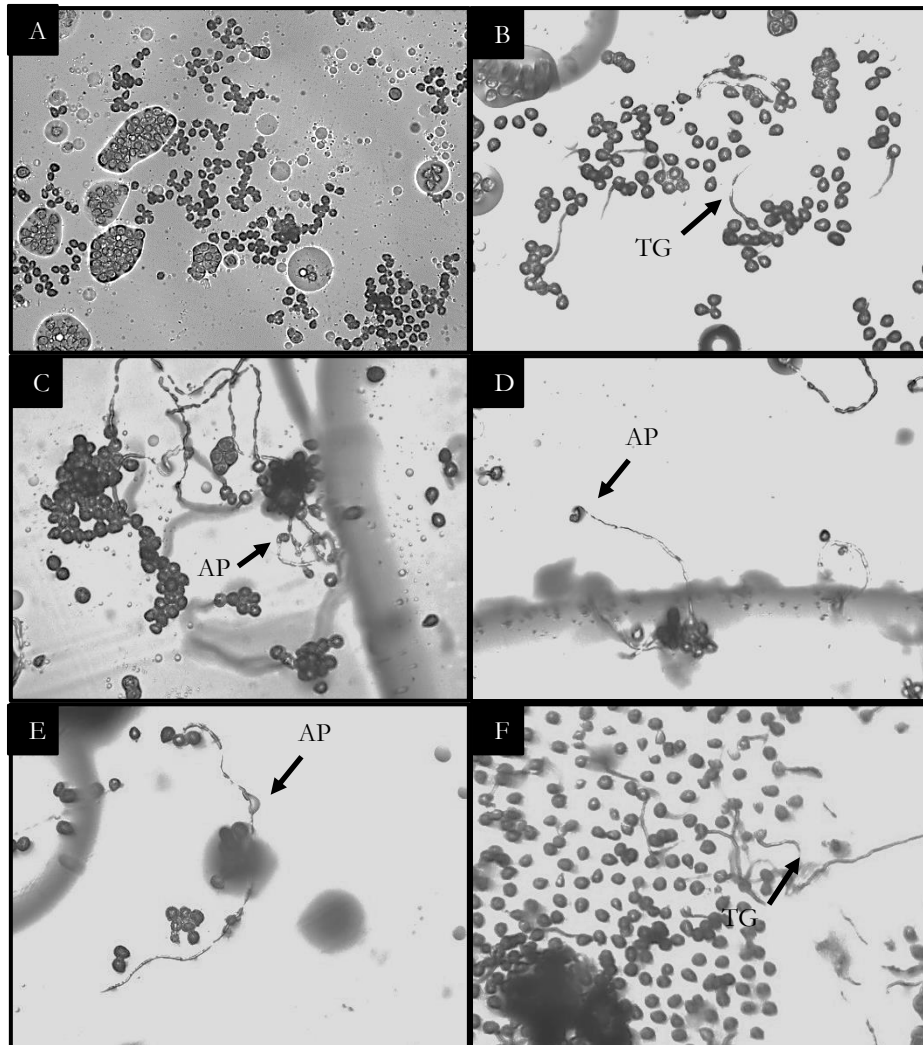


Figura 13. Estruturas fúngicas da linhagem monopustular MF-1 desenvolvidas sobre membranas de diálise em meio ágar-água acrescido de azeite de oliva (0,5%). A) 0 h.a.i: esporos não germinados; B) 6 h.a.i: início de formação dos tubos germinativos (TG); C e D) 12 h.a.i: início da formação dos apressórios (AP); E e F) 24 h.a.i: apressórios e grandes tubos germinativos. Aumento: 100x.

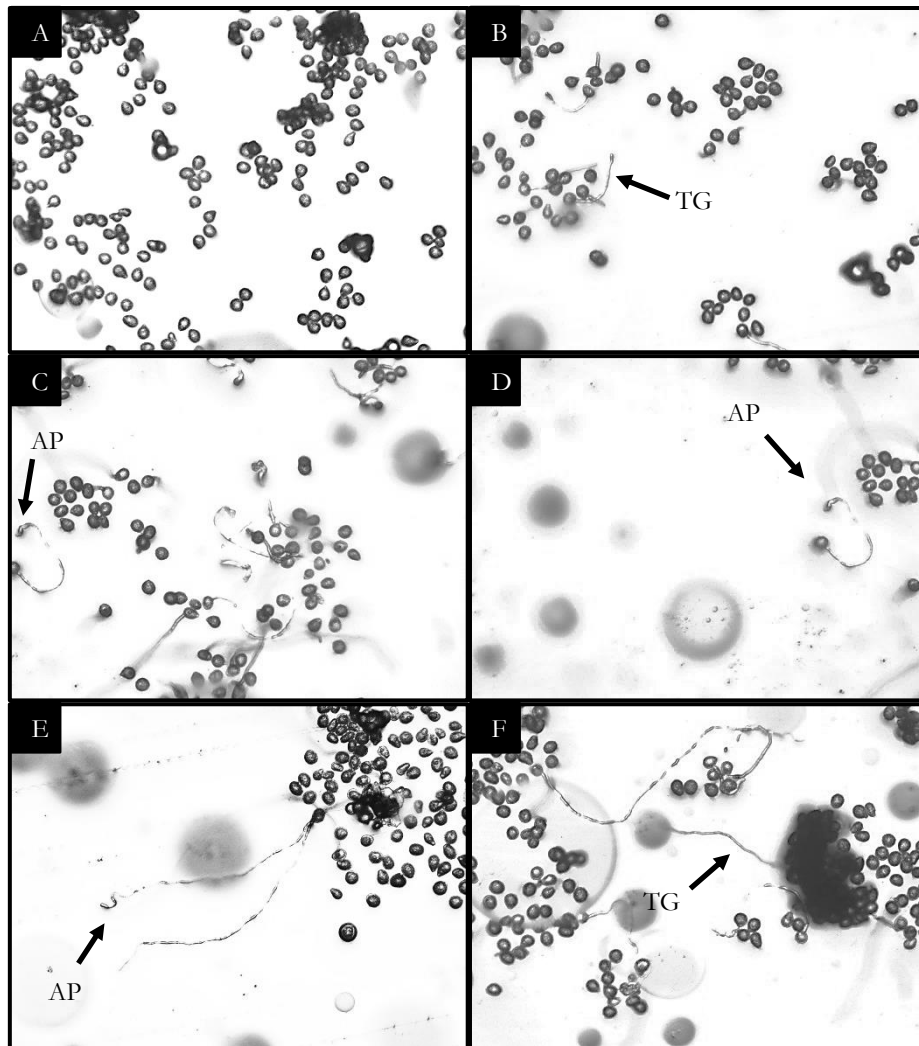


Figura 14. Estruturas fúngicas desenvolvidas a partir de uredósporos de GM-J1 desenvolvidas sobre membranas de diálise em meio ágar-água acrescido de azeite de oliva (0,5%). A) 0 h.a.i: esporos não germinados; B) 6 h.a.i: início de formação dos tubos germinativos (TG); C e D) 12 h.a.i: início da formação dos apressórios (AP); E e F) 24 h.a.i: apressórios e grandes tubos germinativos. Aumento: 100x.

3.3.2. RT-qPCR

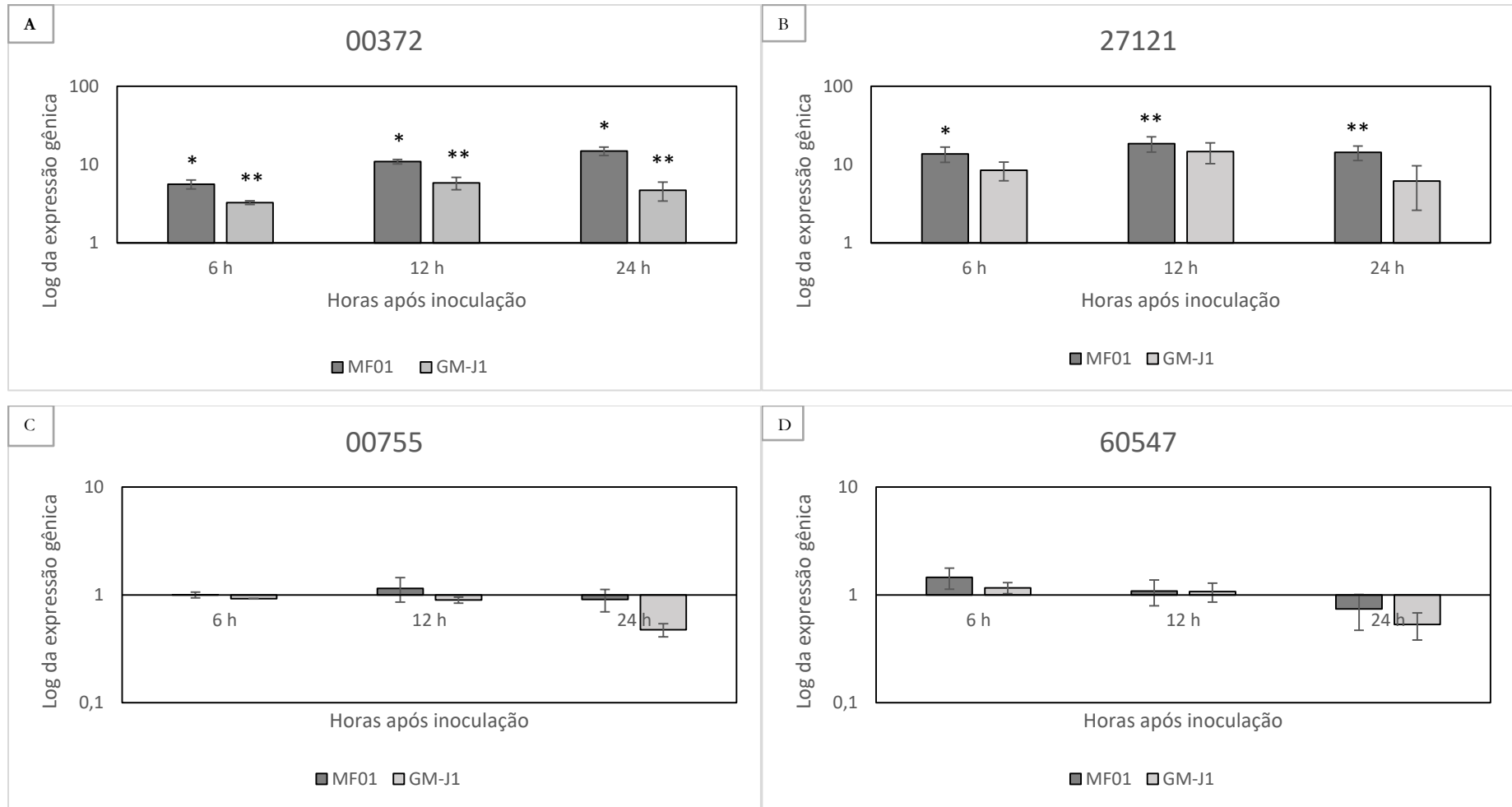
O RNA total das quatro repetições biológicas de cada tempo analisado foi extraído e a integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e por meio dos valores das razões 260/280 e 260/230 medidas pelo equipamento nanodrop2000 (Termo Fisher). Os valores médios para as razões 260/280 e 260/230 foram 2,27 e 2,12 para o experimento realizado com uredósporos de MF-1 e 2,27 e 2,08 para o experimento com uredósporos de GM-J1, respectivamente (Anexos A e B), demonstrando a integridade do RNA.

A especificidade das reações foi analisada por meio da curva de dissociação ou *melting*. Para todos os pares de *primers* obteve-se apenas um pico de dissociação, mostrando a amplificação específica do *amplicon* (Anexo C). Os valores médios de Cts para ambos os experimentos estão descritos no Anexo D. As eficiências calculadas pelo *LinReg* variaram de 1,71 – 2,1 e de 1,42 – 2,0 para os respectivos experimentos (Anexo E).

Em relação aos resultados de expressão os candidatos 00372 e 27121 apresentam os maiores valores de expressão relativa para ambos os experimentos (Anexo E), sendo que o candidato 000372 foi diferencialmente expresso em todos os intervalos de comparação analisados (6-0h, 12-0h e 24-0h) em ambos os experimentos. O candidato 27121 foi diferencialmente expresso em todos os tempos somente para o experimento realizado com uredósporos de MF-1. Por outro lado, os candidatos 00755 e 60547 não foram diferencialmente expressos em nenhum intervalo de comparação para ambos os experimentos. Os candidatos 15800 e 127358 foram diferencialmente expressos somente no intervalo 12-0h, entretanto, o candidato 127358 foi diferencialmente expresso somente para o experimento realizado com uredósporos de MF-1. Os candidatos 00732 e 36972 foram diferencialmente expressos nos intervalos 6-0h e 12-0h para ambos os experimentos. Todos esses genes diferencialmente expressos nesses respectivos intervalos de comparações foram regulados positivamente (*upregulated*) (Figura 15).

De uma maneira geral, os cinco genes preditos como apoplásticos (00372, 15800, 127358, 00732 e 36972) foram diferencialmente expressos nas comparações 6 e 12h ou somente 12-0h que correspondem as fases de germinação e pré-penetração, suportando sua predição como efetores apoplásticos. O candidato a efetor predito como nuclear (27121) foi diferencialmente expresso para todos os tempos (para MF-1), apresentando aumento de expressão até 12 h.a.i e uma tendência de decréscimo a partir de 24 h.a.i. Em contrapartida, o candidato 00755, predito com atuação no cloroplasto, não foi diferencialmente expresso nos tempos analisados (Figuras 15 e 16).

Comparando-se ambas as populações estudadas (MF-1 proveniente de eucalipto e GM-J1 proveniente de jumbo) foi possível verificar algumas diferenças nos valores de expressão e no perfil de expressão, apesar de não ter sido realizada a análise estatística (Figura 15). Os valores de expressão foram maiores para os candidatos analisados no experimento realizado com uredósporos de MF-1, com exceção do candidato 36972 que foi mais expresso em GM-J1. Diferenças no perfil foram observadas para quatro dos seis candidatos que foram diferencialmente expressos. O candidato 00372 apresentou aumento gradativo em todos os tempos analisados para MF-1 enquanto para GM-J1 esse aumento ocorre até 12 h.a.i. Os candidatos 15800 e 00732 apresentaram diminuição gradativa de expressão para MF-1, enquanto para GM-J1 houve um aumento no tempo 12 h.a.i. Para o candidato 127358 houve expressão diferencial no intervalo 0-12h para MF-1, enquanto em GM-J1 o gene não foi diferencialmente expresso (Figuras 15 e 16).



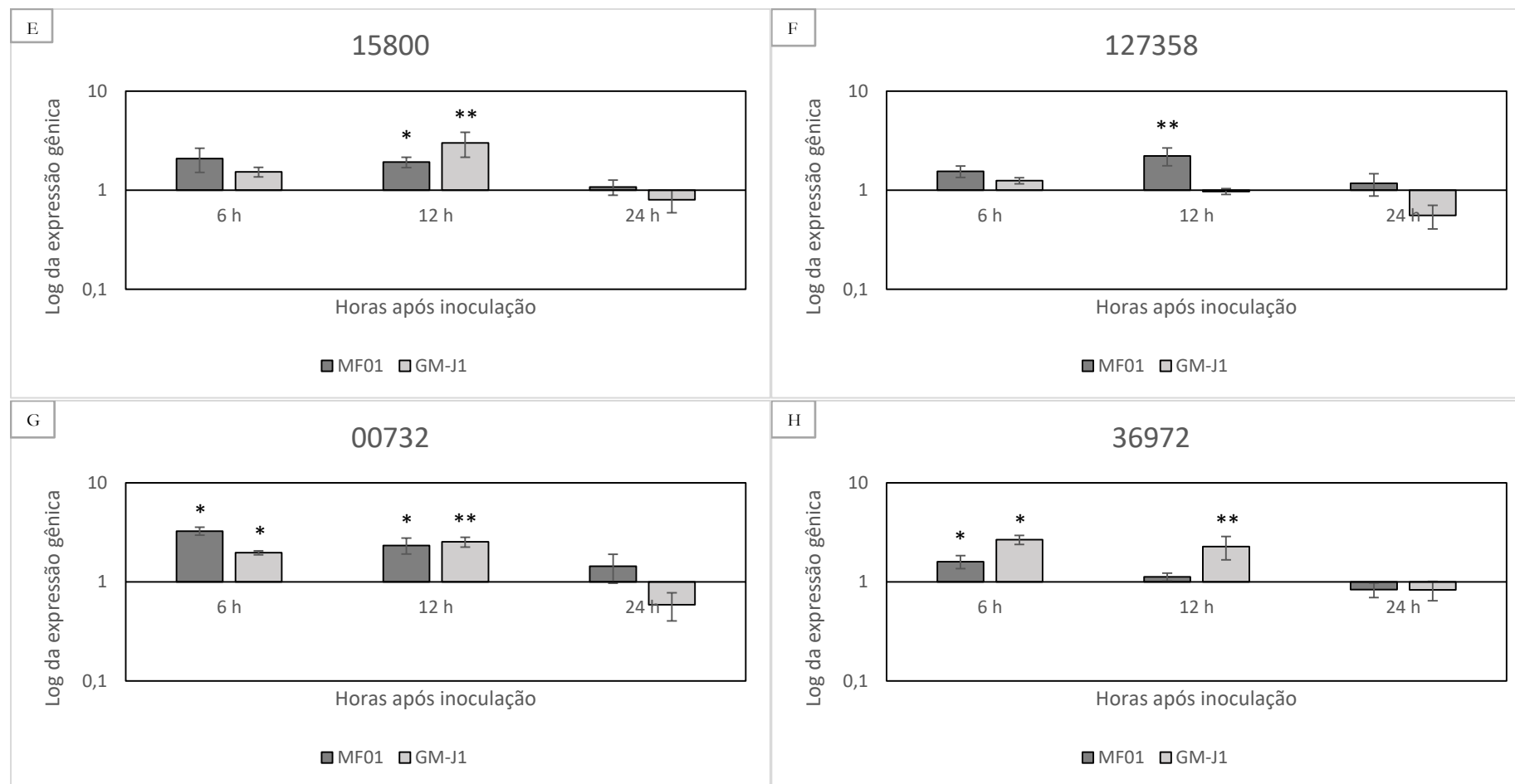


Figura 15. Dados de expressão relativa dos oito candidatos a efetores em relação aos genes endógenos do fungo (Beta-tubulina e Fator de alongação) ao longo das 24 horas iniciais de desenvolvimento *in vitro* do patógeno. A expressão gênica relativa foi mensurada de acordo com o método de Pfaffl (PFAFFL, 2001). As barras apresentadas são a média \pm erro padrão de quatro replicatas para o experimento com uredósporos provenientes de eucalipto (MF-1) e três replicatas para o experimento com uredósporos provenientes de jambo (GM-J1). A diferença estatística entre o respectivo tempo e o tempo controle (0h) foi calculada pelo *Pairwise Fixed reallocation Randomisation Test* com valor de *bootstrap*=1000. Os símbolos indicam: * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$). A) Candidato 00372; B) 27121; C) 00755; D) 60547; E) 15800; F) 127358; G) 00732; H) 36972.

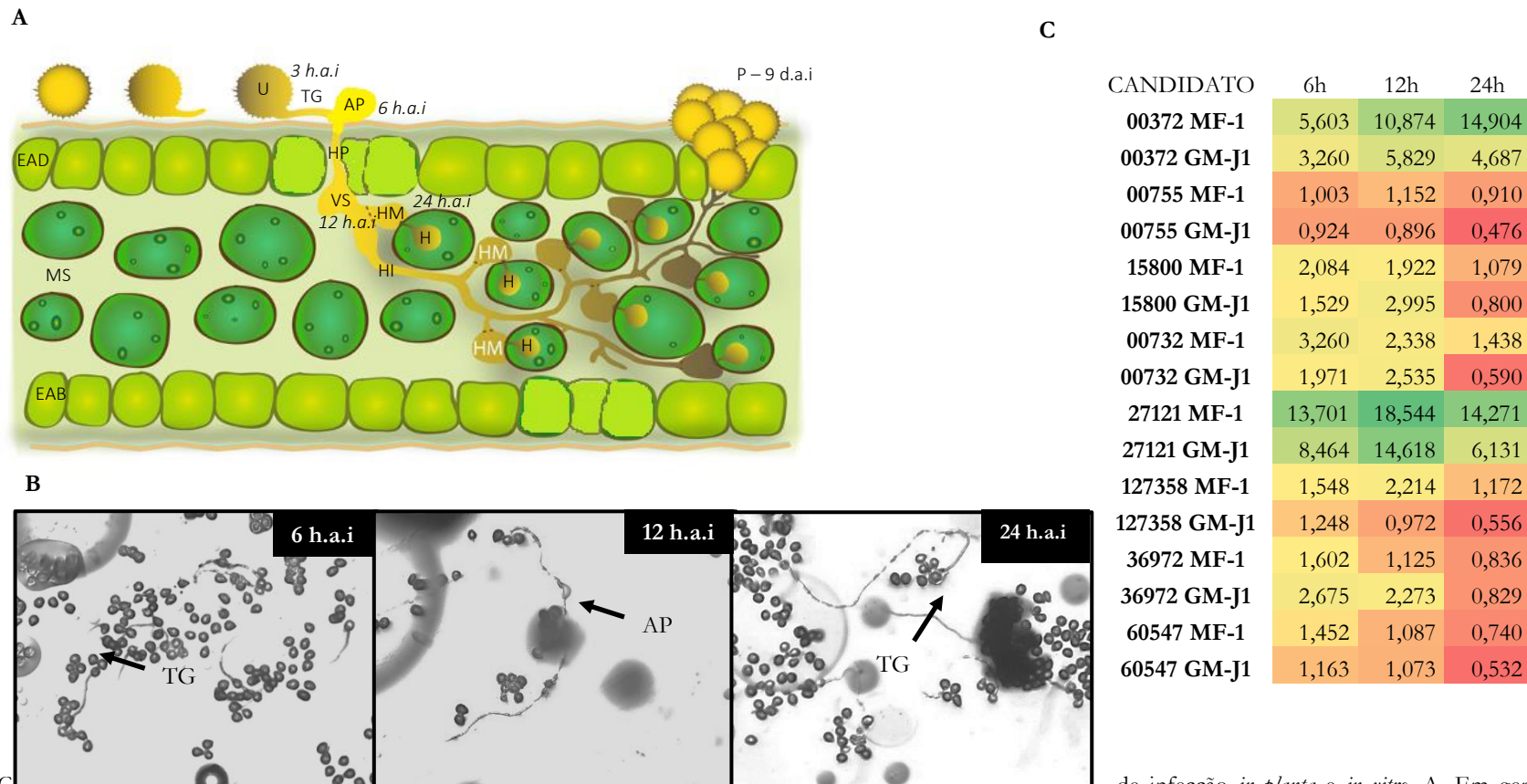


Figura 16. Correlação dos dados de expressão com o desenvolvimento das estruturas de infecção *in planta* e *in vitro*. A. Em genótipos suscetíveis de *E. grandis* tubos germinativos, apressórios, vesícula subestomática e haustórios podem ser visualizados em 3, 6, 12 e 24 h.a.i., respectivamente. As primeiras pústulas são observadas 9 d.a.i. (Leite, 2012) U=uredósporo, TG=tubo germinativo, AP=apressório, HP=hifa de penetração, VS=vesícula subestomática, HI=hifa de infecção, HM=célula mãe do haustório, H=haustório. Figura adaptada de Cantu et al. (2013). B. Nos tempos analisados nesse estudo foi observada a formação dos tubos germinativos 6 h.a.i e dos primeiros apressórios 12 h.a.i, não havendo o desenvolvimento das demais estruturas. C. Dados de expressão dos oito genes candidatos a efetores das duas populações do patógeno estudadas. Os números referem-se aos valores de expressão relativa e a coloração reflete o nível de expressão (escala vermelho, amarelo, verde) variando de vermelho (menores valores de expressão) à verde (maiores valores de expressão). MF-1 = população proveniente de eucalipto e GM-J1 = população proveniente de jambo.

4. DISCUSSÃO

Por meio da busca de palavras-chave relacionadas a efetores não foi detectado nenhum candidato, ou seja, nenhuma sequência anotada tinha sido previamente classificada como efetor. Tal fato pode ser explicado devido à baixa conservação das sequências de candidatos a efetores, que implica em baixa similaridade com proteínas já depositadas nos bancos de dados (Ellis et al., 2009). Essa baixa similaridade das sequências dos efetores, demonstra que os mesmos estão sobre alta pressão de seleção. As principais forças que atuam na evolução dos efetores têm sido a duplicação e diversificação (Franceschetti et al., 2017), sendo que tais fenômenos têm sido descritos em efetores de Oomicetos, tais como *Hyaloperonospora arabidopsidis*, *P. sojae* e *P. ramorum* (Baxter et al., 2010, Jiang et al., 2008) e em candidatos de *P. striiformis* (Cantu et al., 2013).

Apesar de nenhuma sequência ser classificada como efetor, 1.021 sequências previamente anotadas foram preditas como candidatos a efetores por meio da *pipeline* utilizada, das quais 729 foram anotadas com termos relacionados a elementos de transposição. Sabe-se que a baixa conservação das sequências dos efetores está relacionada com as regiões em que estes genes estão inseridos no genoma, geralmente regiões repetitivas ou suscetíveis a eventos de transposição (Jiang, 2011), o que garante uma contínua coevolução na interação planta-patógeno. O surgimento de isoformas truncadas da proteína efetora Avr4 de *C. fulvum*, que impede o reconhecimento pela proteína de resistência CF4, está associado à região rodeada de *retrotransposons* em que o gene está inserido (Joosten et al., 1997; Van Poppel et al., 2009). Em Avr2 foi observado a inserção de um elemento *LINE-like* dentro da ORF, levando a perda da virulência da proteína efetora (Luderer et al., 2002). Assim, a presença de peptídeo sinal nessas 729 sequências sugerem que estes candidatos estejam inseridos em regiões ricas em elementos transponíveis ou até mesmo que um elemento tenha sido inserido dentro do candidato.

Destaca-se que não se pode desconsiderar a ocorrência de uma predição incorreta da ORF. Comparando-se a presença do peptídeo sinal nessas sequências anotadas como elementos de transposição por meio da predição do *SignalP* e do *Phobius* (obtidos pela análise do *Interpro* no programa *Blast2go*), 241 sequências são correspondentes, ou seja, preditas como candidatos a efetores por ambos os programas. Assumindo-se que a predição na análise do *Phobius* utilizou a ORF correta, conclui-se que algumas sequências realmente estão em regiões rodeadas por elementos de transposição e outras apresentaram um erro de predição devido a predição incorreta da ORF.

Das 1.021 sequências previamente anotadas preditas como candidatos a efetores, 292 apresentam diversas anotações. Alguns efetores têm atuado como proteases, hidrolases, fosfatases, quinases, transferases e ubiquitina ligase no interior da célula do hospedeiro. Tal fenômeno tem sido detectado em bactérias (Shao et al., 2003; Abramovitch et al., 2006; Janjusevic et al., 2006; Fu et al., 2007; Lee et al., 2012; Rodriguez-Herva et al., 2012; van Damme et al., 2012) e, mais recentemente, em fungos filamentosos e Oomicetos (Schornack et al., 2010; Kong et al., 2015; Jashni et al., 2015). Além disso, vários efetores também têm sido descritos como inibidores de proteases, glucanases e quitinases (Rooney et al., 2005; Tian et al., 2005, 2007, Damasceno et al., 2008). Nesse trabalho foram detectados 27 candidatos anotados com tais atividades enzimáticas ou inibidoras. Somente quatro candidatos apresentaram anotações relacionadas a proteínas de patogenicidade, tais como, isomerases, GTPases ou proteínas de ligação a GTP.

Os demais candidatos anotados apresentaram funções diversas. Sabe-se que nem toda proteína secretada é um efetor e algumas proteínas secretadas possuem sinais de retenção/direcionamento para

organelas da própria via secretória, tais como, retículo, complexo de Golgi, lisossomos e peroxissomos (Lodish et al., 2012). Entretanto, a predição incorreta também pode ter ocorrido com essas sequências, as quais serão investigadas futuramente juntamente com as sequências classificadas como elementos transponíveis.

Excluindo-se as 1.021 sequências previamente anotadas, o número de candidatos a efetores encontrados em *A. psidii*, foi de 2.886 ($sprob > 0,5$). Esse valor considera apenas as proteínas não anotadas (*no hit*) e hipotéticas, sendo aproximadamente 2,5 vezes maior ao encontrado em outras espécies de ferrugens. Cantu et al. (2011) detectaram 1.088 sequências candidatas a efetores no secretoma de *P. striiformis*, enquanto Duplessis et al. (2011) identificaram 1.184 candidatos em *Melampsora larici-populina* e 1.106 em *P. graminis*. Esses trabalhos utilizaram *pipelines* similares a empregada neste estudo, entretanto o valor $sprob$ para predição do peptídeo sinal no *SignalP* foi estabelecido em $sprob > 0,9$, ao passo que neste trabalho o valor de corte foi $sprob > 0,5$. Admitindo-se um valor de $sprob > 0,9$, apenas 960 dos 2.886 candidatos de *A. psidii*, além disso, por meio da predição adicional realizada no programa *EffectorP* somente 1.138 dos 2.886 candidatos foram preditos como efetores, valores muito mais próximos do encontrado para as demais espécies de ferrugens.

Nemri et al. (2014) detectaram 725 candidatos a efetores em *M. lini*. Esse número relativamente menor deve-se a uma abordagem diferente utilizada pelos autores. Esses candidatos foram preditos após uma minuciosa análise das tribos (*Markov Clustering*) que apresentavam características intrínsecas de efetores, tais como, presença de motivos encontrados em efetores, homologia a proteínas Avr e candidatos expressos no haustório, tamanho menor que 150 aa e alto conteúdo de cisteína (>3%). Valores menores também são encontrados quando dados de expressão *in planta* ou de estruturas de infecção são analisados. Em *Hemileia vastatrix* (*H.v*) foram detectados 449 candidatos a efetores expressos em esporos germinados e apressórios (Talhinhas et al., 2014), enquanto em folhas infectadas foram encontradas 382 proteínas secretadas, incluindo na maior parte candidatos a efetores exclusivos de *H.v* e homólogos de outras espécies de ferrugens (Fernandez et al., 2012). Em *Phakopsora pachyrhizi* foram encontradas 13 tribos que contêm potenciais efetores do transcriptoma de folhas infectadas (De Carvalho et al. 2017). Esses estudos refletem apenas os efetores que estão sendo expressos em condições específicas, enquanto a predição do genoma fornece uma visão geral de toda composição de efetores do genoma.

Dos 2.886 candidatos a efetores, 419 são proteínas hipotéticas e destas 83,1% apresentaram similaridade com sequências hipotéticas de *P. graminis*, 6,9% com *M. larici-populina*, 6,7% com outros fungos e 3,3% com outros organismos. Semelhantemente, dos 1.088 candidatos a efetores de *P. striiformis* 67% compartilham similaridade com sequências de *P. graminis* (Cantu, 2011), e das 615 proteínas secretadas por *H. vastatrix* 62,6% apresentam similaridade com *P. graminis* e 17,7% com *M. larici-populina* (Porto, 2016). Tal fato demonstra que alguns candidatos podem ser conservados dentro da ordem Pucciniales. Os 2.466 candidatos restantes (85,4%) não foram anotados, sendo considerados exclusivos de *A. psidii*; valores semelhantes são encontrados em *P. graminis* e *M. larici-populina*, 84% e 74%, respectivamente (Duplessis et al., 2011).

Algumas características dos efetores quanto a sequência são a presença do peptídeo sinal, ausência de domínios transmembranas e sinais de ancoragem, pequeno tamanho, ausência de domínios PFAM e alto conteúdo de resíduos de cisteína (Saunders et al., 2012). Neste trabalho o tamanho dos candidatos a efetores variou de 45-414 aminoácidos (aa), com tamanho médio de 71 aminoácidos. Valores semelhantes são encontrados para candidatos a efetores de vários patógenos. Os efetores Avr2 e Avr4 *Cladosporium fulvum* apresentam 78 e 135 aminoácidos, respectivamente (Luderer et al., 2002; Joosten et al., 1997). A proteína Avr3

(Six3) de *Fusarium oxysporum* é composta por 189 aminoácidos (Rep et al., 2004) e Pep1 de *Ustilago maydis* por 178. (Doehlemann et al., 2009). Os candidatos de *P. striiformis* apresentaram um tamanho médio de 165 aminoácidos (Cantu et al., 2011).

A análise de domínios pelo PFAM revelou a presença de 8 domínios PFAM em 13 candidatos, sendo que, cinco deles podem ser encontrados em proteínas codificadas pelas ORFs de elementos transponíveis (TEs). O domínio DDE_3 (PF13358.5) está envolvido na clivagem de DNA, podendo ser encontrado em elementos transponíveis, enquanto o domínio Dimer_Tnp_hAT (PF05699.13) é encontrado no C-terminal de TEs. RNase H (PF00075.23) catalisa a hidrólise de híbridos de DNA-RNA, estando envolvida em vários processos moleculares, incluindo o de retrotransposição. Domínios RVP_2 (PF08284.10) são encontrados em proteases, tais como *pol* e mais raramente em *gag* (proteínas encontradas em retroelementos) e o domínio dedo de zinco (PF12907.6) é encontrado em várias proteínas que se ligam a zinco, inclusive proteínas *gag* de TEs. Assim, essas sequências não podem ser consideradas efetores já que os mesmos não apresentam domínios PFAM definidos. Saunders et al. (2012) detectaram alguns domínios em candidatos de *M. larici-populina* e *P. graminis*, entretanto, esses domínios pertencem às proteínas secretadas que são reconhecidas pelo papel nas interações planta-patógeno.

Pela análise *de novo* realizada no programa MEME foram encontrados quatro novos motivos exclusivos de candidatos a efetores de *A. psidii*. Dos 2.886 candidatos, 164 apresentaram um motivo específico, sendo o mais frequente QNQAVR, presente em 65% dos candidatos. Saunders et al. (2012) utilizaram a mesma estratégia para prever novos motivos para *P. graminis* e *M. larici-populina* e encontraram cinco novos motivos em 409 candidatos, com o mais frequente presente em 107 candidatos (SXQXCXXY). Em *P. pachyrhizii* seis novos motivos foram preditos em três tribos, incluindo candidatos de outras seis espécies de Pucciniales, demonstrando que os mesmos podem ser conservados (De Carvalho et al., 2017). Além disso, foi observado um padrão relacionado com as características dos candidatos e suas prováveis localizações. Os motivos [YFM][ST]C e RCR foram detectados em proteínas secretadas que são translocadas para o núcleo, ([NC]xK) e (GC[FS]) são encontrados em SSPs ricas em cisteína que apresentam similaridade ao efector translocado para o núcleo de *U. fabae*. O motivo [AFY]xC e [FY]xC estão presentes em SSPs semelhantes a candidatos previamente preditos (Saunders et al., 2012; Hacquard et al., 2012; Link et al., 2014) e apresentam diferentes localizações (núcleo, citoplasmático ou cito-nuclear).

Para tentar inferir sobre a atuação dos candidatos a efetores foi realizada uma predição no programa LocTree3, pois o compartimento subcelular alvo de um efector é um caráter muito importante no entendimento da função. Muitos estudos têm determinado a localização dos efetores, seja por meio de predição ou por ensaios com expressão transiente acoplado à microscopia fluorescente. As localizações descritas como alvo dos efetores em fungos filamentosos e Oomicetos são: apoplasto, citoplasma, tonoplasto, membrana plasmática, núcleo, nucléolo, retículo endoplasmático, e mais recentemente, mitocôndrias e cloroplastos, os quais eram descritos apenas para bactérias (Caillaud et al., 2012; McLellan, 2013; Petre et al., 2015; De Carvalho et al., 2017). A determinação da localização por meio de ensaios de expressão transiente é mais precisa quando comparada a predição *in silico*, Caillaud et al. (2012) observaram que apenas 20% das localizações *in vivo* foram corretamente preditas *in silico*.

Neste estudo 87,3% dos efetores (2.519) foram preditos como apoplásticos, ou seja, que atuam no espaço extracelular ou espaços intercelulares do hospedeiro. O alto número de efetores apoplásticos preditos é essencial para patógenos biotróficos, os quais dependem de células vivas do hospedeiro, não podendo ser

reconhecidos. Algumas das atividades dos efetores apoplásticos são a inibição de enzimas de degradação ou de metabólicos antifúngicos liberados pelo hospedeiro, tais como os efetores Avr2 e Avr4 de *C. fulvum* que atuam inibindo quitinases do hospedeiro, além de inibição do reconhecimento dos padrões moleculares pelos receptores PRRs (Gohre e Robatezek, 2008; De Wit, 2016).

Os efetores citoplasmáticos são aqueles que agem no citoplasma do hospedeiro, independentemente do compartimento subcelular. Dos 2.886 candidatos, 367 foram preditos como citoplasmáticos e destes, somente 23 atuam especificamente no citoplasma. De acordo com a literatura os efetores que atuam no citoplasma estão envolvidos com a inibição de cascatas de sinalização mediadas por MAP-quinases, degradação de componentes/proteínas relacionadas à defesa e interferência na secreção de proteínas e tráfego vesicular (Gohre e Robatezek, 2008). Alguns candidatos a efetores de *H. arabidopsis*, *M. larici-populina* e *P. pachyrhizii* foram detectados no citoplasma de células do hospedeiro por análise de microscopia confocal (Caillaud et al., 2012; Petre et al., 2015, De Carvalho et al., 2017). Somente dois candidatos foram preditos ter localização na membrana plasmática do hospedeiro, os quais podem inibir a PTI ou o tráfego vesicular, principalmente a exocitose, que consiste em um importante mecanismo de defesa.

Quanto aos efetores citoplasmáticos que são direcionados para compartimentos subcelulares específicos, 202 foram preditos com atuação no cloroplasto e 21 como mitocondriais. Efetores que são direcionados para essas organelas têm sido recentemente detectados em fungos. Diferentemente deste trabalho que encontrou mais candidatos possivelmente translocados para o cloroplasto, De Carvalho et al. (2017) detectaram somente candidatos que foram preditos ter a localização mitocondrial em *P. pachyrhizii*. Petre et al. (2015) verificaram, por microscopia confocal, um candidato a efetor de *M. larici-populina* que possui como alvo somente o cloroplasto (Mlp107772) e outro que pode ser encontrado em ambas as organelas. Mais recentemente, foi verificado que o candidato Mlp107772 possui um peptídeo transiente no N-terminal que auxilia no processo de translocação para o estroma dos cloroplastos, igualmente ao encontrado em proteínas do hospedeiro, sugerindo que os efetores têm mimetizado os sinais de tráfego das células vegetais (Petre et al., 2016).

Sabe-se que em mitocôndrias e cloroplastos ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente superóxido, o qual é posteriormente convertido a peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase (SOD). Peróxido de hidrogênio está envolvido no estímulo da produção do ácido salicílico, elemento chave na indução da resistência sistêmica adquirida (SAR). Além disso, o ácido salicílico atua no fortalecimento da parede celular e como um agente antimicrobiano (Resende et al., 2003). Torres-Zabala et al. (2015) verificaram que alguns efetores de *P. syringae* que atuam no cloroplasto, desestabilizam o fotossistema 2, inibindo a cadeia transportadora de elétrons e diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio, o que influencia na resposta de defesa da planta.

Outra categoria de relevante interesse são os efetores que operam no núcleo, estudos recentes sugerem que esse compartimento é o principal alvo dos efetores, onde atuam reprogramando a expressão de genes alvos relacionados a defesa ou fisiologia, a fim de direta ou indiretamente suprimir a defesa e/ou promover a virulência do patógeno (Caillaud et al., 2012). Nesse estudo 119 candidatos foram classificados como nucleares. Em *H. arabidopsis* 66% dos 49 candidatos avaliados por microscopia são encontrados no núcleo (Caillaud et al, 2012), enquanto em *M. larici-populina* dos 24 candidatos analisados, 17 mostraram padrão de acumulação no núcleo, entretanto somente três apresentaram um padrão distinto do controle (GFP) (Petre et al., 2015). Em ambos os estudos alguns candidatos apresentaram acumulação no nucléolo,

onde podem influenciar na biogênese de ribossomos e consequentemente, na tradução de proteínas. Um padrão denominado cito-nuclear, no qual um mesmo efetor pode ter localização no citoplasma e núcleo também foi observado nos estudos.

Kemen et al. (2005) detectaram uma proteína efetora de *Uromyces fabae* que se acumula no citoplasma e núcleo de *Vicia faba*, a qual denominou de *rust transferred*. O autor sugere que esta proteína tenha importante papel na manutenção da interação biotrófica, mas ainda não se sabe por qual mecanismo ocorre a passagem pela matriz extrahaustorial, nem sua função. Um homólogo dessa proteína foi encontrado por Bini (2016) no transcriptoma de *A. psidii*, entretanto nenhum dos 2.886 candidatos a efetores preditos apresentou similaridade com esse transcrito.

Apesar de vários efetores serem encontrados no núcleo, poucos possuem uma função caracterizada. Os efetores TAL de *Xanthomonas*, SAP11 de fitoplasma e *Crinklers* (CRNs) de *Phytophthora* são os que apresentam melhor caracterização funcional até o momento; todos utilizam a importina (*helper effector*) para entrar no núcleo. Os efetores TAL de *X. citri* estão envolvidos no remodelamento e reparo da cromatina, e regulação transcricional de genes associados à síntese de auxina e giberelina, remodelamento da parede celular, divisão celular, morfogênese e metabolismo de açúcares (Chen et al., 2010; De Souza et al., 2012; Pereira et al., 2014). SAP11 se liga a fatores de transcrição TCP, interferindo em genes relacionados diretamente ao desenvolvimento da planta, aumentando a massa de tecido verde, e, consequentemente, a transmissão do mesmo pelo vetor (Macleon et al., 2011; Sugio et al., 2011). Os efetores *Crinklers* estão associados à inibição enzimática (Damasceno et al., 2008; Tian et al., 2004, 2005, 2007).

Os efetores citoplasmáticos em fungos biotróficos são liberados pelos haustórios. Catanzariti et al. (2006) identificaram 21 proteínas secretadas expressas pelo haustório (HESPs) por meio de uma biblioteca de cDNA específica do haustório da ferrugem do linho (*M. lini*). Link e Voegelé (2008) identificaram 62 HESPs de *U. fabae* por meio da técnica de armadilha de sinal de secreção. O valor reduzido comparado ao encontrado nesse estudo (367) deve-se a metodologia empregada; em ambos os estudos o número de proteínas secretadas são o resultado da expressão gênica em um momento específico da infecção, ao passo que este trabalho analisou a composição de candidatos presentes em todo o genoma de *A. psidii*.

Em relação a expressão dos candidatos a efetores, valores maiores são encontrados quando os experimentos são conduzidos *in vivo*, pois genes efetores são pouco expressos *in vitro* e induzidos e altamente *upregulated* durante a interação com o hospedeiro (*in planta*) (De Jonge et al., 2011; De Wit, 2016). Dados de RNA-seq revelaram que vários genes Avrs de *C. fulvum* podem ser *upregulated* mais de 1.000 vezes *in planta* comparados com crescimento *in vitro* (Mesarich et al., 2014). Entretanto, é importante destacar que genes que apresentam valores de expressão relativa considerados baixos podem ter uma grande importância biológica e tais valores podem ser suficientes para desencadear uma mudança no fenótipo do hospedeiro.

Dos oito candidatos, dois não foram diferencialmente expressos em nenhum dos tempos analisados (00755 e 60547) e seis foram diferencialmente expressos nos tempos analisados, sendo dois no tempo 12 h.a.i (15800 e 127358), dois nos tempos 6 e 12 h.a.i (00732 e 36972) e dois em todos os tempos (00372 e 27121). Dessa forma, observa-se que a expressão diferencial foi mais frequente nos tempos 6 e 12 h.a.i, os quais correspondem a formação dos tubos germinativos e dos primeiros apressórios, ou seja, processos de germinação e fase de pré-penetração (Leite, 2012). Vale destacar, que cinco desses candidatos foram preditos como apoplásticos e apresentaram aumento de expressão até 12 h.a.i, não sendo diferencialmente expresso a partir de 24 h.a.i. Esses dados são coerentes, já que efetores ditos apoplásticos

atuam nos tempos iniciais de infecção, inibindo principalmente o reconhecimento dos PAMPs pelos receptores de membrana PRRs, por meio da competição pelos sítios de ligação, inibindo assim a PTI. Após 24h de desenvolvimento *in vitro*, aproximadamente 87,1% dos uredósporos já estão germinados (Bini, 2016) e *in vivo* inicia-se a formação do haustório (Leite, 2012); esses eventos podem ter influenciado no fato desses candidatos não serem diferencialmente expressos na comparação 24-0h. Semelhantemente, Kleemann et al. (2008) verificaram que sete candidatos a efetores do fungo hemibiotrófico *Colletotrichum bigginsianum* são regulados positivamente no apressório e expressos nos tempos iniciais de infecção.

O candidato a efetor predito como nuclear (27121) apresentou os maiores valores de expressão para ambos os experimentos, sendo diferencialmente expresso (em todos os tempos analisados) somente para MF-1. Este candidato apresentou um aumento gradativo de expressão até 12 h.a.i seguida de uma pequena diminuição a partir de 24 h.a.i, porém não pode inferir se tais dados são estatisticamente diferentes. A expressão nos tempos iniciais é relevante, já que para ser liberado pelo haustório após 24h é necessário que estes genes estejam ativos previamente, entretanto, a ausência da formação dessa estrutura *in vitro* pode ter influenciado na diminuição da expressão no tempo 24 h.a.i. Por se tratar de um efetor nuclear, provavelmente está relacionado com a inibição da ETI. O candidato 00755, predito com atuação no cloroplasto, não apresentou diferença de expressão gênica nos tempos analisados; este gene pode ser ativado em tempos mais tardios que não foram analisados neste estudo, ou ser ativado somente *in planta*, assim como efetor Avr9 de *C. fulvum* o qual é dificilmente expresso *in vitro*, mas altamente expresso no hospedeiro (Van den Ackerveken et al., 1994). Duplessis et al. (2011) discute que candidatos que não expressos *in vitro* e *in planta* podem ainda agir como efetores especializados no hospedeiro alternativo.

A expressão diferencial no decorrer da infecção tem sido amplamente abordada na literatura, sendo reportado que conjuntos específicos de efetores são selecionados de acordo com os tempos de desenvolvimento da infecção (Win et al., 2012). Cantu (2013) analisou o perfil de expressão de 22 candidatos a efetores durante o processo de infecção de trigo por *P. striiformis*, sendo que oito apresentaram picos de expressão um dia após inoculação (d.a.i), quatro após 6 dias e nove em 14 d.a.i. Efetores membros de uma mesmo tribo apresentaram o mesmo pico de expressão, indicando que estão envolvidos em funções semelhantes durante a infecção e são expressos em ondas sequenciais de expressão. Tal fato também foi observado por Wang et al. (2011), no qual uma classe de efetores denominada *early effectors* foi mais expressa 12 h.a.i e a classe de *immediate-early effectors* foi mais expressa no intervalo 0 – 6 h.a.i.

A tendência de diferença da expressão dos candidatos a efetores entre as duas populações observada nesse estudo pode indicar que conjuntos específicos de efetores tenham sido selecionados ao longo da evolução e serem diferencialmente expressos de acordo com o hospedeiro, já que a interação patógeno-hospedeiro é altamente específica (Duplessis et al, 2011). A provável modulação da expressão gênica pelo hospedeiro de origem verificada neste trabalho, também foi observada por Quecine et al. (2016) na análise de proteínas presentes nos uredósporos de populações provenientes de goiaba (PpGuava) e eucalipto (PpEucalyptus). Proteínas de virulência e resposta a estresse são mais encontradas em PpGuava, sugerindo que a população esteja sobre maiores condições de estresse. Além disso, uma maior abundância de proteínas totais e únicas foi detectada em PpGuava, que pode estar correlacionado a maior diversidade genética encontrada nessa população (Quecine et al., 2014). Por outro lado, proteínas relacionadas a biogênese, montagem e tradução de proteínas foram mais abundantes na PpEucalyptus, as quais são utilizadas no processamento das proteínas de virulência. Os dados indicam uma provável modulação da

expressão gênica de acordo com o hospedeiro e é suportada pela variabilidade fisiológica detectada nas populações.

Diferença de expressão de conjuntos de efetores tem sido observada até mesmo quando uma mesma população do patógeno é inoculada em diferentes genótipos de hospedeiros de uma mesma espécie. Porto (2016) analisou a expressão de candidatos a efetores *H. vastatrix* (EHv33) nos genótipos resistente e suscetível de cafeeiro, e verificou um maior número de EHv33 expressos durante a interação compatível, além de valores menores durante a interação incompatível. Os dados sugerem que o fungo seleciona conjuntos de efetores dependendo do genótipo envolvido no processo de infecção.

Apesar do trabalho ter sido realizado *in vitro*, foi possível observar a expressão diferencial em determinados tempos, o que fornece uma visão inicial de como esses efetores atuam na interação planta-patógeno. Com exceção dos candidatos 00755 e 60547, os demais foram diferencialmente expressos em algum dos tempos analisados e necessitam ser validados *in planta* para, posteriormente, serem caracterizados funcionalmente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente pesquisa foi investigado o reportório de genes candidatos a efetores de *A. psidii*, obtendo-se 3.907 candidatos. Todos esses candidatos apresentam o peptídeo sinal, ausência de domínio transmembrana e sinal de ancoragem, tamanho entre 45-414 aminoácidos, com tamanho médio de 71 aminoácidos. Dos 3.907 candidatos, 1.021 tinham sido previamente anotados como elementos de transposição (729) ou com classificações proteicas específicas (292). A presença de elementos transponíveis preditos como candidatos a efetores podem indicar a presença de TEs dentro de potenciais candidatos, demonstrando a contínua evolução em que estes genes estão expostos, entretanto devem ser investigados futuramente, assim como os candidatos anotados com funções enzimáticas e inibidoras.

Os 2.886 candidatos restantes foram anotados como proteínas hipotéticas ou não anotadas. Dos 419 candidatos descritos como hipotéticos, 90% apresentaram similaridade com *P. graminis* e *M. larici-populina*, sendo considerados conservados em Pucciniales, enquanto os 2.467 candidatos não anotados foram considerados exclusivos de *A. psidii*. Por meio da predição de localização subcelular a maior parte dos candidatos foram preditos como apoplásticos, os quais são essenciais para patógenos biotróficos. Valores relevantes de candidatos foram encontrados para as categorias nuclear e cloroplastidial.

Por meio da análise de expressão, dois candidatos não apresentaram perfil de efector, não sendo diferencialmente expresso em nenhum dos tempos analisados, entretanto a experimentação *in vitro* pode afetar esses resultados. Um desses efetores possui como alvo o cloroplasto do hospedeiro, assim, esse candidato pode ser expresso em tempos mais tardios e/ou necessitar do estímulo da planta. Seis candidatos foram diferencialmente expressos nos tempos iniciais (6 e 12 h.a.i.) que correspondem a formação dos tubos germinativos e primeiros apressórios. Com exceção de 27121 (predito como nuclear) os demais cinco candidatos foram preditos como apoplásticos, corroborando os dados de expressão encontrados.

Foram detectadas tendências no perfil de expressão entre as duas populações de *A. psidii* estudadas. O candidato 00372 apresentou aumento gradativo em todos os tempos analisados para MF-1 enquanto para GM-J1 esse aumento ocorre até 12 h.a.i. Os candidatos 15800 e 00732 apresentaram diminuição gradativa de expressão para MF-1, enquanto para GM-J1 houve um aumento no tempo 12 h.a.i. Para o candidato 127358 houve expressão diferencial no intervalo 0-12h para MF-1, enquanto em GM-J1 o gene não foi diferencialmente expresso.

Apesar do trabalho ter sido realizado *in vitro*, trata-se do primeiro estudo a caracterizar candidatos a efetores de *A. psidii*, por meio do qual foi possível observar a expressão diferencial dos candidatos em determinados tempos e uma provável modulação pelo hospedeiro de origem. Tais dados fornecem uma visão inicial de como esses efetores atuam na interação planta-patógeno e necessitam ser validados *in planta* para posterior caracterização funcional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramovitch, R. B., Janjusevic, R., Stebbins, C. E., and Martin, G. B. 2006. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2851-2856.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th eds. Elsevier Academic Press, USA.
- AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.
http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Mafia, R. G., and Assis, T. F. 2009. Doenças causadas por agentes bióticos ou infecciosos. Pages 199-301 in: *Clonagem e Doenças do Eucalipto*. A. C. Alfenas, E. A. V. Zauza, R. G. Mafia, and T. F. Assis, eds. Editora UFV, Viçosa-MG, Brazil.
- Andrade, E. N. D. 1961. *O eucalipto*. Companhia Paulista de Estrada de Ferro, São Paulo.
- Auer, C. G., dos Santos, A. I., and Furtado, E. L. 2016. Doenças do eucalipto Pages 359-372 in: *Manual de Fitopatologia*, L. Amorim, J. M. A. Rezende, A. Bergamim-Filho, and L. E. A. Camargo, eds. Editora Ceres. Piracicaba-SP, Brazil.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J. Y., Li, W. W., and Noble, W. S. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* 37:W202-W208.
- Baxter, L., Tripathy, S., Ishaque, N., Boot, N., Cabral, A., Kemen, E., Thines, M., Ah-Fong, A., Anderson, R., Badejoko, W., Bittner-Eddy, P., Boore, J. L., Chibucos, M. C., Coates, M., Dehal, P., Delehaunty, K., Dong, S. M., Downton, P., Dumas, B., Fabro, G., Fronick, C., Fuerstenberg, S. I., Fulton, L., Gaulin, E., Govers, F., Hughes, L., Humphray, S., Jiang, R. H. Y., Judelson, H., Kamoun, S., Kyung, K., Meijer, H., Minx, P., Morris, P., Nelson, J., Phuntumart, V., Qutob, D., Rehmany, A., Rougon-Cardoso, A., Ryden, P., Torto-Alalibo, T., Studholme, D., Wang, Y. C., Win, J., Wood, J., Clifton, S. W., Rogers, J., Van den Ackerveken, G., Jones, J. D. G., McDowell, J. M., Beynon, J., and Tyler, B. M. 2010. Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Genome. *Science* 330:1549-1551.
- Beck, M., Heard, W., Mbengue, M., and Robatzek, S. 2012. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* 15:367-374.
- Beenken, L. 2017. Austropuccinia: a new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). *Phytotaxa* 297:53-61.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340:783-795.
- Bini, A. P. 2016. Estudo molecular do desenvolvimento de *Puccinia psidii* Winter *in vitro* e no processo de infecção em *Eucalyptus grandis*. Thesis. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.
- Birch, P. R. J., Boevink, P. C., Gilroy, E. M., Hein, I., Pritchard, L., and Whisson, S. C. 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 11:373-379.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406.

- Boller, T., and He, S. Y. 2009. Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324:742-744.
- Bos, J. I. B., Kanneganti, T. D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M. R., Birch, P. R. J., and Kamoun, S. 2006. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* 48:165-176.
- Caillaud, M. C., Piquerez, S. J. M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J. D. G. 2012. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. *Plant Journal* 69:252-265.
- Castro, H. A., Krugner, T. L., Ideriha, C. H. F., Cappello, M. S. C., and Marchi, A. B. 1983 Cross-inoculation of *Eucalyptus*, guava (*Psidium guajava*), and rose apple (*Syzygium jambos*) with *Puccinia psidii*. *Fitopatologia Brasileira* 8, 491-497.
- Cantu, D., Govindarajulu, M., Kozik, A., Wang, M. N., Chen, X. M., Kojima, K. K., Jurka, J., Michelmore, R. W., and Dubcovsky, J. 2011. Next Generation Sequencing Provides Rapid Access to the Genome of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the Causal Agent of Wheat Stripe Rust. *Plos One* 6:e24230.
- Cantu, D., Segovia, V., MacLean, D., Bayles, R., Chen, X. M., Kamoun, S., Dubcovsky, J., Saunders, D. G. O., and Uauy, C. 2013. Genome analyses of the wheat yellow (stripe) rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveal polymorphic and haustorial expressed secreted proteins as candidate effectors. *BMC Genomics* 14:270.
- Carnegie, A. J., and Lidbetter, J. R. 2012. Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. *Australasian Plant Pathology* 41:13-29.
- Carnegie, A. J., Lidbetter, J. R., Walker, J., Horwood, M. A., Tesoriero, L., Glen, M., and Priest, M. J. 2010. *Uredo rangeli*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on Myrtaceae in Australia. *Australasian Plant Pathology* 39:463-466.
- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ayliffe, M. A., and Ellis, J. G. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18:243-256.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., Guo, W. J., Kim, J. G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B., and Frommer, W. B. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468:527-532.
- Coll, N., Epple, P., and Dangl, J. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell death and differentiation* 18:1247-1256.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676.
- Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C., and Crous, P. W. 1998. Eucalyptus rust: A disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease* 82:819-825.
- Dalio, R. J. D., Magalhães, D. M., Atilio, L. B., Rodrigues, C. M., Breton, M. C., Pichi, S., Pascholati, S. F., Machado, M. A. 2014. Efetores na interação planta-patógeno. *Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo* 22:25-68.

- Damasceno, C. M. B., Bishop, J. G., Ripoll, D. R., Win, J., Kamoun, S., and Rose, J. K. C. 2008. Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *Phytophthora* species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:820-830.
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., and Staskawicz, B. J. 2013. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science* 341:746-751.
- Da Silva, R. R. 2010. Identificação de genes que codificam proteínas secretadas por *Puccinia psidii*, agente etiológico da ferrugem das mirtáceas. Dissertation. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
- De Carvalho, A. D. O., Alfenas, A. C., Maffia, L. A., and do Carmo, M. G. F. 1998. Resistência de espécies, progênes e procedências de Eucalyptus à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33:139-147.
- De Carvalho, M., Nascimento, L. C., Darben, L. M., Polizel-Podanosqui, A. M., Lopes-Caitar, V. S., Qi, M. S., Rocha, C. S., Carazzolle, M. F., Kuwahara, M. K., Pereira, G. A. G., Abdelnoor, R. V., Whitham, S. A., and Marcelino-Guimaraes, F. C. 2017. Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. *Molecular Plant Pathology* 18:363-377.
- De Jonge, R., Bolton, M. D., and Thomma, B. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 14:400-406.
- De Souza, T. A., Soprano, A. S., de Lira, N. P. V., Quaresma, A. J. C., Pauletti, B. A., Leme, A. F. P., and Benedetti, C. E. 2012. The TAL Effector PthA4 Interacts with Nuclear Factors Involved in RNA-Dependent Processes Including a HMG Protein That Selectively Binds Poly (U) RNA. *Plos One* 7: e32305.
- De Wit, P. 2016. Apoplastic fungal effectors in historic perspective; a personal view. *New Phytologist* 212:805-813.
- Dianese, J. C., Moraes, T. S. D., and Silva, A. R. 1984. Response of eucalyptus species to field infection by *Puccinia psidii*. *Plant Disease* 68:314-316.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Amann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., and Kahmann, R. 2009. Pep1, a Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis*, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. *Plos Pathogens* 5: e1000290.
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Jiang, R. H., Bruce, N. A., Arredondo, F. D., Zhang, X., and Tyler, B. M. 2008. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *The Plant Cell* 20:1930-1947.
- Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y. C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D. L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B. L., Chiu, R., Coutinho, P. M., Feau, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M. G., Kodira, C. D., Kohler, A., Kues, U., Lindquist, E. A., Lucas, S. M., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J. L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Salamov, A. A., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G. A., Henrissat, B., Van de Peer, Y., Rouze, P., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Schein, J. E., Zhong, S. B., Hamelin, R. C., Grigoriev, I. V., Szabo, L. J., and Martin, F. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:9166-9171.

- Ellis, J. G., Rafiqi, M., Gan, P., Chakrabarti, A., and Dodds, P. N. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 12:399-405.
- Fankhauser, N., and Maser, P. 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics* 21:1846-1852.
- FAO, 2015. Global Forest Resources Assessment 2015: How are the world's forests changing? <http://www.fao.org/3/a-i4793e.pdf>
- Fernandez, D., Tisserant, E., Talhinhas, P., Azinheira, H., Vieira, A., Petitot, A. S., Loureiro, A., Poulain, J., Da Silva, C., Silva, M. D. C., and Duplessis, S. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. *Molecular Plant Pathology* 13:17-37.
- Ferreira, F. 1983. Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore* 7:92-109.
- Ferreira, R. B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C. N., Chen, Z. J., Batista, L. M., Duarte, J., Borges, A., and Teixeira, A. R. 2006. Fungal pathogens: The battle for plant infection. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:505-524.
- Figueiredo, M., and Passador, M. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. 2008. *Arq. Inst. Biol.* 75:117-134.
- Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J., and Bateman, A. 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44:D279-D285.
- Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275–296.
- Franceschetti, M., Maqbool, A., Jimenez-Dalmaroni, M. J., Pennington, H. G., Kamoun, S., and Banfield, M. J. 2017. Effectors of Filamentous Plant Pathogens: Commonalities amid Diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81: e00066-16.
- Fu, Z. Q., Guo, M., Jeong, B. R., Tian, F., Elthon, T. E., Cerny, R. L., Staiger, D., and Alfano, J. R. 2007. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* 447:284-U281.
- Giblin, F. 2013. Myrtle rust report: New Caledonia. Assessment of myrtle rust situation in New Caledonia. University of the Sunshine Coast Maroochydore, Queensland.
- Glen, M., Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Wingfield, M. J., and Mohammed, C. 2007. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy a review. *Australasian Plant Pathology* 36:1-16.
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., and Thordal-Christensen, H. 2010. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* 11:317.
- Gohre, V., and Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* 46: 189-215
- Goldberg, T., Hecht, M., Hamp, T., Karl, T., Yachdav, G., Ahmed, N., Altermann, U., Angerer, P., Ansoerge, S., Balasz, K., Bernhofer, M., Betz, A., Cizmadija, L., Do, K. T., Gerke, J., Greil, R., Joerdens, V., Hastreiter, M., Hembach, K., Herzog, M., Kalemanov, M., Kluge, M., Meier, A., Nasir, H., Neumaier, U., Prade, V., Reeb, J., Sorokoumov, A., Troshani, I., Vorberg, S., Waldraff, S., Zierer, J., Nielsen, H., and Rost, B. 2014. LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Research* 42:W350-W355.

- Graça, R. N., Ross-Davis, A. L., Klopfenstein, N. B., Kim, M. S., Peever, T. L., Cannon, P. G., Aun, C. P., Mizubuti, E. S., and Alfenas, A. C. 2013. Rust disease of eucalypts, caused by *Puccinia psidii*, did not originate via host jump from guava in Brazil. *Molecular ecology* 22:6033-6047.
- Hacquard, S., Joly, D. L., Lin, Y. C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legue, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van de Peer, Y., Rouze, P., Martin, F., Hamelin, R. C., and Duplessis, S. 2012. A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identifies Candidate Effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar Leaf Rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:279-293.
- Hennen, J. F., Figueiredo, M. B., de Carvalho Jr, A. A., and Hennen, P. G. 2005. Catalogue of the species of plant rust fungi (Uredinales) of Brazil. Instituto de Pesquisas, Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Brazil.
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R., and Kamoun, S. 2009. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:115-122.
- Holub, E. B., and Cooper, A. 2004. Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. *Trends in Plant Science* 9:211-214.
- Howden, A. J. M., and Huitema, E. 2012. Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity. *Frontiers in Plant Science* 3:1-6.
- IBÁ, 2015. Relatório estatístico Indústria Brasileira de Árvores. http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., and Stebbins, C. E. 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311:222-226.
- Jashni, M. K., Dols, I. H. M., Iida, Y., Boeren, S., Beenen, H. G., Mehrabi, R., Collemare, J., and de Wit, P. 2015. Synergistic Action of a Metalloprotease and a Serine Protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Cleaves Chitin-Binding Tomato Chitinases, Reduces Their Antifungal Activity, and Enhances Fungal Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:996-1008.
- Jiang, R. H. 2011. Dynamics of effectors in host–pathogen interactions. *Mycology* 2:210-217.
- Jiang, R. H. Y., Tripathy, S., Govers, F., and Tyler, B. M. 2008. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:4874-4879.
- Joffily, J. 1944. Ferrugem do eucalipto. *Bragantia* 4:475-48.
- Jones, D. A., and Takemoto, D. 2004. Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* 16:48-62.
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Joosten, M., Vogelsang, R., Cozijnsen, T. J., Verberne, M. C., and De Wit, P. 1997. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *The Plant Cell* 9:367-379.
- Junghans, D. T. 2000. Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*. Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Kamoun, S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 44:41-60.

- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R. T. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:1130-1139.
- Kleemann, J., Takahara, H., Stuber, K., and O'Connell, R. 2008. Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags. *Microbiology* 154:1204-1217.
- Kolmer, J. A., Ordonez, M. E., and Groth, J. V. 2009. The Rust Fungi. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Kong, G. H., Zhao, Y., Jing, M. F., Huang, J., Yang, J., Xia, Y. Q., Kong, L., Ye, W. W., Xiong, Q., Qiao, Y. L., Dong, S. M., Ma, W. B., and Wang, Y. C. 2015. The Activation of *Phytophthora* Effector Avr3b by Plant Cyclophilin is Required for the Nudix Hydrolase Activity of Avr3b. *Plos Pathogens* 11: e1005139.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305:567-580.
- Lee, A. H. Y., Hurley, B., Felsensteiner, C., Yea, C., Ckurshumova, W., Bartetzko, V., Wang, P. W., Quach, V., Lewis, J. D., Liu, Y. L. C., Bornke, F., Angers, S., Wilde, A., Guttman, D. S., and Desveaux, D. 2012. A Bacterial Acetyltransferase Destroys Plant Microtubule Networks and Blocks Secretion. *Plos Pathogens* 8: e1002523.
- Lee, S. J., Kelley, B. S., Damasceno, C. M. B., John, B. S., Kim, B. S., Kim, B. D., and Rose, J. K. C. 2006. A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1368-1377.
- Leite, T.F. 2012. Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter por meio da técnica de RNA-Seq. Thesis. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.
- Link, T. I., and Voegelé, R. T. 2008. Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Molecular Plant Pathology* 9:59-66.
- Link, T. I., Lang, P., Scheffler, B. E., Duke, M. V., Graham, M. A., Cooper, B., Tucker, M. L., Van De Mortel, M., Voegelé, R. T., Mendgen, K., Baum, T. J., and Whitham, S. A. 2014. The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families. *Molecular Plant Pathology* 15:379-393.
- Lodish, H. 2012. *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Luderer, R., Takken, F. L. W., de Wit, P., and Joosten, M. 2002. *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Molecular Microbiology* 45:875-884.
- Ma, Y., Walker, R. K., Zhao, Y. C., and Berkowitz, G. A. 2012. Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:19852-19857.
- Machado, P. D., Glen, M., Pereira, O. L., Silva, A. A., and Alfenas, A. C. 2015. Epitypification of *Puccinia psidii*, Causal Agent of Guava Rust. *Tropical Plant Pathology* 40:5-12.
- MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Toth, R., Nicolaisen, M., and Hogenhout, S. A. 2011. Phytoplasma Effector SAP54 Induces Indeterminate Leaf-Like Flower Development in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology* 157:831-841.

- McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S. C., Beynon, J. L., and Birch, P. R. 2013. An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription factors from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *PLoS pathogens* 9:e1003670.
- McTaggart, A. R., Roux, J., Granados, G. M., Gafur, A., Tarrigan, M., and Santhakumar, W. M. J. 2016 Rust (*Puccinia psidii*) recorded in Indonesia poses a threat to forests and forestry in southeast Asia. *Australas Plant Path* 45:83–89.
- McTaggart, A., Shuey, L., Granados, G., du Plessis, E., Fraser, S., Barnes, I., Naidoo, S., Wingfield, M., and Roux, J. 2017. Evidence that *Austropuccinia psidii* may complete its sexual life cycle on Myrtaceae. *Plant Pathology* doi: 10.1111/ppa.12763.
- Masson, M. V. 2009. Ferrugem do eucalipto: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico. Dissertation. Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, Brazil.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A. 1997. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.
- Mesarich, C. H., Griffiths, S. A., van der Burgt, A., Okmen, B., Beenen, H. G., Etalo, D. W., Joosten, M., and de Wit, P. 2014. Transcriptome Sequencing Uncovers the Avr5 Avirulence Gene of the Tomato Leaf Mold Pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:846-857.
- Montesinos, E. 2003. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. *International Microbiology* 6:221-223.
- Morin, L., Talbot, M. J., and Glen, M. 2014. Quest to elucidate the life cycle of *Puccinia psidii* sensu lato. *Fungal Biology* 118:253-263.
- Nemri, A., Saunders, D. G. O., Anderson, C., Upadhyaya, N. M., Win, J., Lawrence, G. J., Jones, D. A., Kamoun, S., Ellis, J. G., and Dodds, P. N. 2014. The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. *Frontiers in Plant Science* 5:1-14.
- Oh, S. K., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Win, J., Bos, J. I. B., Liu, H. Y., van Damme, M., Morgan, W., Choi, D., Van der Vossen, E. A. G., Vleeshouwers, V., and Kamoun, S. 2009. In Planta Expression Screens of *Phytophthora infestans* RXLR Effectors Reveal Diverse Phenotypes, Including Activation of the Solanum bulbocastanum Disease Resistance Protein Rpi-blb2. *Plant Cell* 21:2928-2947.
- Obwald, W., Fleischmann, F., Rigling, D., Coelho, A. C., Cravador, A., Diez, J., Dalio, R. J., Jung, M. H., Pfanz, H., Robin, C., Sipos, G., Solla, A., Cech, T., Chambery, A., Diamandis, S., Hansen, E., Jung, T., Orlikowski, L. B., Parke, J., Prospero, S., and Werres, S. 2014. Strategies of attack and defence in woody plant-Phytophthora interactions. *Forest Pathology* 44:169-190.
- Panstruga, R., and Dodds, P. N. 2009. Terrific Protein Traffic: The Mystery of Effector Protein Delivery by Filamentous Plant Pathogens. *Science* 324:748-750.
- Pascholati, S. F. (2011). Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. Pages 543-589 in: Manual de Fitopatologia., L. Amorim, J. M. A. Rezende, and A. Bergamim-Filho, eds. Editora Ceres. Piracicaba-SP, Brazil.
- Pereira, J. C. D. Sturion, J. A., Higa, A. R., Higa, R. C. V., and Shimizu, J. Y. 2000. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Embrapa Florestas, Colombo, PR.

- Pereira, A. L. A., Carazzolle, M. F., Abe, V. Y., de Oliveira, M. L. P., Domingues, M. N., Silva, J. C., Cernadas, R. A., and Benedetti, C. E. 2014. Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response. *Bmc Genomics* 15:157.
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2015. Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Target Diverse Plant Cell Compartments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:689-700.
- Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G. O., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2016. Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. *Cellular Microbiology* 18:453-465.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45.
- Porto, B. N. 2016. Sequenciamento do genoma e identificação de candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix*. Thesis. Universidade Estadual de Lavras, Lavras, Brazil.
- Povolotskaya, I. S., and Kondrashov, F. A. 2010. Sequence space and the ongoing expansion of the protein universe. *Nature* 465:922-926.
- Quecine, M. C., Moon, D. H., Franceschini, L. V., Bini, A. L., Leite, T. F., and Labate, C. A. 2012. De novo partial genome assembly of the biotrophic eucalyptus rust pathogen *Puccinia psidii*. In: XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interaction, Kioto, Japão.
- Quecine, M. C., Bini, A. P., Romagnoli, E. R., Andreote, F. D., Moon, D. H., and Labate, C. A. 2014. Genetic Variability in *Puccinia psidii* Populations as Revealed by PCR-DGGE and T-RFLP Markers. *Plant Disease* 98:16-23.
- Quecine, M. C., Leite, T. F., Bini, A. P., Regiani, T., Franceschini, L. M., Budzinski, I. G. F., Marques, F. G., Labate, M. T. V., Guidetti-Gonzalez, S., Moon, D. H., and Labate, C. A. 2016. Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of *Puccinia psidii* Uredospores Reveals Differences of Fungal Populations Infecting Eucalyptus and Guava. *Plos One* 11: e0145343.
- Rep, M., van der Does, H. C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., de Koster, C. G., and Cornelissen, B. J. C. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology* 53:1373-1383.
- Resende, M. L. V., Salgado, S. M., and Chaves, Z. M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28:123-130.
- Rodriguez-Herva, J. J., Gonzalez-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antunez-Lamas, M., Rio-Alvarez, I., Li, Z., Lopez-Torrejón, G., Diaz, I., del Pozo, J. C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodriguez-Palenzuela, P., and Lopez-Solanilla, E. 2012. A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cellular Microbiology* 14:669-681.
- Rooney, H. C. E., van 't Klooster, J. W., van der Hoorn, R. A. L., Joosten, M., Jones, J. D. G., and de Wit, P. 2005. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308:1783-1786.
- Roux, J., Greyling, I., Coutinho, T. A., Verleur, M., and Wingfield, M. J. 2013. The Myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. *Ima Fungus* 4:155-159.

- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balague, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., and Raffaele, S. 2014. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* 15:427-432.
- Ruiz, R., Alfenas, A., Maffia, L., and Barbosa, M. d. M. 1989. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* 14:73-81.
- Santos, C. 2006. Estudos epidemiológicos da ferrugem do eucalipto causado por *Puccinia psidii* em plantios irrigados. Dissertation. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, Brazil.
- Saunders, D. G. O., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., and Raffaele, S. 2012. Using Hierarchical Clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *Plos One* 7: e29847.
- Schorneck, S., van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E. 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:17421-17426.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chinthia, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., and van der Hoorn, R. A. L. 2008. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related Cys proteases of tomato. *Plant Cell* 20:1169-1183.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J. E., and Innes, R. W. 2003. Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301:1230-1233.
- Simpson, J. A., Thomas, K., and Grgurinovic, C. A. 2006. Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. *Australasian Plant Pathology* 35:549-562.
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Dodds, P. N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K. B., Manners, J. M., and Taylor, J. M. 2016. EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist* 210:743-761.
- Stukenbrock, E. H., and McDonald, B. A. 2008 The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 46:75–100.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67:257-268.
- Sugio, A., Kingdom, H. N., MacLean, A. M., Grieve, V. M., and Hogenhout, S. A. 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:E1254-E1263.
- Takahashi, S. S. 2002. Ferrugem do eucalipto: índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados a intensidade da doença no campo. Dissertation. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, Brazil.
- Talhinhas, P., Azinheira, H. G., Vieira, B., Loureiro, A., Tavares, S., Batista, D., Morin, E., Petitot, A. S., Paulo, O. S., Poulain, J., Da Silva, C., Duplessis, S., Silva, M. D., and Fernandez, D. 2014. Overview of the functional virulent genome of the coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* with an emphasis on early stages of infection. *Frontiers in Plant Science* 5:1-17.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.

- Tan, M.-K., Collins, D., Chen, Z., Englezou, A., and Wilkins, M. R. 2014. A brief overview of the size and composition of the myrtle rust genome and its taxonomic status. *Mycology* 5:52-63.
- Tessmann, D. J., and Dianese, J. C. 2002. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. *Fitopatologia Brasileira* 27:538-542.
- Tian, M. Y., Huitema, E., da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., and Kamoun, S. 2004. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *Journal of Biological Chemistry* 279:26370-26377.
- Tian, M. Y., Benedetti, B., and Kamoun, S. 2005. A second kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiology* 138:1785-1793.
- Tian, M. Y., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E., and Kamoun, S. 2007. A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiology* 143:364-377.
- Torres-Zabala, M. D., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., Tillich, M., Licht, D., Bolter, B., Delfino, L., Truman, W., Mansfield, J., Smirnoff, N., and Grant, M. 2015. Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature Plants* 1:1-10.
- Torto, T. A., Li, S. A., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N. A. R., van West, P., and Kamoun, S. 2003. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Research* 13:1675-1685.
- Tsuda, K., and Katagiri, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13:459-465.
- Tsui, S. 2015. Estudo dos elementos transponíveis em *Puccinia psidii* Winter, agente causal da ferrugem em *Eucalyptus* spp. Dissertation. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.
- Van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cakir, C., Schornack, S., Sklenar, J., Jones, A. M. E., and Kamoun, S. 2012. The Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora infestans* Translocates the CRN8 Kinase into Host Plant Cells. *Plos Pathogens* 8: e1002875.
- Van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M., Vervoort, J., and de Wit, P. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1420-1430.
- Van Poppel, P., Jiang, R. H. Y., Sliwka, J., and Govers, F. 2009. Recognition of *Phytophthora infestans* Avr4 by potato R4 is triggered by C-terminal domains comprising W motifs. *Molecular Plant Pathology* 10:611-620.
- Van den Ackerveken, G., Dunn, R. M., Cozijnsen, A. J., Vossen, J., Vandenbroek, H. W. J., and Dewit, P. 1994. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular & General Genetics* 243:277-285.
- Vleeshouwers, V., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S. K., Wang, M. Q., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., Govers, F., Kamoun, S., and Van der Vossen, E. A. G. 2008. Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and *Phytophthora Infestans* Avirulence Genes. *Plos One* 3: e2875.

- Wang, C. I. A., Guncar, G., Forwood, J. K., Teh, T., Catanzariti, A. M., Lawrence, G. J., Loughlin, F. E., Mackay, J. P., Schirra, H. J., Anderson, P. A., Ellis, J. G., Dodds, P. N., and Kobe, B. 2007. Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and -D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity. *Plant Cell* 19:2898-2912.
- Wang, Q. Q., Han, C. Z., Ferreira, A. O., Yu, X. L., Ye, W. W., Tripathy, S., Kale, S. D., Gu, B. A., Sheng, Y. T., Sui, Y. Y., Wang, X. L., Zhang, Z. G., Cheng, B. P., Dong, S. M., Shan, W. X., Zheng, X. B., Dou, D. L., Tyler, B. M., and Wang, Y. C. 2011. Transcriptional Programming and Functional Interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR Effector Repertoire. *Plant Cell* 23:2064-2086.
- Wernersson, R. 2006. Virtual Ribosome - a comprehensive DNA translation tool with support for integration of sequence feature annotation. *Nucleic Acids Research* 34:W385-W388.
- Win, J., Kamoun, S., and Jones, A. M. 2011. Purification of effector–target protein complexes via transient expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant immunity: methods and protocols* 712:181-194.
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., and Hogenhout, S. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. Pages 235-247 in: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wietholter, N., Horn, S., Reisinger, K., Beike, U., and Moerschbacher, B. M. 2003. In vitro differentiation of haustorial mother cells of the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, triggered by the synergistic action of chemical and physical signals. *Fungal Genet Biol.* 38: 320–326.
- Xavier, A. A., Alfenas, A. C., Matsuoka, K., and Hodges, C. S. 2001. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 30:277-281.
- Zipfel, C., and Robatzek, S. 2010. Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity: Veni, Vidi ... ? *Plant Physiology* 154:551-554

ANEXOS

ANEXO A. Concentração (em ng/ μ l) e valores das razões 260/280 e 260/260 determinados pelo equipamento nanodrop2000 do RNA das amostras do experimento com uredósporos de MF-1.

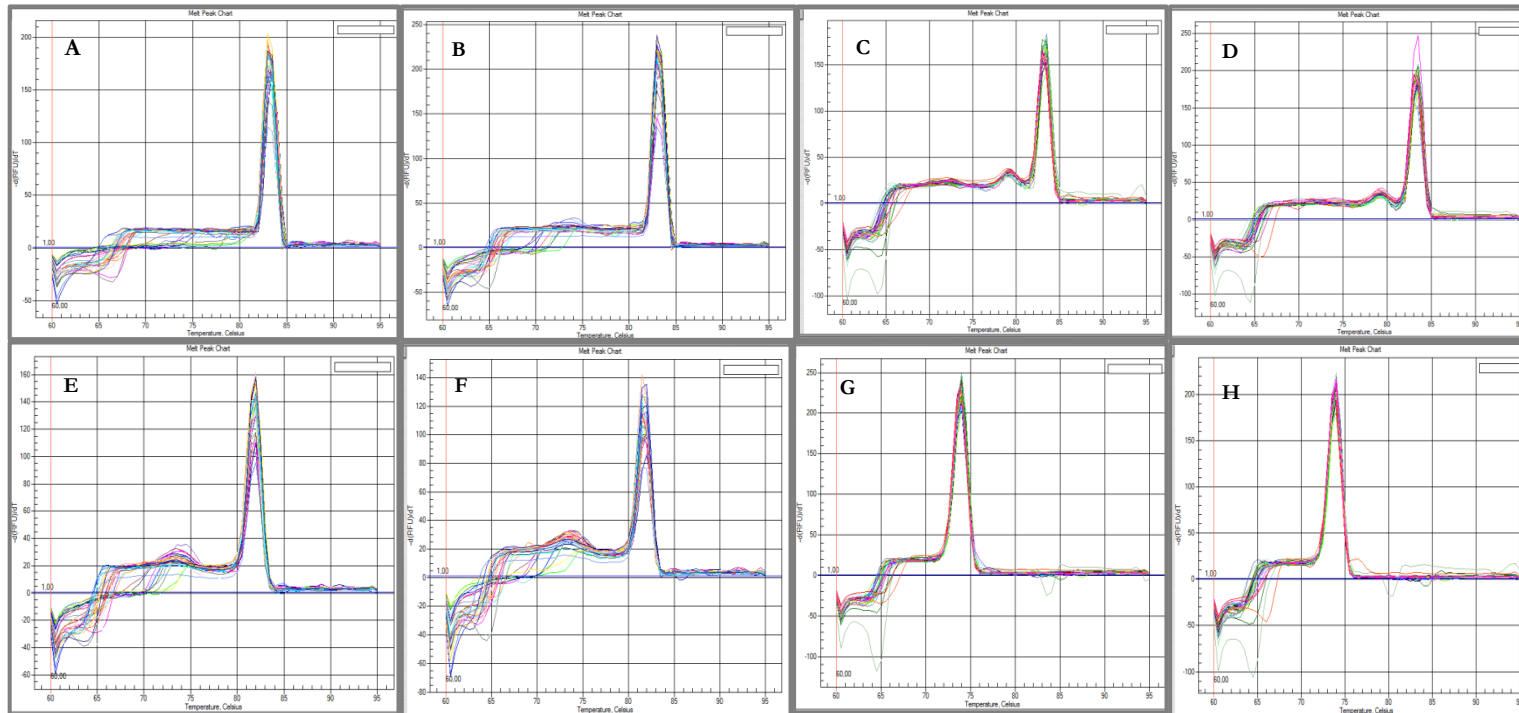
AMOSTRA	Concentração (ng/ μ l)	260/280	260/230
0HS1	181,8	2,26	2,25
0HS2	179,2	2,27	2,3
0HS3	163,1	2,25	1,6
0HS4	62,5	2,27	2,33
6HS1	126,6	2,29	1,82
6HS2	108,2	2,27	2,31
6HS3	65,9	2,28	1,82
6HS4	80,0	2,29	2,45
12HS1	222,1	2,29	2,45
12HS2	69,5	2,31	1,46
12HS3	49,1	2,25	2,19
12HS4	54,6	2,23	2,28
24HS1	139,8	2,27	2,05
24HS2	139,2	2,28	2,39
24HS3	50,4	2,24	2,17
24HS4	26,4	2,26	1,98

ANEXO B. Concentração (em ng/ μ l) e valores das razões 260/280 e 260/260 determinados pelo equipamento nanodrop2000 do RNA das amostras do experimento com uredósporos de GM-J1.

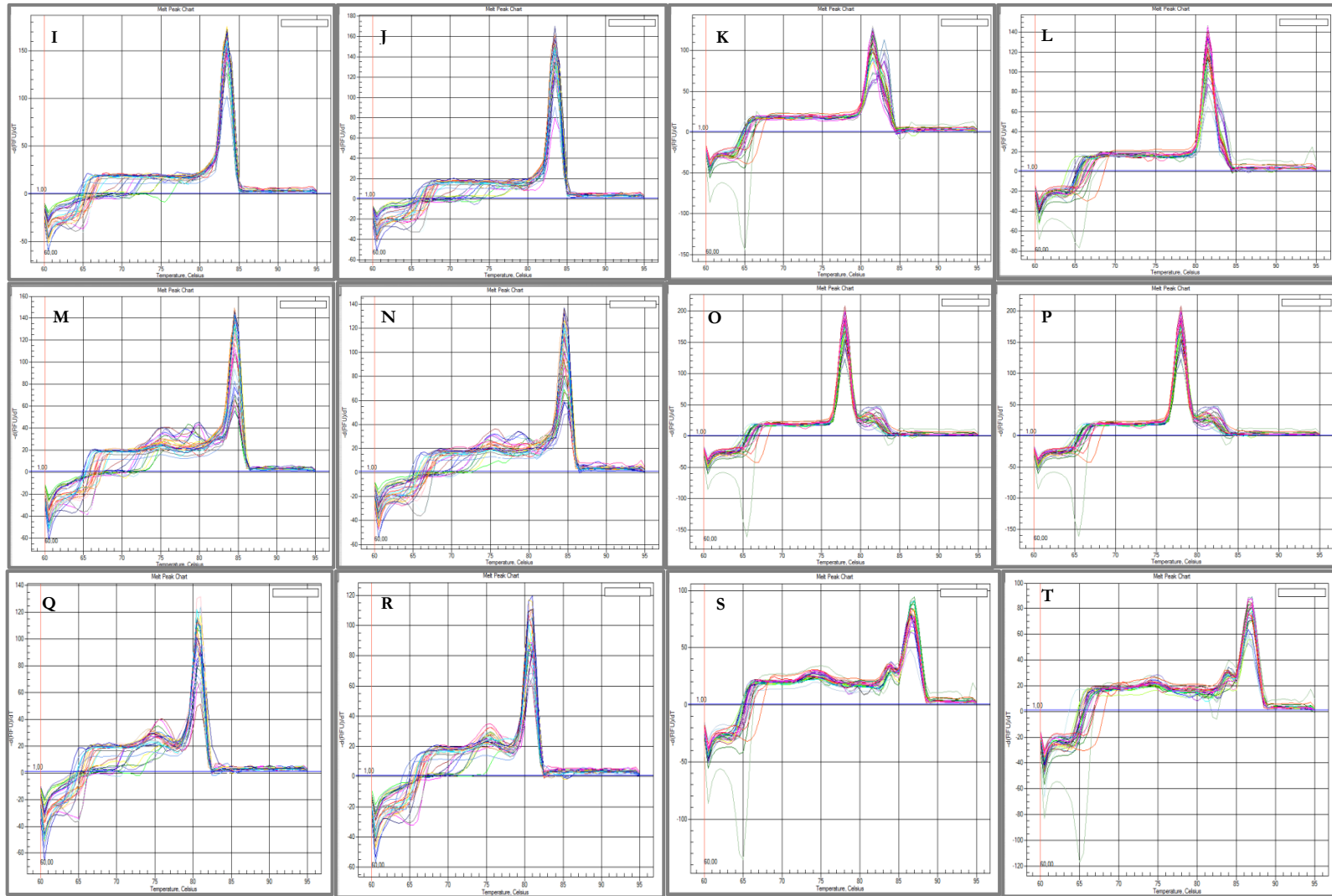
AMOSTRA	Concentração (ng/ μ l)	260/280	260/230
0HS1	218,7	2,28	2,47
0HS2	222,1	2,29	2,56
0HS3	205,7	2,28	1,86
0HS4	39,2	2,29	1,5
6HS1	209,5	2,26	2,47
6HS2	216,1	2,27	2,33
6HS3	247,7	2,27	2,42
6HS4	154,3	2,27	1,84
12HS1	174,8	2,27	1,36
12HS2	63,6	2,27	1,35
12HS3	218,1	2,27	2,51
12HS4	147,1	2,27	2,11
24HS1	262,8	2,27	2,29
24HS2	95,9	2,28	1,73
24HS3	193,1	2,27	2,19
24HS4	108,4	2,28	2,29

ANEXO C. Picos de dissociação ou *melting* dos genes endógenos e candidatos. A e B: endógeno Betatub (83°C); C e D: endógeno EF (83,5°C); E e F: 00372 (82°C); G e H: 00755 (74°C); I e J: 15800 (83,5°C); K e L: 00732 (81,5°C); M e N: 27121 (84,5°C); O e P: 127358 (78,0°C); Q e R: 36972 (80,5°C); S e T: 60547 (86,5°C). A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S correspondem aos *meltings* das amostras de RNA extraídas do isolado monopoultular MF-1, enquanto B, D, F, H, J, L, N, P, R e T referem-se aos *meltings* obtidos com amostras de RNA extraídas de esporos de GM-J1.

(Continua)



(Conclusão)



ANEXO D. Valores médios de CTs para cada gene candidato e para ambos os experimentos (uredósporos de MF-1 x uredósporos de GM-J1).

Biológicas	BETA		EF		00372		00755		15800		00732		27121		127358		36972		60547	
	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1	MF-1	GM-J1
0hS1	19,8	19,8	20,3	19,2	25,6	26,1	23,7	23,4	15,1	13,5	26,2	25,2	30,6	29,7	24,6	25,4	31,0	31,8	24,8	23,7
0hS2	19,7	23,0	20,8	20,0	25,7	26,0	23,0	23,8	15,2	14,8	25,6	25,4	29,7	29,1	23,9	25,6	31,4	31,6	22,9	24,6
0hS3	20,7	19,3	21,6	19,8	26,5	26,4	24,8	24,2	15,8	15,2	27,7	25,9	30,5	28,7	25,5	25,8	32,3	32,7	26,4	24,8
0hS4	20,6	22,6	21,7	24,0	26,1	25,2	24,2	24,6	15,2	15,9	27,4	26,5	30,3	30,0	25,0	26,3	32,3	32,3	25,9	26,5
6hS1	19,4	19,4	20,1	19,3	22,8	23,0	22,9	22,3	14,1	13,8	23,7	23,9	25,6	26,1	22,8	24,4	30,3	31,1	23,4	23,1
6hS2	18,8	18,9	20,0	19,0	22,3	23,8	22,5	22,3	13,5	13,8	23,5	23,4	25,4	25,6	22,7	24,2	29,7	29,2	23,1	23,1
6hS3	20,3	18,5	21,5	19,2	23,8	23,4	24,2	22,7	14,8	13,3	25,7	23,9	27,1	25,5	24,7	24,7	30,2	29,6	24,8	23,5
6hS4	19,1	19,0	20,7	20,0	22,9	24,0	23,4	23,2	12,7	13,9	25,2	24,3	26,0	25,4	23,6	24,9	30,2	30,3	24,7	24,0
12hS1	19,1	19,0	19,5	19,1	21,7	23,1	23,1	21,9	13,8	10,8	24,8	23,1	25,3	24,4	23,0	24,4	30,7	30,2	24,0	23,1
12hS2	19,7	20,6	20,7	21,4	22,1	25,0	23,5	23,7	13,9	14,8	24,8	25,3	25,8	26,1	23,1	25,7	30,7	31,3	24,6	25,2
12hS3	19,9	18,2	21,3	18,8	22,6	22,1	23,4	21,7	14,1	12,8	25,6	23,0	26,0	24,3	23,2	24,5	31,4	29,2	25,4	23,0
12hS4	20,2	18,4	21,4	19,1	22,5	22,4	23,7	22,7	14,2	13,0	25,6	23,3	26,0	24,3	23,5	25,0	31,2	29,6	25,2	23,8
24hS1	18,4	17,6	19,4	17,5	20,3	21,7	22,7	22,3	13,7	12,9	25,3	24,5	24,8	24,5	23,3	24,5	30,7	30,0	24,2	23,5
24hS2	18,6	18,9	19,1	18,3	20,5	22,9	22,2	22,7	13,8	14,3	24,7	25,0	25,1	25,6	22,9	25,3	29,9	30,6	23,6	23,9
24hS3	19,1	17,4	20,3	17,8	21,4	21,7	22,8	22,0	13,9	13,3	25,1	24,1	25,6	24,5	23,1	24,2	30,9	30,5	24,5	23,2
24hS4	19,3	18,0	20,7	18,1	21,7	21,6	23,6	22,1	14,5	13,4	25,6	24,1	25,5	24,2	23,8	25,0	30,4	29,9	25,4	23,2

ANEXO E. Valores de expressão nos três tempos analisados (6, 12 24 h.a.i.) e eficiência dos *primers* referentes aos oito candidatos a efetores para ambas populações do patógeno (MF-1 X GM-J1). Os valores de expressão foram calculados de acordo com o método Pfaffl e as eficiências pelo LinReg.

CANDIDATOS	Valores de expressão relativa (médias e desvios padrões)			EFICIÊNCIA
	6h	12h	24h	
00372 MF-1	5,603 ± 1,470	10,874 ± 1,395	14,904 ± 3,727	2,05
00372 GM-J1	3,260 ± 0,297	5,829 ± 1,816	4,687 ± 2,212	1,95
00755 MF-1	1,003 ± 0,125	1,152 ± 0,587	0,910 ± 0,426	2,02
00755 GM-J1	0,924 ± 0,008	0,896 ± 0,101	0,476 ± 0,114	1,42
15800 MF-1	2,084 ± 1,140	1,922 ± 0,458	1,079 ± 0,378	2,05
15800 GM-J1	1,529 ± 0,294	2,995 ± 1,457	0,800 ± 0,359	2,00
00732 MF-1	3,260 ± 0,602	2,338 ± 0,860	1,438 ± 0,932	2,07
00732 GM-J1	1,971 ± 0,164	2,535 ± 0,509	0,590 ± 0,323	2,00
27121 MF-1	13,701 ± 6,079	18,544 ± 8,183	14,271 ± 6,011	2,02
27121 GM-J1	8,464 ± 2,263	14,618 ± 4,349	6,131 ± 3,528	2,00
127358 MF-1	1,548 ± 0,410	2,214 ± 0,897	1,172 ± 0,599	1,95
127358 GM-J1	1,248 ± 0,153	0,972 ± 0,111	0,556 ± 0,258	2,00
36972 MF-1	1,602 ± 0,479	1,125 ± 0,206	0,836 ± 0,278	1,71
36972 GM-J1	2,675 ± 0,486	2,273 ± 1,035	0,829 ± 0,317	1,85
60547 MF-1	1,452 ± 0,640	1,087 ± 0,585	0,740 ± 0,541	2,04
60547 GM-01	1,163 ± 0,234	1,073 ± 0,367	0,532 ± 0,258	2,00