

**IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM GENES DE AVIRULÊNCIA
DE *Magnaporthe oryzae***

Letícia de Maria Oliveira Mendes
Bióloga

URUTAÍ – GOIÁS

2021

Letícia de Maria Oliveira Mendes

IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM GENES DE AVIRULÊNCIA DE *Magnaporthe oryzae*

Orientador: Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutáí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas para obtenção do título de MESTRE.

Urutáí – GO

2021

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

M538i Mendes, Letícia
IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM GENES DE AVIRULÊNCIA DE
Magnaporthe oryzae / Letícia Mendes; orientador
Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes; co-orientadora
Lúcia Vieira Hoffmann. -- Urutaí, 2021.
63 p.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação
em Proteção de Plantas) -- Instituto Federal Goiano,
Campus Urutaí, 2021.

1. Sequenciamento. 2. Brusone. 3. Montagem
genômica. I. Menezes, Ivandilson Pessoa Pinto de ,
orient. II. Hoffmann, Lúcia Vieira, co-orient. III.
Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional | - Tipo: |

Nome Completo do Autor: Letícia de Maria Oliveira Mendes

Matrícula: 2019101330540169

Título do Trabalho: IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM GENES DE AVIRULÊNCIA DE *Magnaporthe oryzae*

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 12/03/2021

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

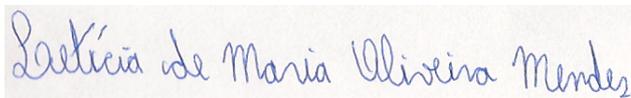
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 12/03/2021.
Local Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)
Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 19/2021 - CREPG-UR/DPGPI-UR/CMPURT/IFGOIANO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO

ATA Nº/69

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ao primeiro dia do mês de março do ano de dois mil e vinte e um, às quatorze horas, **reuniram-se os componentes da banca examinadora em sessão pública realizada por** videoconferência, para procederem a avaliação da defesa de dissertação em nível de mestrado, de autoria de **Letícia de Maria Oliveira Mendes**, discente do **Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí**, com trabalho intitulado "**Identificação de SNPs em genes de avirulência de *Magnaporthe oryzae***". A sessão foi aberta pelo presidente da banca examinadora, **Dra. Lúcia Vieira Hoffmann**, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação para, em 22 minutos, proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, a dissertação foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRA EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**, na área de concentração em **Fitossanidade**, pelo Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60 (sessenta) dias** da sua ocorrência. A banca examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa dissertação em periódicos após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de mestrado, e para constar, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada eletronicamente pelos membros da banca examinadora.

Membros da Banca Examinadora:

Nome	Instituição	Situação no Programa
Dra. Lúcia Vieira Hoffmann	Embrapa Arroz e Feijão	Presidente

Prof. Dr. Ricardo Diógenes Dias Silveira IF Goiano - Campus Membro interno
Urutaí

Dra. Tereza Cristina de Oliveira Borba Embrapa Arroz e Feijão Membro
externo

Documento assinado eletronicamente por:

- **Lúcia Vieira Hoffmann, Lúcia Vieira Hoffmann - Professor Avaliador de Banca - Embrapa Arroz e Feijão (00348003001435)**, em 05/03/2021 09:23:33.
- **Tereza Cristina de Oliveira Borba, Tereza Cristina de Oliveira Borba - Professor Avaliador de Banca - Embrapa Arroz e Feijão (00348003001435)**, em 05/03/2021 08:26:05.
- **Ricardo Diogenes Dias Silveira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 01/03/2021 15:37:21.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 26/02/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 243867

Código de Autenticação: 58550ec826



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Urutaí

Rodovia Geraldo Silva Nascimento, Km 2,5, Zona Rural, None, URUTAI / GO, CEP 75790-000

(64) 3465-1900

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por ter me guiado, iluminado, dado forças e saúde. Agradecer aos meus pais Celso e Aparecida, meu irmão Celso Geoave e o namorado Mateus.

Quero agradecer também aos meus colegas do mestrado, do laboratório Genética molecular do IF Goiano.

Agradecer a Mônica do laboratório de Microbiologia agrícola da Embrapa Arroz e Feijão, por todo carinho, conhecimento, paciência, muito obrigada. A Fernanda do laboratório de biotecnologia pelos seus ensinamentos.

Agradecer aos colegas da Embrapa Nátaly, Karine, Gustavo pela colaboração. As pesquisadoras Dra. Valácia Lemes Lobo, Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi pela ajuda na seleção dos isolados, Dra. Aluana Abreu e Dra. Tereza Cristina de Oliveira Borba por todo conhecimento passado, e por toda confiança depositada.

Ao meu amigo Bruno Tiyoda que me ajudou muito com a parte de bioinformática, mesmo não sendo da área, mas que foi, muito, muito importante nessa caminhada.

Ao Dr. Ivandilson por toda confiança depositada, por ter me indicado para estagiar na Embrapa, por tudo que fez na graduação por mim e no decorrer do mestrado, muito obrigada!

Agradecer de coração a Dra. Lúcia Vieira Hoffman, minha coorientadora, orientadora, amiga, que me recebeu como sua filha. Através dela pude sentir e ver o significado de caridade e amor pelo próximo. Agradecer pela hospitalidade, carinho, amor, paciência. Não tenho palavras para expressar a gratidão que sinto e por tudo que fez por mim e tem feito.

A Embrapa Arroz e Feijão, pelo espaço para realização da pesquisa e a todos que contribuíram nessa caminhada. Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, pela oportunidade do curso e incentivo a participação em Congresso com recurso do PIPECT, e ao CNPq, pelo oito meses de bolsa de DTI.

Sumário

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

RESUMO

A principal doença da cultura do arroz é a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, uma das doenças mais destrutivas, que causa perdas significativas na produção do arroz. O fungo apresenta alta variabilidade e está organizado em populações que são compostas por patótipo ou raças fisiológicas com características de virulência distintas. O objetivo deste trabalho foi realizar a análise genômica de isolados brasileiros de *M. oryzae* a partir de sequenciamento completo do genoma. Foram utilizados isolados da coleção de microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão coletados em seis diferentes estados (MG, MT, SC, RS, TO e MA), de cultivares de terras altas e irrigado. Foram selecionados os isolados mais virulentos por inoculação nas series diferenciadoras da Embrapa Arroz e Feijão, sendo o MGa87, MTa91, SCi97, RSi59, TOi67, MAi68. Os isolados foram cultivados em meio BDA para a extração de DNA e para o sequenciamento de genoma completo via tecnologia *Illumina*®. Ao todo, foram identificados 80.468 marcadores do tipo SNP, sendo 42 SNPs ligados a genes de avirulência. Entre os genes de avirulência foi identificado um SNP para *Avr-Pizt*, dois SNPs para *Avr-CO39*, *Avr-Pii*, *Avr-Pik/k/m* e *AvrPib*; três SNPs para *Avr Pi54* e quatro *Avr-Pita 1*. Obteve-se dos genomas montados uma média de 11.800 contigs, com cobertura de 43x a 44x e uma média de conteúdo GC de 51%. Com esses dados esperamos em um futuro próximo desenhar *primers* para a validação desses marcadores SNPS. Com os resultados dos genomas montados, acreditamos que estão aptos para novos estudos, como: anotação genômica e predição genômica.

Palavras chave: Sequenciamento, brusone, montagem genômica.

ABSTRACT

The main disease of rice culture is blast, caused by the fungus *Magnaporthe oryzae*, one of the most destructive diseases, which causes significant losses in rice production. The fungus has high variability and is organized in populations that are composed of pathotypes or physiological races with distinct virulence characteristics. The objective of this work was to perform the genomic analysis of Brazilian *M. oryzae* isolates from complete genome sequencing. Isolated from the collection of microorganisms from Embrapa Arroz e Feijão collected in six different states (MG, MT, SC, RS, TO and MA), from upland and irrigated cultivars. The most virulent isolates were selected by inoculation in the differentiating series of Embrapa Arroz e Feijão, MGa87, MTa91, SCi97, RSi59, TOi67, MAi68. The isolates were grown in BDA medium for DNA extraction and for complete genome sequencing via Illumina® technology. Altogether, 80,468 SNP-type markers were identified, with 42 SNPs linked to avirulence genes. Among the avirulence genes, one SNP was identified for Avr-Pizt, two SNPs for AvrCO39, Avr-Pii, Avr-Pik / k / m and AvrPib; three SNPs for Avr Pi54 and four Avr-Pita 1. An average of 11,800 contigs was obtained from the assembled genomes, with coverage ranging from 43x to 44x and an average GC content of 51%. With these data, we hope in the near future to design primers for the validation of these SNPS markers. With the results of the genomes assembled, we believe they are suitable for further studies, such as: genomic annotation and genomic prediction.

Keywords: Sequencing, blast, genomic assembly.

INTRODUÇÃO

A cultura do arroz possui grande importância nacional e mundial. O aumento da produção tem desempenhado papel importante na segurança alimentar, especialmente nos países em desenvolvimento da Ásia e da África (CHEN, 2017; GOMEZ e LIGARRETO, 2019), também no Brasil (DURANTE, 2018), e em outros países da América Latina (GANESHAN et al., 2018). A produção no Brasil, para a safra 2019/2020, foi de aproximadamente 10,56 milhões de toneladas (CONAB, 2020), sendo responsável por cerca de 1,5% da produção mundial (FAO, 2020). No entanto grande parte dessa produção pode ser perdida por ataque de doenças fúngicas, a exemplo da brusone, causada por *Magnaporthe oryzae*, pode ocorrer em todas as partes aéreas da planta (folhas, nós, panículas), desde os estádios iniciais de desenvolvimento até a maturação de grãos (SCHEURMANN, 2011; CAO et al., 2017; HAO-LIU et al., 2019).

A perda de produção é muito variável conforme a resistência da planta, intensidade de inóculo e quantidade de fungicida aplicado, e certamente pode chegar à perda total, sendo estimada para o arroz de terras altas no Brasil em cerca de 60% (PRABHU et al., 2003). Esta doença é encontrada em mais de 50 espécies de monocotiledôneas cultivadas e selvagens (GLAUDIEX et al., 2018; ZHANG et al., 2015). Isso inclui outras culturas de cereais como: trigo (*Triticum aestivum*) e cevada (*Hordeum vulgare*). São hospedeiros a grama selvagem e cultivada, e também o capim *Eleusine indica*, o azevém anual (*Lolium multiflorum*) e outras gramíneas (ISLAM et al., 2016; GLAUDIEX et al., 2018; INOUE et al., 2017). É uma interação entre a cultivar arroz e patógeno da brusone é muito estudada, e em parte explicada pela teoria “gene a gene” (FLOR, 1941). Em 2005 foi sequenciado o primeiro genoma *M. oryzae*, isolado de arroz, o que facilitou o entendimento de como se dá a interação entre os genes de avirulência do patógeno e dos genes de resistência do hospedeiro de *Magnaporthe oryzae* (DEAN et al., 2005; GOFF et al., 2002; CHEN, 2012; SCHIRAWSKI, 2010).

A interação gene a gene entre patógeno e cultivar ocorre quando os genes de resistência (*R*) no hospedeiro reconhecem especificamente os genes de avirulência (*Avr*) correspondentes ao patógeno. De forma geral, esse reconhecimento ocorre, pois o gene

de resistência do hospedeiro codifica uma proteína receptora que reconhece especificamente uma molécula elicitora produzida pelo patógeno. Técnicas moleculares, como mapeamento molecular, tem possibilitado localização genômica dos genes que conferem resistência, e facilitado sua seleção, através da seleção assistida por marcadores (SINGH et al.; 2019). O estudo de genes do patógeno que resultam em virulência ou agressividade, ou ainda em resistência da planta, permitem explorar a complexidade da defesa da planta e da coevolução patógeno-hospedeiro (DONG et al., 2015). No futuro provavelmente poderá direcionar esforços para resistência do hospedeiro via seleção assistida, através da seleção de marcadores ligados a genes de resistência para os quais ainda não há variabilidade do patógeno ou deixando de usar marcadores para os genes para os quais já existe variabilidade no patógeno. (SINGH et al.; 2019 ; MGONJA et al ., 2016).

Mesmo com o uso de cultivares resistentes, a quebra de resistência das cultivares ainda ocorre, depois de alguns anos após serem liberadas para os agricultores (KORINSAK et al., 2019). Há forte pressão de seleção recíproca entre patógeno e hospedeiro, que já foi chamada de “corrida armamentista”, ilustrando a coevolução dos genes *Avr* (do patógeno) e *R* (do hospedeiro) (KANZAKI et al., 2012). A quebra de resistência do hospedeiro deve-se principalmente a mutações no patógeno (DEVANNA et al., 2014; CHEN et al., 2013) e, portanto, à natureza adaptativa de *M. oryzae*. Para o melhoramento convencional, possivelmente, os genes do patógeno de maior relevância são os genes que determinam a reação de resistência da planta. São aqueles que codificam efetores reconhecidos por proteína da planta desencadeando a resposta de resistência, os chamados genes *Avr* (CHEN et al., 2013).

Então, no presente estudo sequenciamos seis isolados de várias regiões brasileiras, sendo quatro isolados coletados em sistema de cultivo irrigado nos estados do Rio Grande do Sul (RSi59) e Tocantins TOi67, Maranhão (Mai68) e Santa Catarina (SCi97) e dois isolados coletados em sistema de cultivo de terras altas nos estados de Minas Gerais (MGa68) e Mato Grosso (MTa91). O conhecimento dos genes de avirulência e suas mutações podem fornecer informações valiosas para aplicação em estratégias de manejo adequadas que aumentem a durabilidade da resistência à brusone em arroz.

REVISÃO DE LITERATURA

INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

A interação entre um patógeno e seu hospedeiro é uma luta entre dois organismos pela própria sobrevivência, onde as células vegetais reagem à penetração do fungo através de vários mecanismos estruturais ou bioquímicos, procurando se defender do ataque (PASCHOLATTI & LEITE, 1995; MATIELLO, 1997). O primeiro modelo de interação entre patógeno-hospedeiro foi concebida por Flor (1942), onde se diferenciou a resistência horizontal, que independe das raças do hospedeiro, da resistência vertical, na qual genótipos do hospedeiro, por exemplo, variedades de uma espécie, apresentam resistência especificamente a raças do patógeno.

Plank (1963) distinguiu dois tipos de resistência em termos epidemiológicos: resistência vertical (RV) e resistência horizontal (RH). Baseando-se em gráfico de barras onde as raças do patógeno são variável independente e a intensidade da doença a variável dependente, observou que altura das barras do gráfico diferem muito entre si quando a intensidade da doença varia muito com a raça do patógeno, e a isso chamou de resistência vertical. Quando as raças do patógeno não influenciam a intensidade da doença o gráfico apresenta-se formando um plano na altura da intensidade da doença, e a isso ele chamou de resistência horizontal. Mais tarde se compreendeu que do ponto de vista genético, na resistência vertical, as ações de resistência podem ser mediadas por um único gene (monogênica), ou poucos genes (oligogênica) de efeito maior, que apresenta efetividade contra algumas raças do patógeno, mas não contra outras (DALLAGNOL et al.,2018).

A resistência horizontal o sistema de defesa da planta é governado por vários genes (poligênica) de efeito menor. A resistência horizontal ocorre com um grau intermediário de resistência, ou seja, é possível quantificar o nível de resistência, podendo existir reações de máxima suscetibilidade até máxima resistência. Devido a essa possibilidade de mensurar o nível de resistência é caracterizada como resistência quantitativa (VANDER PLANK 1975; CAMARGO 2011; RIBEIRO DO VALE et al., 2001). Imunidade é quando a planta não é hospedeira de um patógeno.

Uma das possíveis aplicações da teoria da resistência vertical é o uso de um conjunto de

variedades hospedeiras ou resistentes a raças do patógeno, as variedades diferenciadoras. Quando as técnicas de biologia molecular se aprimoraram até que pudéssemos compreender a função de algumas proteínas, a resistência vertical passou a ser explicada pela teoria gene a gene (FLOR,1942; SILUE et al., 1992). De acordo com essa teoria, a resistência é o resultado de uma interação incompatível entre a proteína codificada pelo gene de avirulência (*Avr*) do patógeno e aquela codificada pelo gene de resistência (*R*) do hospedeiro, que confere na interação da existência do tipo receptor-elicitor. O gene de resistência do hospedeiro codifica uma proteína receptora que reconhece especificamente uma molécula elicitora produzida pelo patógeno (CAMARGO, 1995). Isso era de certa forma uma predição que o sequenciamento dos primeiros genes confirmava, mas o que já se conhece da interação entre arroz e *M. oryzae* mostra que pode ser um pouco mais complexo.

Os genes de avirulência podem codificar proteínas que são reconhecidas pelo produto do gene *R* correspondentes, ou ainda, podem codificar enzimas envolvidas na produção de pequenas moléculas ligantes que servem como fatores de reconhecimento (ORBACH et al., 2000), podendo assim levar à incompatibilidade, isto é, a doença não ocorre devido à resistência. É desse reconhecimento do patógeno pela planta, a nível molecular, que desencadeia várias reações de defesa do hospedeiro a tempo ábil de impedir que o patógeno se estabeleça (HAMMONDKOSACK & JONES, 2000). Frequentemente essa resposta de defesa ocorre pela ativação da reação de hipersensibilidade (HR) que caracteriza-se pela morte celular localizada no sítio de penetração do patógeno (SCHENCK et al., 2000; YANG & DICKMAN, 1999).

Mas se o patógeno não possuir o gene de avirulência, não será reconhecido pela molécula receptora da planta hospedeira, conseqüentemente não se desencadeia a resposta de resistência, dando início a uma reação compatível, ocorrendo a doença. Existem alguns patótipos que não possuem os genes de avirulência, sendo portanto virulentos para a planta. Virulência é a capacidade que um determinado patógeno possui de interferir nas funções celulares de seu hospedeiro. Agressividade é a maneira como este patógeno se desenvolve nos tecidos vegetais, podendo ser mais agressivos e menos agressivo (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

A ocorrência de doenças bióticas em plantas de lavouras pode reduzir a

qualidade e quantidade da produção de alimentos (GURURANI et al., 2012). O uso de resistência genética é um dos métodos para controlar doenças por ser uma estratégia de efeito constante ao longo do desenvolvimento da cultura e não onerar os custos de produção (DALLAGNOL et al., 2018), além de não deixar resíduos no ambiente. Entretanto, apesar do trabalho continuado de melhoristas e fitopatologistas, conseguir cultivares com resistência durável e contínua permanece um desafio contínuo (CASELA & GUIMARÃES, 2005).

A resistência de plantas a doenças tem sido definida de diferentes formas. Para Robinson (1969), resistência é a capacidade de impedir o desenvolvimento do patógeno ou agente causal da doença. Para Strange (2003), é o retardo da infecção e do crescimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Já para Russell (1978), a resistência é qualquer característica herdada do hospedeiro que reduz o efeito do patógeno, ou seja, as plantas resistentes são menos afetadas do que as plantas suscetíveis. Para muitos autores, a menor perda de produção de genótipos afetados pela doença é denominada tolerância (HOFFMANN, 2000). Esta é uma definição mais ampla que a de Robinson, e não necessariamente implica em efeito inibitório direto do hospedeiro no desenvolvimento ou na atividade do patógeno indica apenas redução da severidade da doença (PRABHU & FILIPPI, 2006).

A BRUSONE DO ARROZ

O arroz (*Oryza sativa* L) é cultivado e consumido em todos os continentes e considerado o principal alimento para mais da metade da população mundial (BORDIN et al., 2016). A cultura vem sendo acometida por diversas doenças fúngicas foliares que diminuem a área foliar útil das plantas de arroz e, conseqüentemente, a capacidade de realizar fotossíntese e produzir fotoassimilados, influenciando no enchimento de grãos em plantas infectadas (BEDENDO, 1997). A principal doença sendo conhecida como brusone do arroz, é causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*.

Os primeiros registros da doença foram feitos na China em 1637 (OU, 1972). Já no Brasil, a brusone foi relatada pela primeira vez em 1912 no Estado de São Paulo. Desde então a doença tem sido relatada em todas as regiões produtoras do mundo e no Brasil tanto em arroz irrigado (várzeas) quanto em sequeiro (terras altas) (IGARASHI et al., 1986). A doença desencadeia diversas ações negativas, a exemplo da limitação de produtividade, diminuição da qualidade do grão e ao aumento dos custos de cultivo,

devido ao seu elevado grau de patogenicidade, causando perdas de até 100% da produção agrícola (OLIVEIRA et al., 2019).

O ciclo de vida de *Magnaporthe oryzae* inicia-se quando os conídios que foram produzidos por lesões esporulativas são disseminados e entram em contato com a superfície da folha de arroz (PRABBU & FILIPPI, 2006). Essa aderência dos conídios nas folhas ocorre pela presença de um adesivo conhecido como mucilagem, que fica armazenado em um compartimento localizado no espaço periplásmico, no ápice do esporo (PRABBU & FILIPPI, 2006). Umidade e a temperatura são fundamentais para o desenvolvimento da doença. A temperatura ótima para esporulação é aproximadamente 28°C, embora possa ocorrer esporulação desde 10 até 35°C.

A produção de conídios ocorre nas folhas. Uma vez, aderidos à superfície da folha, é necessário que a umidade esteja entre 92% a 96% para ocorrer à germinação (PRABBU & FILIPPI, 2006). A germinação do conídio inicia-se após 30 a 90 minutos de contato com a água. Podendo ocorrer antes da sua liberação pelo conidióforo, pois necessita apenas de um pouco de água (PRABBU & FILIPPI, 2006). O tubo germinativo é produzido pela célula basal ou apical de um conídio, constituído por três células nucleadas.

O apressório possui a função de romper a superfície foliar do hospedeiro. O tamanho em geral pode variar entre 5 a 15 µm em diâmetro e as formas podem variar entre globosas, ovoides ou oblongas, a depender de cada isolado. A parede celular do apressório possui uma camada de melanina, que reveste a parede celular do apressório, como barreira à permeabilidade, permitindo o aumento da concentração de alguns solutos citoplasmáticos (HOWARD & FERRARI, 1989). No apressório maduro existe uma estrutura designada pino de penetração que quebra mecanicamente a cutícula e a epiderme das folhas de arroz, sendo necessária uma elevada pressão de turgor interna para que a penetração ocorra.

Após o processo a penetração inicial que é feita pelo apressório, ocorre a formação da hifa de infecção. Nesse processo, geralmente a proteína actina está envolvida, sendo localizada no ápice da penetração (BOURETT & HOWARD, 1990). A hifa de infecção dá origem a hifas secundárias dentro das células da epiderme e do mesófilo, levando ao desenvolvimento da formação de lesões (PRABBU & FILIPPI, 2006). As lesões nas folhas podem ser visíveis 72 horas após a inoculação do patógeno

na epiderme. Com o tempo crescem em tamanho e número até coalescerem, podendo necrosar, diminuindo consequentemente a área fotossintética da folha (PRABBU & FILIPPI, 2006), em 144 horas em condições de alta umidade, ocorre à produção de esporos assexuais em abundância, os quais são liberados e dispersos pelo vento, água ou por sementes infectadas, fornecendo inóculo para o início de um novo ciclo de infecção.

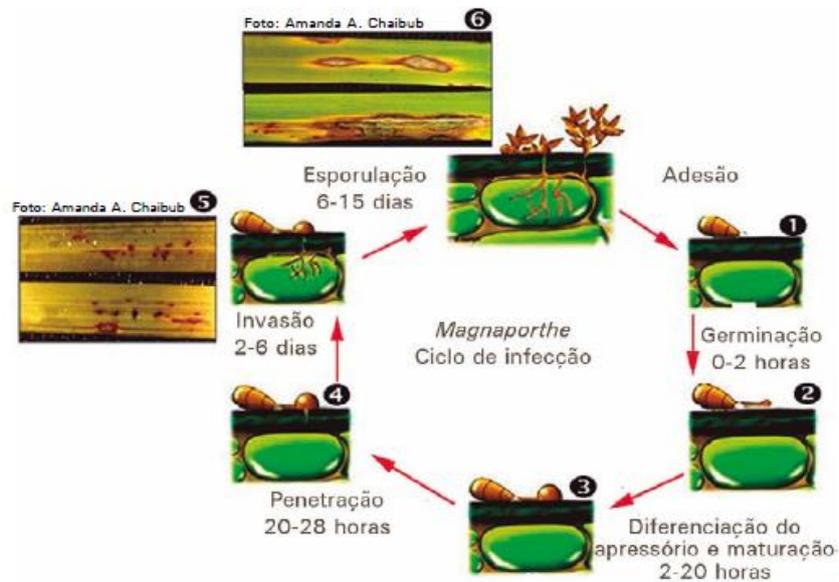


Figura 1: Ciclo de desenvolvimento da brusone na planta de arroz – fonte: Ramos (2009).

OS GENES DE AVIRULÊNCIA DE *Magnaporthe oryzae*

As mutações nos genes de avirulência (*Avr*) levam à quebra dos mecanismos de resistência controlados pelos genes *R* da planta, essas mutações podem afetar a transcrição e/ou função dos produtos dos genes *Avr*, interrompendo assim a resistência. (OSE et al., 2015; SONE et al., 2013; MIKI., et al 2009).

Existem aproximadamente 24 genes de avirulência (genes *Avr*) de *M. oryzae* mapeados, mas apenas 12 genes de avirulência foram clonados (Tabela 1). Sua designação é dada normalmente como *Avr* seguida da nomenclatura do gene de resistência do arroz para o qual existe correspondência funcional na resposta de resistência. Isto é, estando presentes o *Avr* e o gene de resistência (*R*) correspondentes a doença não ocorre. Os genes de resistência do arroz à brusone são frequentemente designados como *Pi*, do nome da fase imperfeita do fungo, *Pyricularia*. A maioria dos genes de avirulência clonados codificam proteínas pequenas secretadas, exceto *Avr-Pita* e *ACE1* (WANG et al, 2017). O *Avr-Pita* codifica uma metaloprotease de zinco secretada, já o *ACE1* não é secretado e codifica uma proteína híbrida que produz

metabolito secundário, que consiste em uma policetídeo sintase (PKS) fundida com um peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS) contendo um domínio β -cetoacil (WANG et al, 2017; RAY et al., 2016).

Nove dos genes de avirulência clonados apresentaram polimorfismo de presença ou ausência para população de arroz. O *Avr-Pia*, está presente em apenas 17 das 48 sequências genômicas no NCBI (Tabela 1), sendo possível, hipoteticamente, que evolutivamente tenha se movido entre os cromossomos 5 e 7 em diferentes isolados ou tenha sido adquirido por diferentes isolados em eventos separados (WANG et al, 2017).

Tabela 1: Polimorfismo de presença ou ausência dos genes *Avr* clonados em isolados coletados de diferentes hospedeiros.

Gene	Presença/ausência
<i>Avr-Pita</i>	43/5
<i>Avr-CO39</i>	4/44
<i>PWL1</i>	4/44
<i>PWL2</i>	45/3
<i>Avr-Piz-t</i>	48/0
<i>Avr-Pia</i>	17/31
<i>Avr-Pii</i>	25/23
<i>Avr-Pik/Km/Kp</i>	39/9
<i>ACE1</i>	48/0
<i>Avr-Pi9</i>	45/3
<i>Avr-Pib</i>	48/0
<i>Avr-Pi54</i>	41/7

Os primeiros genes de *M. oryzae* foram clonados em 1995, conhecidos como *PWL1* e *PWL2*, conferia reação diferencial do fungo a hospedeiros de gêneros diferentes de plantas, por um lado arroz e, por outro, *Eragrostis curvula*, conhecido popularmente como capim-chorão ou barba-de-bode e cultivado como forrageira (KANG et al., 1995; SWEIGARD et al., 1995). Nesta fase, a aplicação da identificação dos fatores de avirulência no entendimento para seleção de genótipos de arroz no melhoramento genético convencional ainda não existia, pois não evidenciava diferença na reação de resistência dentro do gênero *Oryza*. Os genes *PWL1* e *PWL2* compartilham 75% de

identidade de aminoácidos e codificam proteínas hidrofóbicas ricas em glicina (Gly) com sequências de sinal de secreção (YOSHIDA et al., 2009).

Tabela 2: Localização cromossômica, tipo de efetor produzido e genes de resistência (*R*) correspondente de 12 genes de avirulência (*Avr*) clonados de *Magnaporthe oryzae*.

Gene avr	Cromossom	Tipo efector	Gene R clonado	Referencia
<i>PWL1</i>	2	Rico em glicina	Desconhecido	Kang <i>et al.</i> (1995)
<i>PWL2</i>	2	Rico em glicina	Desconhecido	Sweigard <i>et al.</i> (1995)
<i>Avr-CO39</i>	1	MAX	<i>Pi-CO39</i>	Farman and Leong (1998); Ribot <i>et al.</i> (2013)
<i>Avr-Pita</i>	3	Zinco metalloprotease	<i>Pi-ta</i>	Orbach <i>et al.</i> (2000)
<i>ACE1</i>	1	PKS/NRPS	<i>Pi33</i> (uncloned)	Böhnert <i>et al.</i> (2004)
<i>Avr-Pia</i>	5 ou 7	MAX	<i>Pia</i>	Miki <i>et al.</i> (2009); Yoshida <i>et al.</i> (2009)
<i>Avr-Pii</i>	7	Desconhecida	<i>Pii</i>	Yoshida <i>et al.</i> (2009)
<i>Avr-Pik/km/kp</i>	1	MAX	<i>Pik/Pik-m/Pik-p</i> , <i>Pik-h</i>	Yoshida <i>et al.</i> (2009); Wu <i>et al.</i> (2014)
<i>Avr-Piz-t</i>	7	MAX	<i>Piz-t</i>	Li <i>et al.</i> (2009)
<i>Avr-Pi9</i>	7	Seis cisteína	<i>Pi9</i>	Wu <i>et al.</i> (2015)
<i>Avr-Pib</i>	3	Desconhecida	<i>Pib</i>	Zhang <i>et al.</i> (2015)
<i>Avr-Pi54</i>	4	MAX	<i>Pi54</i>	Ray <i>et al.</i> (2016)

O segundo gene clonado, cinco anos depois, no ano 2000, por Orbach et al. (2000), foi o *Avr-Pita*, cujo produto é reconhecido pela proteína codificada pelo gene de resistência *Pita* da planta hospedeira. Possui a função de codificar uma proteína metaloprotease de zinco excretada. Metaloproteases são enzimas que cortam proteínas e que precisam de zinco ou cálcio para funcionar corretamente. No caso de *Avr-Pita* sabe-se que alterações estruturais (principalmente inserção de transposons) no gene alteram

seu reconhecimento pelo gene de resistência (KASETSONBOOM et al, 2013). A diversidade do gene foi estudada tendo-se encontrado deleções, duplicações e translocações, sendo estas últimas mais raras (JIA et al, 2020). Esta instabilidade é explicada devido ao gene *Avr-Pita* estar localizado na região telomérica do cromossomo, onde a maioria dos genes *Avr* clonados até o momento está localizada (BAO-HUA, 2017): translocações inter-cromossômicas, reconstruções estruturais e variações no comprimento dos cromossomos são mais prováveis de serem observadas no final das regiões dos telômeros. O aumento do número de cópias de genes hospedeiro, portanto quebra de resistência. Um exemplo é o gene *Avr-Pita* em *M. oryzae*, que continha várias cópias em diferentes cromossomos, levando a hipótese de que várias cópias de efetores aumentam a adaptação de patógenos, o que deve estar associado a pequenas mutações, gerando variabilidade e, possivelmente em alguns casos esses efetores fossem reconhecidos pelo hospedeiro e, com as mutações, passaram a não ser. No isolado FJ81278 de Chen et al (2015), foram encontrados os principais eventos de polimorfismos de número de cópias (CNV, *copy number variation*) no final do Supercontig 8.1, final do Supercontig 8.2 e 120-130 KB de uma extremidade no Supercontig 8.6.

O gene de avirulência do patógeno *Avr-Pi54* tem como um gene de resistência correspondente no arroz o *Pi54*. É responsável por codificar uma proteína que é secretada, possuindo, portanto, um peptídeo sinal (SP) na região N-terminal (DEVANNA, et al., 2014).

De acordo com a predição de uma modelagem in silico a interação entre os produtos dos genes de resistência *Pi54* e o gene *Avr-Pi54* é uma interação física pelos domínios ricos em leucina LRR (*Leucine Rich Repeat*) (Devanna et al. 2014; Ray et al. 2016). Os aminoácidos que foram encontrados na proteína *Pi54* que participaram da interação com o produto proteico, incluem 10 resíduos de aminoácidos (L221, E222, N223, L224, S225, I226, S227, F228, E231 e K249) do domínio LRR (Ray et al., 2016). Isso era esperado, já que em outras interações também o domínio LRR das proteínas R é o local de interação com as proteínas *Avr* do patógeno (JIA et al., 2000; RAVENDALE et al., 2012). Dessa forma, o produto do gene de resistência *Pi54* pode atuar como uma proteína receptora no hospedeiro que pode reconhecer a proteína do gene *Avr-Pi54* secretada por *M. oryzae* durante a invasão do hospedeiro (RAY et al., 2016). Nos estudos de Ray et al. (2016) foi feito um ensaio de agroinfiltração de folhas

de *N. benthamiana*, para melhor compreender a interação entre *Pi54* e as proteínas Avr-Pi54. Neste trabalho foi confirmado que a indução de resposta hipersensível ocorre somente na presença de *Pi54*. Com o método de agroinfiltração, *Pi54* e os genes candidatos a genes de avirulência foram co-expressos transitoriamente nas folhas de *Nicotiana benthamiana*, induzindo assim uma resposta hipersensível, ou hipersensitiva. O teste de complementação genética também provou que a proteína induz resposta de resistência da planta na presença do gene *Pi54*, ou seja, o isolado que continha o gene *AvrPi54* foi incapaz de infectar plantas de arroz.

O *ACE1* codifica uma proteína híbrida putativa de uma policetídeo sintase (*PKS*, *polyketide synthetase*) e de um peptídeo sintase não ribossomal (*NRPS*, *nonribosomal peptide-synthetase*). *PKS* e *NRPS* são duas classes distintas de enzimas envolvidas na produção de metabólitos secundários específicos de uma infecção, expressa apenas durante a penetração mediada por apressório e em nenhum outro estágio do ciclo de vida de *M. oryzae* (RAY et al., 2016). Essas proteínas codificadas pelo gene *ACE1* são reconhecidas especificamente por cultivares de arroz que possuem o gene de resistência *Pi33* (BERRUYER et al., 2003). O gene *ACE1* possui 12,4 Kb (SONG et al., 2015), e a proteína de avirulência codificada é completamente diferente das outras proteínas, pois codifica uma enzima que não é secretora por natureza. Uma troca de aminoácidos no local catalítico da β -cetoacil sintase do *ACE1* abole o reconhecimento do fungo por cultivares resistentes (BOHNERT et al., 2004) Isso mostra que a atividade biossintética do *ACE1* é necessária para a avirulência e que a detecção do patógeno fúngico invasor envolve o reconhecimento de um metabólito secundário cuja biossíntese depende do *ACE1*.

O *Avr-Pik* codifica uma proteína de 113 aminoácidos com um peptídeo sinal de 21 aminoácidos (YOSHIDA et al., 2009). Cinco variantes (alelos) de *Avr-Pik* (*Avr-PikA*, *Avr-PikB*, *Avr-PikC*, *Avr-PikD* e *Avr-PikE*) diferem um dos outros por um total de cinco substituições de nucleotídeos, todas dos quais causam alterações de aminoácidos (LONGYA et al., 2019).

Os alelos do arroz do gene *Pik* mostram especificidades de reconhecimento para diferentes variantes dos efetores do patógeno *Avr-Pik* (DE LA CONCEPCION et al., 2018). As variedades de arroz que expressam os genes *Pikp* e *Pi7* são resistentes apenas à raças do patógeno que possuem o gene *Avr-PikD*. O arroz que expressa *Pikm* é

resistente a *M. oryzae* que possuem os genes de avirulência *AvrPikA*, *Avr-PikD* ou *Avr-PikE* (CHAIPANYA et al., 2017; LONGYA et al., 2019), já a cultivar de arroz que apresenta o gene *Pik* é resistente apenas aos patógeno que possui os genes *Avr-PikDe* *Avr-PikE*. A base molecular para os reconhecimentos de variantes do gene *Avr-Pik* por esses alelos do gene de resistência de arroz se dá através dos domínios ricos em leucina da proteína chamados de NLR ou NBS-LRR (*Nucleotide-binding and leucine-rich repeat*), pois foi possível observar que alterações de aminoácidos nessas interfaces de *Avr-Pik* (tanto variantes naturais quanto mutações projetadas) afetam a ligação *in vitro*, como também alteram respostas de fenótipos de morte celular no sistema modelo *Nicotiana benthamiana*. Isso mostrou que o efetor é ligado ao domínio *Pik-HMA* por meio de três superfícies de interação predominantes (CHAIPANYA et al., 2017; LONGYA et al., 2019).

Em um estudo de variação genética com 58 isolados de *M. oryzae* da Tailândia, identificou-se uma nova variante do *Avr-Pik*, que foi denominado como *Avr-PikF*, e todas as cultivares que foram testadas apresentaram suscetibilidade aos isolados que expressam apenas este efetor (LONGYA et al., 2019). Além disso, o gene *Avr-PikF* não está ligado aos domínios *Pik-HMA* *in vitro* e não apresenta fenótipo de morte celular em *Nicotiana benthamiana*, sugerindo então um mecanismo de evasão imunológica por esta variante (LONGYA et al., 2019).

O gene de avirulência *Avr-Pia*, desencadeia uma reação hipersensível em cultivares de arroz que possuam em seu genoma o gene *R Pia*. O número de cópias do gene *Avr-Pia*, variou de um a três entre isolados de *M. oryzae* avirulentos ao arroz com o gene de resistência *Pia*, e três cópias do gene foram localizadas em um único cromossomo na cepa Ina168, da qual o gene foi originalmente clonado. A interação entre *Pia* e *Avr-Pia* também ocorre fisicamente através de domínios de proteínas NLR do gene de resistência, nomeadas RGA4 e RGA5, atuando juntas (CESARI et al. 2013, 2014). O RGA4 atua como um indutor de morte celular constitutivamente ativo e é inibido pelo RGA5 em plantas de arroz sem infecção por patógenos. O RGA5 é um receptor do produto do *Avr-Pia* e não tem atividade indutora de morte celular.

O gene *Avr-CO39* que confere resistência para a cultivar de arroz CO39, foi mapeado no cromossomo 1 de *M. oryzae*, com 1,06Kb. O ORF3 codifica uma proteína que tem as características de um efetor fúngico. Possui um tamanho pequeno com 89

aminoácidos, sem homologia com outras proteínas, três resíduos de cisteína em um peptídeo sinal previsto para secreção em seu terminal N. Já há muitas raças que quebraram a resistência de CO39 (BAO-HUA, 2017).

O gene *Avr-Pi9* correspondente ao gene de resistência *Pi9*. Codifica uma pequena proteína secretada que, excretada pelo patógeno, parece permanecer nesse ‘complexo interfacial’ entre fungo e hospedeiro, e a seguir é translocado para as células do hospedeiro. O *Avr-Pi9* pode estar em cópias múltiplas em um conjunto de genes em tandem; O *Avr-Pi9* é altamente expresso em estágios iniciais da doença (LIU et al., 2010).

O gene *Avr-Pib*, que confere avirulência ao gene de resistência *Pib*, foi isolado por meio de clonagem em mapa. O gene codifica uma proteína de 75 resíduos, que inclui um peptídeo sinal (Zhang et al., 2015).

O *Avr-Pii* é uma pequena proteína secretada de 70 aminoácidos, contém um peptídeo sinal N-terminal e não possui semelhanças de com outras proteínas conhecidas. O *Avr-Pii* forma um complexo com duas proteínas Exo 70 do arroz, os Exo70-F2 e os Exo70-F3. As proteínas Exo foram consideradas como necessárias para a resistência de Pi (BAO-HUA, 2017; FUJISAKI et al., 2015).

OS GENES DE RESISTÊNCIA DO ARROZ PARA OS QUAIS FOI CLONADO O GENE DE AVIRULÊNCIA

A inserção de cultivares resistentes no mercado é considerada a ferramenta mais ecológica e econômica para prevenir ou controlar doenças das culturas (MIKI et al., 2009). A durabilidade da resistência pode ser pensada como coevolução. As plantas possuem imunidade inata contra micróbios formada por diversos genes que podem ser selecionados para estarem presentes em variedades comerciais para a agricultura. Essa imunidade às vezes é causada por resistência induzida pelo patógeno e, nesse caso depende, primeiramente, do reconhecimento do patógeno e depois, de sinais sistêmicos provenientes nos locais de infecção (CHISHOLM et al., 2006).

A imunidade inata depende, portanto do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, feita por proteínas de membranas chamadas receptores de

reconhecimento de padrões, PRRs (*PAMP-recognition receptor*), que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos que tenham estruturas conservadas, ou seja, não alteradas no processo evolutivo e que por isso constituem-se em padrões de reconhecimento, e que podem ser chamados de PAMPs ou MAMPs (*pathogen or microbe associated molecular patterns*) (OSE et al., 2015; WANG, 2017). Os PAMPs são, usualmente, moléculas extracelulares resultantes da presença do micróbio. Quando pensamos em termos evolutivos, e tentamos entender a quebra de resistência, autores como DEVANNA et al., 2014 nos mostram que alguns patógenos vegetais adaptam-se para secretar um arsenal de proteínas que podem suprimir a defesa da planta, resultando em suscetibilidade por efetores (*ETS effector-triggered susceptibility*), que pode ser entendido como sinônimo de proteínas Avr. Para a planta conseguir combater essa infecção, existe uma segunda camada de defesa, que é denominada de imunidade desencadeada por efector ETI (*effector-triggered immunity*), que é baseada no reconhecimento específico de certas moléculas efectoras derivadas de patógenos que são as proteínas de avirulência (Avr). O reconhecimento das proteínas Avr se dá pelas proteínas R da planta (DEVANNA et al., 2014) resultando em uma resposta de resistência mais completa em comparação à resistência inata, e pode também resultar na morte celular programada conhecida como resposta hipersensitiva (WANG, 2017).

Então os receptores vegetais, as proteínas, frequentemente localizadas na membrana plasmática ou intracelulares, que têm essa função podem ser denominadas receptores imunológicos, e são codificadas por genes *R*, sendo a maioria proteínas intracelular de ligação a nucleotídeos e repetição rica em leucina (NBS-LRR) contendo um domínio NBS (do inglês, *nucleotide binding site*) e LRR (Repetições Ricas em Leucina; *Leucine Rich Repeats*) (TAMELING et al., 2010) . São em geral 20 a 30 aminoácidos com predominância de leucina (CANNON et al., 2002; McHALE et al., 2006). O domínio LRR apresenta maior variação e interage com o seu efector, no reconhecimento direto ou indireto de raças de patógenos específicos. (CANON et al., 2002). Muitos LRRs podem interagir com outras proteínas transmembranares proporcionando a capacidade de sinalização intercelular. Esse domínio também está envolvido em sítios de união ao peptídeo ligante e a sítios de interação proteína-carboidrato, no que tange à especificidade da resistência (IMEDIATO, 2014)

A classe *NBS-LRR*, possui o maior grupo de genes *R* e a mais diversificada (BOHRERT et al., 2004). Análises de bioinformática de várias linhagens de arroz

revelaram aproximadamente 500 genes que codificam proteínas de ligação NBS-LRR (OSE et al., 2015), frequentemente associadas a defesas contra fungos, bactérias, afídeos e nematoides (McHALE et al., 2006). Além de *NBS-LRR*, podem estar presentes domínios amino-terminal e carboxi-terminal variáveis, como representado na Figura 2 (CANNON et al., 2002; McHALE et al., 2006).

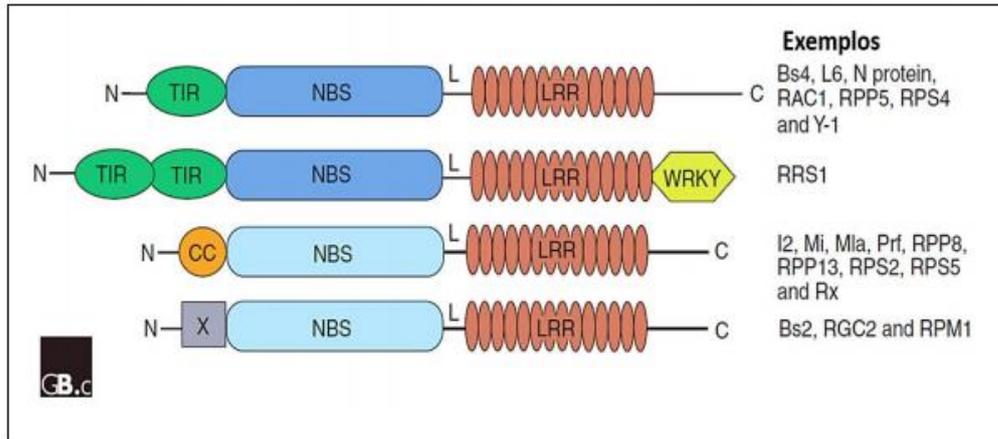


Figura 2: Representação dos principais domínios das proteínas NBS-LRR. N - Amino-terminal, TIR - Receptor Toll- Interleucina, CC - Cauda Espiralada, NBS - Sitio de Ligação ao Nucleotideo, LRR - Repetições Ricas em Leucina, C - Carboxi-terminal, WRKY - Fator de Transcrição (Fonte: McHale *et al.*, 2006) Exemplos de proteínas com cada configuração são mostradas à direita. Bs4, 12, Mi e Prf são de tomate; L6 de linho; N do tabaco; RAC1, RPP5, RPS4, RRS1, RPP8, RRP13, RPS2, RPS5 e RPM1 de *Arabidopsis*; Y-1 e Rx da batata; Mla de cevada; RGC2 de alface; Bs2 de pimenta. Fonte: MCHALE (2006).

O domínio NBS atua na transdução de sinal, responsável por atividade de ligação ao ATP (Adenosina Trifosfato, *Adenosine Triphosphate*), subunidades da ATP sintetase e fatores de alongação do ribossomo. Os domínios NBS são divididos em dois grupos nas plantas, definidos como: *i*) domínios amino-terminal, motivo TOLL/interleucina-1 (TIR) e *ii*) o motivo de bobina espiralada (CC). Esses grupos estão envolvidos no reconhecimento de patógenos diferindo pelas sequências de aminoácidos e em sua via de sinalização (ARAÚJO, 2015).

Existem mais de 100 genes de arroz envolvidos na resistência da brusone do arroz, e 35 deles foram clonados (LONGYA et al., 2019) (Tabela 2). A maioria desses

genes de resistência mapeados codificam proteínas NBS-LRR. Mas o gene de resistência *Pi-d2* é uma exceção, codifica uma cinase (sinônimo de quinase, ou seja, uma enzima que transfere grupos fosfato) semelhante a um receptor, com um domínio extracelular de lectina B e um domínio intracelular de serinotreonina cinase. Outra exceção é o gene *pi21*, recessivo, que codifica uma proteína rica em prolina com um potencial domínio de ligação a metais pesados.

Tabela 3: Características dos genes de resistência a do hospedeiro, arroz, à brusone, que possuem genes *Avr* clonados.

R gene	Codificação	Cromossomo (hospedeiro)	Referência
<i>Pi9</i>	NBS-LRR	6	Qu <i>et al.</i> (2006)
<i>Piz-t</i>	NBS-LRR	6	Zhou <i>et al.</i> (2006)
<i>Pii</i>	NBS-LRR	9	Takagi <i>et al.</i> (2013)
<i>Pi54</i>	NBS-LRR	11	Sharma <i>et al.</i> (2005, 2010)
<i>Pikm</i>	NBS-LRR	11	Ashikawa <i>et al.</i> (2008)
<i>Pik</i>	NBS-LRR	11	Zhai <i>et al.</i> (2011)
<i>Pik-p</i>	NBS-LRR	11	Yuan <i>et al.</i> (2011)
<i>Pia</i>	NBS-LRR	11	Okuyama <i>et al.</i> (2011)
<i>Pi-CO39</i>	NBS-LRR	11	Cesari <i>et al.</i> (2013)
<i>Pik-h</i>	NBS-LRR	11	Zhai <i>et al.</i> (2014)
<i>Pita</i>	NBS-LRR	12	Bryan <i>et al.</i> (2000)

A maioria dos genes de resistência da brusone estão nos cromossomos 6 e 11 (LIU *et al.* 2010; TANWEER *et al.* 2015), e com menor quantidade de genes de resistência nos cromossomos 1 e 9 e apenas um gene R nos cromossomos 2, 4, 8 e 12 (WANG, 2017).

Há genes de resistência que são muito perto uns dos outros no genoma, e portanto são selecionados frequentemente em conjunto no programa de melhoramento. Este é o caso de *Pi2*, *Pi9* e *Piz-t*, no cromossomo 6 (LIU *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2009), como mostra a Figura 3.

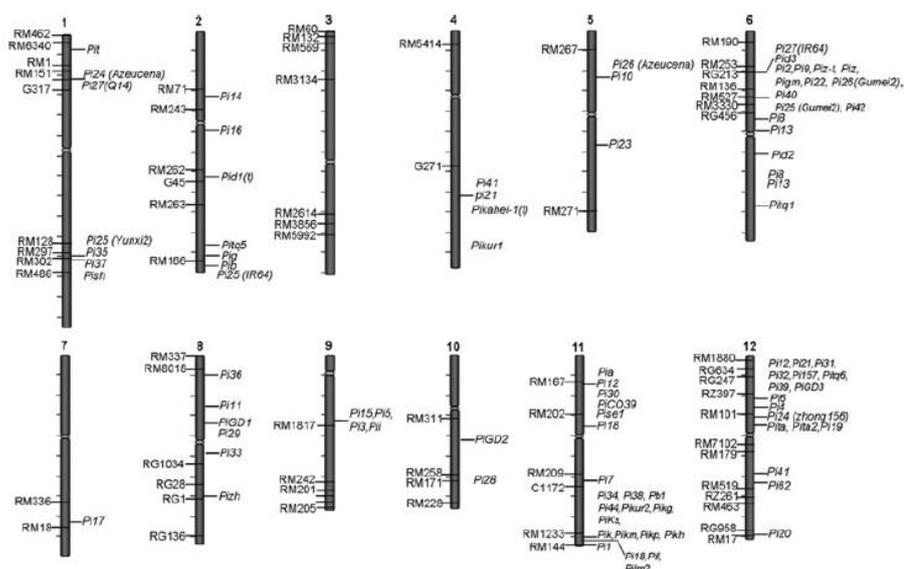


Figura 3: Distribuição dos genes de resistência completos à brusone do arroz identificados e loci de características quantitativas (QTLs). Os genes de resistência mapeados e os QTLs estão localizados no lado direito dos cromossomos. Marcadores de DNA estão localizados no lado esquerdo dos cromossomos.

OBJETIVOS

Geral: Análise genômica de isolados brasileiros de *M. oryzae* a partir de sequenciamento completo do genoma.

Específico:

- Selecionar seis isolados brasileiros de *M. oryzae* de arroz da micoteca da Embrapa arroz e feijão;
- Montar e alinhar o genoma dos seis isolados brasileiros de *M. oryzae* sequenciados;
- Identificar SNPs ligados a genes de avirulência em *M. oryzae*

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DE COLETA DOS SEIS ISOLADOS

Foram selecionados seis isolados de *Magnaporthe oryzae* para sequenciamento de genomas completos, da série de diferenciadora da Embrapa Arroz e Feijão (Tabela 3; Figura 4). Os seis isolados foram escolhidos com base na localização geográfica dos pontos de coleta, procurando representar os sistemas de cultivo de terras altas e irrigado. Além disto, a informação dos dados de inoculação nas séries diferenciadoras foi utilizada buscando-se aqueles isolados mais virulentos identificados pelo grupo de pesquisa da Embrapa Arroz e Feijão. As inoculações dos isolados em variedades diferenciadoras foram conduzidas anteriormente a esse estudo pela equipe da Embrapa Arroz e Feijão (Tabela 3)

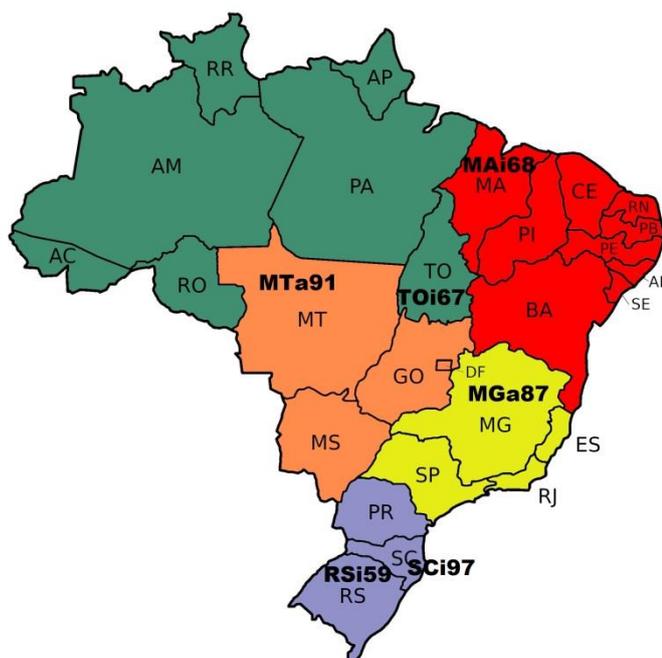


Figura 4: Regiões de coleta do fungo *Magnaporthe oryzae* em plantações de arroz de terras altas MGa87 e MTa91 e irrigado SCi97, RSi59, TOi67, Mai68.

Tabela 3: Genótipos de *Magnaporthe oryzae* com a cultivar de origem, local de coleta dos isolados, ano de coleta, patótipo nacional e internacional e sistemas de cultivo terras altas ou irrigado.

Genótipos	BRM	Cultivar de origem	Local de coleta	Ano	Patótipo nacional	Patótipo internacional	Sistemas de cultivo	
MGa87	9887	25.023	Primavera	Guarda Mor –MG	2009	BD-2	IC-17	Terras altas
MTa91	9891	25.027	Primavera	Paranatinga –MT	2009	BD-16	IF-1	Terras altas
SCi97	9897	25.033	Tio Taka	Indaial – SC	2009	BI-1	IB-46	Irrigado
RSi59	Tpy59	-	Guri Inta CL	Arroio Grande – RS	2016	BF/BH-1	IA-25	Irrigado
TOi67	Tpy67	-	IRGA 424	Lagoa da Confusão – TO	2017	BG-2	IA-99/100	Irrigado
MAi68	A168L	11.219	IRGA 424	São Luís –MA	2018	BF-4/BI-1	IB-9	Irrigado

Os isolados de *Magnaporthe oryzae* são compostas por raças, ou patótipo, com características distintas de virulência. A diversidade dos isolados é determinada pela variedade e distribuição dos patótipos, definidos com bases nas reações de resistência e suscetibilidade de uma série com cultivares da diferenciadora internacional e nacional, composta por oito cultivares diferenciadoras (ANJOS, 2008).

A determinação dos patótipo foi realizada em condições controladas de casa de vegetação, utilizando oito diferenciadoras internacionais propostas por Atkins et al. (1967), das quais seis apresentam genes de resistência conhecidos, (Raminad, Zenith – *Pi-a* e *Pi-z*, NP 125, Usen – *Pi-a*, Dular - *Pi-k*, Kanto 51 - *Pi-k*, Sha-tiao-tsaio - *Pi-k^s* e Caloro - *Pi-k^s*). Dessa forma, podem ser identificados um máximo de 256 patótipos de *M. oryzae* distribuídos em nove grupos distintos: IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IH, II.

A série de diferenciadoras internacionais de patótipos pode não revelar diferenças importantes na patogenicidade em populações regionais. Assim, Silva et al (2011), propuseram oito cultivares diferenciadoras brasileiras adicionais para cultivares de arroz irrigado (BRS Jaburu, BRS Taim, BRS Biguá, BR IRGA-417, Epagri 109, Javaé, Metica-1 e Supremo). Os patótipos brasileiros foram prefixados com a letra “B” em substituição à letra “I” ficando os grupos designados como BA, BB, BC, BD, BE, BF, BG, BH e BI.

OBTENÇÃO DOS ISOLADOS MONOSPÓRICOS

As coletas dos isolados foram feitas anteriormente ao início deste estudo pela equipe da Embrapa Arroz e Feijão. Foram coletadas folhas com sintomas da brusone em lavouras. As folhas coletadas foram incubadas em câmara úmida sob luz branca por 24 horas, a 27 °C. Com o auxílio de uma alça de platina, os conídios foram transferidos da folha lesionada para Placas de Petri, contendo meio de cultura e espalhados sobre o meio. Em seguida foi utilizado um bisturi estéril para retirada de segmentos de meio de cultura contendo conídio, foram transferidos para outra placa de Petri, contendo meio de cultura BDA com antibiótico e logo em seguida incubados. Após o crescimento sem nenhuma contaminação por bactérias, ácaros e fungos, foi feita a retirada dos segmentos e transferido novamente para outra placa de Petri contendo meio de cultura BDA com antibiótico, e levadas para incubação para o crescimento de colônias monospórica

Para a inserção e a conservação em papel filtro, utilizou-se um disco de cada colônia monospórica o qual foi transferido para o centro de uma placa de Petri, contendo uma folha de papel filtro esterilizado sobre meio BDA, em seguida as placas foram levadas para incubação a 24 °C, até que a colônia ocupasse toda a superfície do papel filtro. Após a finalização da etapa de incubação, o papel filtro foi retirado do meio BDA e foi transferido para outra placa de Petri já esterilizada e sem meio BDA, levado então para secagem em estufa a 28° - 30°C Depois da secagem, o papel filtro, contendo o fungo, foi então cortado em quadrados e transferido para um criotubo contendo sílica.

EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS

Os isolados foram colocados para crescer a partir da amostra armazenada em papel em meio de cultura BDA (BDA, 200 g de batata descascada, 20 g de dextrose, 20 g de ágar, 1 l de água destilada) com antibiótico (clorafenicol 50 µg/mL), em seguida, foram mantidos em temperatura ambiente a 25°C para o crescimento por 15 dias. O DNA dos seis isolados foi extraído, separadamente, utilizando o protocolo desenvolvido pelo Lanagro (GO) (Laboratório Nacional Agropecuário) para extração de DNA de plantas com modificações.

Com o auxílio de uma lâmina de vidro retiraram-se, da placa de Petri, aproximadamente 300 mg de micélios posteriormente acondicionadas em microtubos de 2 mL. Os microtubos foram congelados em nitrogênio líquido e adicionou-se a cada microtubo, uma esfera de aço inox (4 mm de diâmetro), a maceração foi feita manualmente, através de movimentos fortes bidirecionais (para cima e para baixo) por 30 segundos. Após a maceração, foram adicionados, a cada microtubo, 1000 µl de CTAB 2% + 10 µl de proteinase-K 20mg/mL. Os microtubos foram incubados em banho Maria BHS a uma temperatura de 65°C durante uma hora, com agitação manual das amostras a cada 10 minutos. Em seguida foram adicionados 520 µl de solução CIA (Clorofórmio: Álcool isoamílico (24:1)) e as amostras foram centrifugadas a 12.000xG por 10 minutos. Após a retirada do sobrenadante, foram adicionados 300 µl de acetato de amônio 7,5 M e 300 µl de isopropanol 96 % gelado para a precipitação do DNA. Os microtubos foram então invertidos 20 vezes manualmente para homogeneização e deixados à temperatura ambiente, em repouso, por 20 minutos. Seguiu-se mais uma etapa de centrifugação por 10 minutos a 12.000g. O sobrenadante foi descartado e o

precipitado foi lavado com 500 µl de álcool 70% por duas vezes consecutivas. As amostras precipitadas foram secas em temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 30µl de solução TE-RNase (Tris HCL 1 M pH= 8,0, EDTA à 0,5 M pH=8,0 e RNase a 10ng/mL).

DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE E DA QUALIDADE DO DNA PARA SEQUENCIAMENTO

Para o sequenciamento foram selecionadas somente as amostras com alta qualidade de DNA, uma vez que a qualidade do DNA reflete diretamente na qualidade das bibliotecas de DNA geradas. Primeiramente, verificou-se quantidade e qualidade com marcador fago *Lambda* através de gel de agarose 1%. A quantificação foi analisada no NanoDrop (*Thermo Scientific*) e Qubit® (*Invitrogen*), as amostras que apresentaram concentrações acima de 50 ng/microlitro foram selecionadas para sequenciamento. Foram definidas as relações de absorbâncias a 260/280 nm e 260/230 nm, obtidas pelo NanoDrop®,

O DNA genômico extraído foi enviado para a empresa Genone Soluções em Biotecnologia. Os isolados foram sequenciados pela técnica *Illumina Paired-End DNA* no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

ANÁLISE DE QUALIDADE DOS DADOS BRUTOS

O DNA genômico dos seis isolados MGa87, MTa91, SCi97, RSi59, TOi67, Mai68 foram preparados como bibliotecas de extremidades emparelhadas e sequenciado pela tecnologia *Illumina Genome Analyzer, paired end Sequencing*. Os dados brutos gerados pela plataforma Illumina foram recebidos em formato FASTQ.

Devido à grande quantidade de dados gerados a partir de uma única amostra, é usual conduzir a verificação da qualidade dos dados brutos, para a verificação de tendenciosidades. Para isto foi utilizada a ferramenta FastQC versão 0.11.9 (*Fast Quality Control*). O relatório das análises de qualidade dos resultados forneceu vários módulos e, dentre esses módulos, os mais importantes foram os seguintes: qualidade por sequência de base, a distribuição do conteúdo de GC e a taxa de duplicação (GUO et al., 2014).

MONTAGEM DO GENOMA.

Para a montagem do genoma, primeiramente foi conduzido o mapeamento/alinhamento das reads com o software *Bowtie* (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>), recomendado para alinhamento de sequências curtas. O genoma referência utilizado nas análises foi o isolado *Magnaporthe oryzae* 70-15, obtido no site *European Nucleotide Archive* (ENA), assim, os seis genomas foram mapeados/alinhados no genoma referência gerar um arquivo de mapeamento no formato SAM (CHEN et al., 2013; GLADIEUX et al., 2018). Os arquivos com os alinhamentos dos genomas foram classificados por coordenadas e indexados usando o software Picard para gerar e converter o arquivo SAM em BAM. Foi feita a montagem *de novo* no software Velvet versão 1.2.10 através do “Módulo Columbs”, com o auxílio do genoma referência (ZERBINO & BIRNEY., 2008). Para a montagem com o velvet existem dois passos que envolvem os dois executáveis disponíveis dentro do pacote: o *velveth* e o *velvetg*. O primeiro passo lê os arquivos com as sequências e constrói uma espécie de dicionário com todas as palavras possíveis dentro do número informado como parâmetro, e vai definir os alinhamentos. Após esse passo, o *velvetg*, lê os alinhados e constrói o gráfico “de Brujin” a partir dos alinhamentos e remove erros e continua simplificando o gráfico e resolvendo as repetições.

IDENTIFICAÇÃO DOS SNPS

Para a identificação dos SNPs utilizamos o alinhamento gerado pelo software *Bowtie*. Para a identificação das variantes, utilizamos o pipeline NGSEP versão 3.3.2 (DUITAMA et al., 2014), executando o módulo *FindVariants* para todos os seis isolados. O índice máximo de qualidade de base foi definido para 40; uma base nas extremidades 5' e cinco bases na extremidade 3' de cada leitura foram ignoradas. O número máximo de *reads* permitidas para iniciar na mesma posição foi definido em 100. Por fim, a taxa de heterozigozidade foi definida como 0 e a ploidia 1, já que o fungo é haploide (KORINSAK et al., 2018). Os arquivos VCF produzidos nesta etapa foram usados no módulo *MergeVariants*, para a obtenção da lista de variantes de cada amostra. Posteriormente, todas as amostras foram genotipadas, executando o módulo *FindVariants* novamente, mantendo todos os parâmetros inalterados, exceto pelo índice mínimo de qualidade das variantes, definidos como zero. Finalmente, o módulo *MergeVCF* foi usado para unir todos os VCFs em um único arquivo. Para a filtragem

dos dados, utilizamos o filtro de índice de qualidade de genotipagem, que possui a função de excluir todos os genótipos com índice de qualidade abaixo do limite especificado, tendo confiança na escala de Phred de que o genótipo verdadeiro é aquele fornecido nos genótipos chamados.

Após a filtragem dos dados, foi feita a identificação dos SNPs. Primeiramente, foi feita a busca pelos 12 genes de avirulência Tabela 2, conhecidos, para identificamos a sequência de DNA de cada gene de avirulência no NCBI (*National center for biotechnology information*). Após a identificação da sequência de DNA de cada gene, foi feito *BLAST* (*Basic local alignment search tool*) com as sequências encontradas, ao genoma referência 70-15 (MG8) no *Ensembl Fungi*, identificando assim a posição de cada gene de avirulência. Com as posições identificadas de cada gene, estas foram confrontadas manualmente no genoma de cada isolado, em tabela Excel e no Tassel versão 5.2.63, identificando assim SNPs ligados a genes de avirulência. A identificação de Transição e transversão foi realizada no software SnpEff.

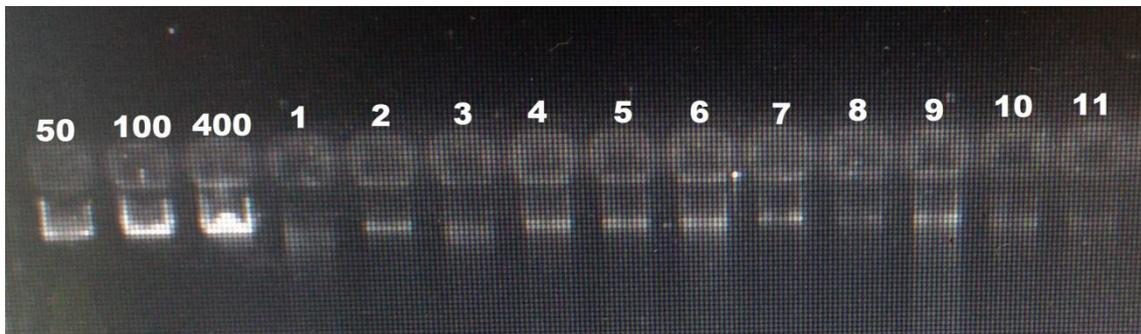
RESULTADOS E DISCUSSÃO

QUALIDADE DO DNA PARA SEQUENCIAMENTO

O protocolo utilizado para a extração de DNA foi desenvolvido pelo Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária de Goiás para extração de DNA de plantas, utilizado na pesquisa por seleção assistida. Foi necessário repetir a extração de DNA por mais vezes, para obtenção de DNAs adequados para sequenciamento.

Durante as primeiras extrações obteve-se uma alta proporção de degradação de DNA entre as amostras. Foi necessário ajustar o processo de maceração para a obtenção de amostras de DNA íntegras, a maceração do tecido de maneira manual na presença de nitrogênio líquido. Com essa modificação, foi possível reduzir expressivamente a degradação de DNA. Assim, foi possível obter amostras íntegras de DNA genômico de *M. oryzae* com alta qualidade e quantidade adequada para a metodologia desejada (Figura 5).

Figura 5: Quantificação de DNA dos seis isolados de *Magnaporthe oryzae* em Gel de



agarose a 1%. Nos primeiros poços do gel está representado pelo o marcador de peso molecular fago λ (50, 100 e 200 ng/ μ L), e nos respectivos poços temos: 2: MTa91, 4: TOi67, 6: RSi59, 7: MGa87, 8: MAi68, 10: SCi97.

Ao analisar as amostras de DNA genômico no NanoDrop foram obtidos valores de absorbâncias OD_{260/280} acima de 2,0 e na relação de absorbâncias OD_{260/230}, relações acima de 1,8. Desta forma, foram selecionadas para o sequenciamento somente as amostras com relações entre 2,0 e 1,8, respectivamente (Tabela 5), uma vez que valores inferiores indicam a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvem luz em comprimentos de onda próximos a 280 nm (SOUZA, 2019; NanoDrop, 2009).

Tabela 5: Quantidade e qualidade de DNA de acordo com nanodrop e Qubit, dos isolados de *M. oryzae* que foram enviados para sequenciamento

Isolados	Vol (μ l)	Conc. <i>Qubit</i> (ng/ μ l)	OD260/280	OD 260/230
MGa87	20	46,6	2,08	2,08
MTa91	21	38,8	2,02	1,96
SCi97	65	15,4	2,03	2,09
RSi59	40	46	2,06	1,85
TOi67	35	40,8	2,09	2,03
Mai68	35	38,4	2,07	1,83

ANÁLISE DE QUALIDADE DO *FastQC*

Qualidade da sequência por base

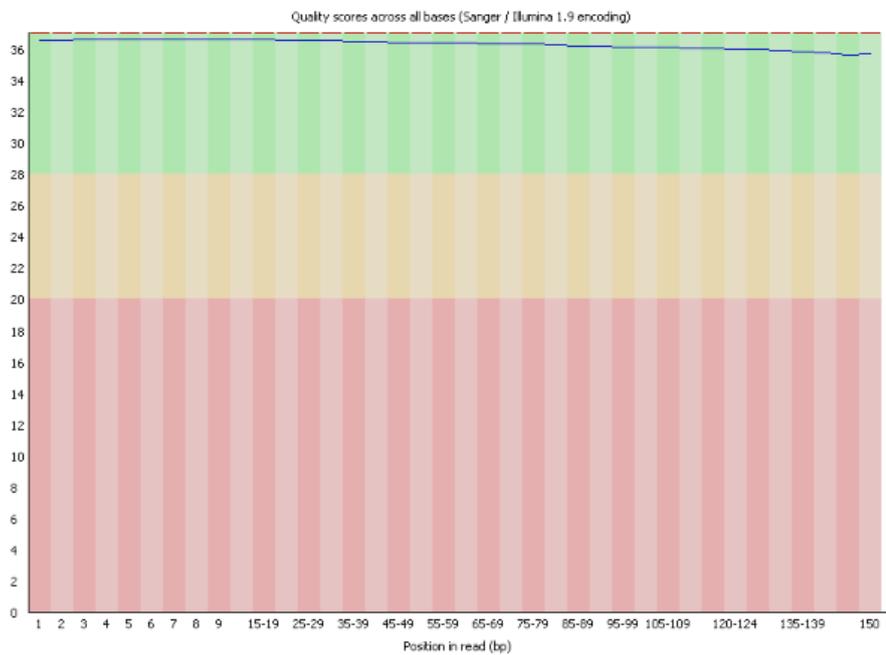


Figura 6: Análise de qualidade das sequências por base

A qualidade por sequência de base exibe uma visão geral dos intervalos de valores de qualidade *phred* em função da posição da base na *read*. O gráfico de análise

de qualidade por base Figura 6 permite a visualização da faixa de valores médios de qualidade das bases em cada posição das *reads*. No eixo x, estão às posições da base na *read* (como em cada *read* há em média 150 bases lidas, então a escala do eixo x vai de 1 a 150), e no eixo y, os valores da qualidade média das bases dessa posição na *read* na escala *Phred*, conforme mostrado na Figura 3. O gráfico é dividido verticalmente em três faixas de qualidade, com cores diferentes, sendo: 1 erro a cada 1.000 (verde), 1 erro em 100 (laranja), 1 erro em 10 (vermelho). Observa-se, que a qualidade de sequência por base está ótima, uma vez que a qualidade das bases está acima de 30 Figura 6. Isso significa que de acordo com o índice probabilístico do algoritmo *Phred* (Tabela 2) há uma probabilidade de 1 em 1000 chances da base estar incorreta em cada uma das *reads*.

Tabela 4: Probabilidade de erro por base pelo o índice probabilístico do algoritmo de *Phred*.

Qualidade Phred	Precisão em 1%	Probabilidade de Erro
10	90%	1 em 10
20	99%	1 e 100
30	99,9%	1 em 1.000
40	99,99%	1 em 10.000
50	99,999%	1 em 100.000
60	99,9999%	1 em 1.000.000

O gráfico apresenta também mensuração do conteúdo de GC (guanina e citosina) em relação à AT (adenina e timina), ao longo de todo comprimento de cada sequência, em um arquivo, e compara com a distribuição normal. A distribuição normal estimada das frequências das bases GC está representada na linha azul e a distribuição observada

nas sequências na linha vermelha. (Figura 7). O eixo do X indica os valores percentuais médios do conteúdo GC dos *reads* e o eixo dos Y a frequência destes *reads*. Podemos analisar que o gráfico mostra basicamente uma coincidência entre as linhas azul e vermelha e o pico central alinhado com a distribuição normal um pico desregular, indicaria que a biblioteca estaria contaminada, mas nesse caso o pico se apresenta regular, indicando assim, a ausência contaminação da biblioteca.

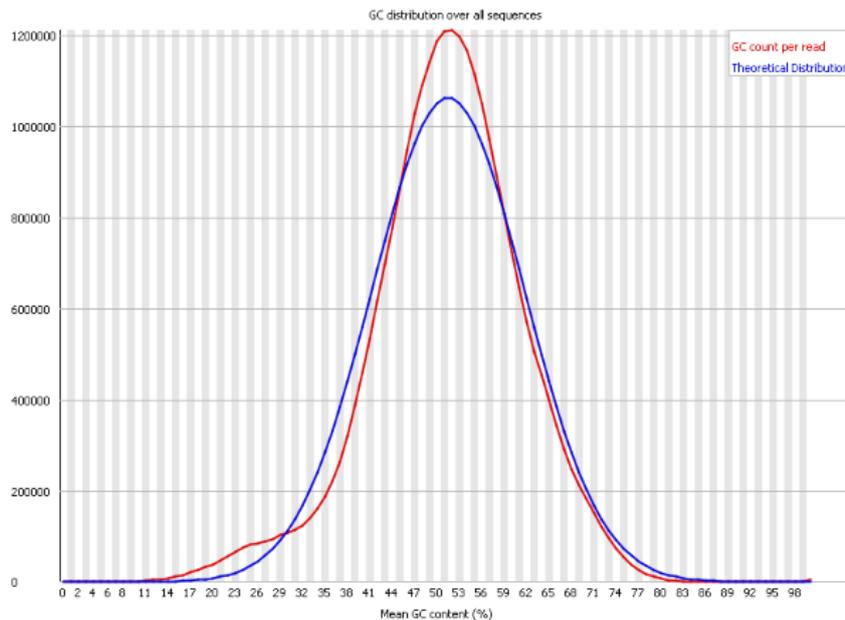


Figura 7: Gráfico de frequência de conteúdo GC.

Níveis de duplicação de sequência

Quando, a partir do genoma se prepara a biblioteca de sequenciamento, existe o risco de que parte do genoma seja preferencialmente incorporado ou seja, parte do genoma estaria mal representado. A maneira de se medir a equidade da representação é dada pela mensuração da duplicação de sequências, onde excesso de duplicação indica viés de representatividade, Figura 8. A linha azul mostra as sequências duplicadas. Como esta linha mostra maior proporção de sequências duplicadas (eixo X) para os níveis de duplicação baixos (1 a 4 no eixo X), o viés de representatividade dos genomas nas bibliotecas não foi representativo. A linha azul pode surgir a presença de duplicação de maneira geral e a vermelha dos grupos de níveis de duplicação

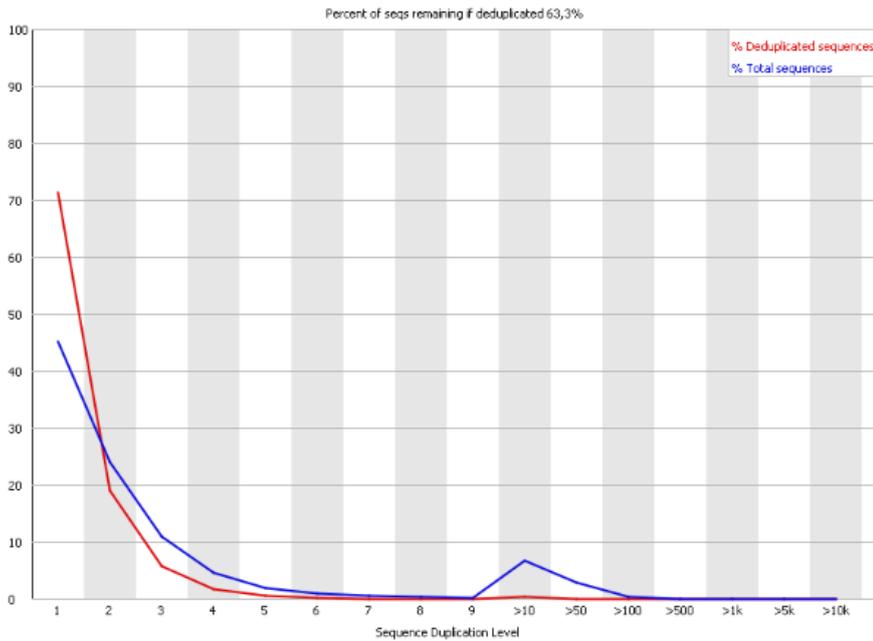


Figura 8: Proporção de sequencias duplicadas (eixo Y) segundo os níveis de duplicação (eixo X).

SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM DO GENOMA

O total de leituras brutas dos genomas sequenciados variou de 8,12 GB a 10,6 GB o que representou uma média 43 a 44x de cobertura de sequenciamento. As leituras de extremidade emparelhadas foi de 150 pb para todos os isolados, (tabela 6), dados fornecidos pela empresa que realizou o sequenciamento.

A taxa de mapeamento total entre os isolados com o genoma referência tiveram resultados próximos, para o RSi59, de 87,77%; TOi67, 85,18%; MAi68, 85,33%; MGa87, 83,87%; MTa91, 85,27% e SCi97 85,91%. Portanto, em média, aproximadamente 85% das leituras mapeadas de alta qualidade alinharam com o genoma referência.

Tabela 6: Resumo do sequenciamento dos seis genomas de *Magnaporthe oryzae*. Leituras brutas (número total de bases sequenciadas, qualidade das sequências das reads, porcentagem GC, cobertura de sequenciamento e comprimento de sequência).

RSi59	TOi67	MAi68	MGa87	MTa91	SCi97
-------	-------	-------	-------	-------	-------

Leituras brutas	24.581.466	31.159.009	30.314.238	23.748.421	27.094.984	28.909.594
Leituras brutas (GB)	8,41GB	10,6 GB	10,3GB	8,12GB	9,27GB	9,89GB
Q20 (%)	98,33	98,17	97,93	97,90	97,99	98,07
Q30 (%)	95,19	94,84	94,22	94,39	94,55	94,60
GC%	50,26	50,62	49,70	49,19	50,73	51,34
Cobertura (X)	43x	44x	44x	43x	43x	43x
Comprimento de sequência	150pb	150pb	150pb	150pb	150pb	150pb

IDENTIFICAÇÃO DOS SNPS

Para a identificação de SNPs, foram comparados os seis genomas dos isolados de campo ao genoma referência. Foi identificado um total de 80.468 polimorfismos diferenciais, identificados como SNPs. Para o cromossomo um, identificamos: 25.346 SNPs; cromossomo dois: 12.644 SNPs; cromossomo três: 11.773 SNPs; cromossomo quatro: 6.756 SNPs; cromossomo cinco: 7.509 SNPs; cromossomo seis: 11.155 SNPs; cromossomo sete: 5.285 SNPs. Encontramos distribuição desigual de SNPs nos sete cromossomos. Os locais com mais polimorfismos estão localizados no cromossomo um, enquanto que no cromossomo sete, o menor, menos polimorfismos foram identificados.

Somente 42 SNPs, foram encontrados ligados a genes de avirulência ao total desses seis genomas. Nos genes de avirulência, observamos que houve mais variação entre os genótipos MGa87, MTa91 e RSi59, e os cromossomos que mais apresentaram polimorfismos foram o 3 e o 7, ligado aos genes *Avr-Pita*, *Avr-Pii*, *Avr-Pitz-t*, *Avr-Pik/k/m* e *Avr-Pi54*.

Foi possível encontrar nove SNPs ligados a genes de avirulência para o gene *Avr-Pita*, sendo que para este gene todos o genótipos diferenciaram-se do genoma de referência. No caso do gene *Avr-Pi54* foram oito SNPs em relação ao genoma de

referência, somente para três dos genótipos estudados, MGa87, MTa91, RSi59.

Para o *Avr-CO39*, foi encontrado um único SNP apenas nos genótipos MGa87 e MTa91. Para o *Avr-Pitz-t* foram sete SNPs para os genótipos TOi67 e Mai68; para *Avr-Pii* foram 10 SNPs para o genótipo MGa87 e, por fim, foram três SNPs para o *Avr-Pik/k/m* nos genótipos TOi67 e Mai68, como mostra a Tabela 8.

Não há polimorfismos ligados a genes de avirulência nos cromossomos 2 . Os cromossomos que mais apresentaram polimorfismos foram o 3 e o 7, ligado aos genes *Avr-Pita*, *Avr-Pii*, *Avr-Pitz-t*, *Avr-Pik/k/m* e *Avr-Pi54* .De acordo com Yoshida et al. (2002), a presença ou ausência de polimorfismos de genes efetores, podem estar associados a regiões genômicas instáveis próximas às extremidades dos cromossomos. Essa instabilidade é explicada devido ao gene, como por exemplo o gene *Avr-Pita*, que está localizado na região telomérica do cromossomo, onde a maioria dos genes *Avr* clonados até o momento está localizada (BAO-HUA, 2017): translocações inter-cromossômicas, reconstruções estruturais e variações no comprimento dos cromossomos são mais prováveis de serem observadas no final das regiões dos telômeros. Portanto, é esperado que regiões específicas de isolados que estão localizados em extremidades cromossômicas forneçam novos efetores e fatores relacionados à patogenicidade para conduzir a evolução do genoma (ELLIS et al., 2009; ZHANG e XU, 2014).

O número total de transições detectados foram 237.929, sendo maior que o número total de transversões, de 92.501. A proporção de de transições para transversões (Ts/Tv) foi ~ 2,5, em média, nos seis isolados. Obtivemos 2,56; 2,63, 2,64, 2,62, 2,48, 2,57 na razão de transição (A ↔ G ou C ↔ T) e para transversões (A ↔ C, G ↔ T) Ts/Tv, RSi59, TOi67, Mai68, MGa87, MTa91, SCi97, respectivamente, como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Proporção de transição e transversão (Ts/Tv).

	Transição	Transversão
RSi59	38.347	14.962
TOi67	44.705	16.998
Mai68	46.030	17.436
MGa87	30.418	11.588
MTa91	34.636	13.962
SCi97	43.793	17.555
Total	237.929	92.501

A razão de Ts/Tv refere-se ao número de SNPs originados por transição dividida pelo número de SNPs causados por transversões (VIGNAL, 2002), fato que pode ser explicado pela alta taxa de deaminação espontânea da 5-metil-citosina em timina em dinucleotídeos CpG (COULONDRE, 1978). Em *M. oryzae*, além do presente estudo, onde os valores de Ts/Tv variam 2,48 a 2,64. DePristo et al. (2011) mostraram valores similares. Apesar do número possível de transversões ser duas vezes maior do que o de transições, o que se observa é que a ocorrência de transições é maior do que de transversões. As mutações do tipo *Ts* são mais frequentes que as mutações do tipo *Tv* porque as mutações *Ts* acontecem entre nucleotídeos da mesma família nucleotídica, isto é, entre purinas (A/G) ou entre pirimidinas (C/T), ao contrário das substituições do tipo *Tv* que acontecem entre nucleotídeos de famílias diferentes (MELO, 2015; WAKELEY, 1996).

Tabela 8: Identificação dos marcadores SNPs ligados a genes de avirulência em *M. oryzae*.

Gene/Id gene	Cromossomo	Posição	SNP	Isolado
<i>Avr-Pita MGG_15212</i>	3	1.127.723	C / T	MGa87e MTa91
<i>Avr-Pita MGG_15370</i>	6	502.966 e 503.547	C / G	TOi67, SCi97 e RSi59, MAi68
<i>Avr-Pi54 MGG_16756</i>	3	2.528.725	C / T	MGa87 e MTa91
<i>Avr-Pi54 MGG_16756</i>	5	3.005.688, 3.006.458	A / G	RSi59
<i>Avr-CO39 MGG_11784</i>	1	3.487.864	C / T	MGa87 e MTa91
<i>Avr-Pitz-t MGG_18041</i>	7	2.532.427	C / A	TOi67e MAi68
<i>Avr-Pii MGG_18010</i>	7	2106536	T / A	MGa87
<i>Avr-Pii MGG_04927</i>	3	3.982.402	T / G	MGa87
<i>Avr-Pik/k/m MGG_15972</i>	7	8.229.774	C / G	TOi67 e MAi68

Um dos usos da detecção de SNPs será desenhar marcadores SNPs para poder estudar populações e então identificar quais os genes que possuem mais variabilidade genética, ou seja, desenhar *primers* das regiões dos genomas que possuem polimorfismos ligados a genes de avirulência (GOWDA et al., 2015). Anteriormente a esse trabalho foram desenhados *primers* para os genes de avirulência, porém o sequenciamento direto dos produtos de PCR (sem clonagem) fornecia sequenciamentos de qualidade insuficiente para identificação de SNPs (dados não publicados). Assim, foi mais viável, considerando os custos, o sequenciamento dos genomas completos para identificação dos SNPs. Com os genomas completos, o número de dados é grande, não tendo sido possível explorá-los no tempo previsto neste trabalho. Até aqui, destacamos somente os genes de avirulência, alcançando o objetivo principal do projeto que viabilizou o financiamento do trabalho, e esperamos os dados restantes sejam trabalhados futuramente.

A partir da identificação dos polimorfismos dos isolados brasileiros, e a comparação com os marcadores moleculares e genes importantes hoje na seleção

assistida, será possível otimizar o recurso disponível e desenhar pares de *primers* para um ou mais SNPs específicos para PCR em tempo real, e assim fazer um projeto de pesquisa para estudar polimorfismos do patógeno em um número maior de indivíduos. Esperamos então que os resultados do presente trabalho sejam efetivos em proporcionar a compreensão das populações do patógeno, em diferentes regiões do país, nas variações quanto a sua virulência, ajudando instituições brasileiras a tomar medidas efetivas para a seleção de resistência durável, prevenindo mutações do patógeno.

Em conjunto com essa medida, estão desenhados e testados, em dados não publicados e não constantes nesse trabalho, *primers* para amplificar os genes de avirulência inteiros, por PCR convencional. Eles também podem ser auxiliares na confirmação da presença dos genes ou do número de cópias desses genes, nos isolados já sequenciados ou outros isolados, e eventuais estudos de polimorfismo, via sequenciamento direto ou clonagem dos genes..

Para o desenho de marcadores, será inútil partir de genes como o primeiro gene de avirulência sequenciado, o *ACE1*, pois explica somente a diferença para resistência a outra espécie, e não explica reação diferencial entre espécies de arroz (BÖHNERT *et al.* 2004). Também genes como o CO39, para o qual já há muita quebra de resistência, o marcador SNP não deve ser tão útil (LEON, 2008; RIBOT *et al.*, 2013). Assim, caso seja feito o desenho de *primer* para detecção em PCR em tempo real, será preferível escolher genes relevantes hoje em dia para o melhoramento, como *Pii*, *Pia*, *Pi54*.

Outros genes podem ter papel muito grande na virulência e, portanto deve ser importante também estudar seus polimorfismos. Primeiramente, pode ser importante estudar os efetores, ou moléculas excretadas pelo patógeno durante a infecção. Já tendo o sequenciamento dos genomas, é possível realizar a predição de efetores, utilizando como principal ferramenta a existência de pepitídeos sinal. Pode-se usar programas para anotação genômica com o programa *Signal P* (EMANUELSSON *et al.*, 2007), uma vez que com isolados brasileiro nada ainda foi feito

Outra forma é usar sequenciamento genômico associado à fenotipagem da reação de doença de diferentes isolados e cultivares, em um estudo de associação genética (GWAS, *genome-wide association study*). O GWAS está cada vez mais sendo utilizado para o mapeamento genético de *M. oryzae* como poderosa ferramenta de

estudar a diversidade genética e identificar as regiões genômicas específicas associadas à virulência de *M. oryzae*, e sua diversidade (GANESHAN et al., 2018; BURGHARDT, YOUNG e TIFFIN, 2017). Nos estudos de Mutiga et al. (2017), linhagens de arroz com a presença de genes conhecidos de resistência à brusone, ou sem eles, foram inoculados com diferentes linhagens do patógeno. A análise de regressão múltipla teve como principal objetivo validar, para as diferentes linhagens e isolados, os genes efetores de efeito principal. Dessa forma, a relação entre SNPs do patógeno e virulência de isolados foi estudada com base na correlação com escores de doença. Entre os genes mais fortemente associados à virulência dos isolados estava um de resistência a fungicidas (GANESHAN et al., 2018). Dessa forma, selecionamos dois isolados brasileiros com resistência a fungicida, extraímos DNA e enviamos para sequenciamento. Esperamos que os novos três genomas, dois resistentes e um controle, possam ser alinhados aos genomas sequenciados neste trabalho, e estudados os SNPs desses genes que conferem resistência a fungicidas.

MONTAGEM DO GENOMA

Foi feita uma montagem de novo, na qual as leituras de sequenciamento foram primeiro mapeadas para o genoma de referência do isolado 70-15 para gerar um arquivo de mapeamento, com o intuito de auxiliar na montagem, os arquivos de mapeamento foram então inseridas no programa Velvet com o módulo Columbs. Conforme mostrado na Tabela 7, os conjuntos de dados dos seis genomas montados foram semelhantes, sendo o tamanho de todos genomas em torno de 41 MB, ligeiramente maiores que o genoma de referência 70-15, com 39.4 (MB). Os tamanhos de *K*-mer utilizados para os seis isolados não foram iguais para todos, isso se deve a problemas causados por leituras não uniformes que pode gerar lacunas e ramificação, ou seja, regiões repetidas. Existem partes do genoma que montam melhor com *K* menor; outras, com *K* maior, devido a diferentes formas para distribuição de leituras (TEIXEIRA, 2018). Então, para os isolado RSi59, MTa91 e SCi97, utilizou-se o *K*-mer de 31; enquanto que para os isolados TOi67 e MGa87, o *K*-mer foi 41. Para o isolado MAi68 somente, o *K*-mer foi 67.

Tabela 7: Montagem de novo de seis isolados brasileiros isolados de campo *Magnaporthe oryzae*. Tamanho total, número, e tamanho médio de *contigs*, N50, conteúdo de GC. Tamanho máximo de *contigs*, taxa de mapeamento total das *reads*.

	RSi59	TOi67	MAi68	MGa87	MTa91	SCi97
Tamanho total <i>contigs</i> (Mb)	40.5	41.6	43.1	41.3	41.3	41.3
Nº de <i>contigs</i>	10.471	11.758	13.936	12.419	10.846	11.372
Tamanho médio de <i>contigs</i> N50 (Kb)	3872.65	3545.91	3097.84	3328.61	3815.52	3637.55
Conteúdo de GC (%)	51.4	51.2	51.0	53.3	51.3	51.4
Tamanho máx de <i>contigs</i> (Kb)	213,448	373,027	271,806	419,490	454,495	346,222
Mapeamento das <i>reads</i>	87,77%	85,18%	85,33%	83,87%	85,27%	85,91%

A análise do genoma indicou que os seis isolados possuem o genoma similar ao genoma referência 70-15 e a outros genomas já sequenciados (CHEN et al., 2013; GOWDA et al., 2015; XUE et al., 2012; ZHENG et al., 2018). O primeiro genoma de *Magnaporthe oryzae* sequenciado foi o 70-15 por uma abordagem *shotgun* de genoma completo. O tamanho dos seis genomas brasileiros sequenciados possui em média 41 (MB), sendo considerado ligeiramente maior que o 70-15, que possui 39,4 (MB) (CHEN et al., 2013). O conjunto dos seis genomas possui alta precisão de sequências, pois 99,9% das bases têm índices de qualidade superiores a 30, em comparação ao genoma 70-15, que possui alta precisão de sequência de 96% das bases, com pontuações de qualidade superiores a 40, resultando em ótima qualidade de montagem (DEAN et al., 2005). Os seis genomas tiveram uma cobertura de 43 a 44 de sequenciamento, facilitando assim a identificação de polimorfismos SNPs, por ter maior precisão dos dados. Em relação aos genomas de trigo de Glaudieux et al (2018). Os tamanhos dos genomas foram relativamente parecidos variando entre 41,5 e 44,8 (MB), com coberturas de cerca de 43 a 44 vezes, com montagem do genoma completo no Velvet.

O número de *contigs* dos genomas montados foi para o isolado RSi59, 10.471; para TOi67, 11.758; para MAi68, 13.936; para MGa87, 12.419; para MTa91, 10.846 e para SCi97, 11.372. O N50 ficou entre 3097.84 a 3872.65, e o comprimento máximo de variou entre 213.448 bases a 494.495bases, tamanho aproximadamente equivalente aos isolados FJ81278, de 676.400 bases b; e HN19311 de 698.200 bases, obtidos por CHEN et al.(2013).

O conteúdo de GC da montagem é de 51%, semelhante aos genomas de isolados de *Pyricularia* de diferentes plantas hospedeiras, que variam de 48,60 a 51% (ZHENG et al.,2018). O conteúdo de GC tem sido utilizado como uma espécie de “impressão digital” dos organismos (GERHARDT; CORSO, 2006), pois a interação entre guanina-citosina (GC) é mais estável do que a timina-adenosina (AT). A interação entre guanina e citosina nas moléculas de DNA de uma fita e outra é feita por três ligações de hidrogênio, enquanto que entre adenina e timina há somente duas. Portanto, quanto maior for o conteúdo GC mais estável será a sequência (YAKOVCHUK; PROTOZANOVA; FRANK-KAMENETSKII, 2006).Com a montagem genômica, nossas análises poderão facilitar a identificação de novos efetores de genes Avr a abordar mais os mecanismos moleculares do patógeno e coevolução do hospedeiro.

CONCLUSÃO

- Foi identificado um total de 80.468 polimorfismos diferenciais, identificados como SNPs, para os seis isolados de campo RSi59, TOi67, Mai68, MGa87 e MTa91, SCi97;
- Apenas 42 SNPs estão ligados a genes de avirulência, para os genes *Avr-Pita*, *Avr-Pii*, *Avr-Pitz-t*, *Avr-Pik/k/m* e *Avr-Pi54*, *Avr-CO39*.
- Com esses dados esperamos em um futuro próximo desenhar *primers* para a validação desses marcadores SNPS
- O conjunto dos seis genomas possui alta precisão de sequências, pois 99,9% das bases têm índices de qualidade superiores a 30.
- Os genomas montados tiveram uma média de 11.800 *contig*;
- Com os resultados do genoma montado, acreditamos que estão aptos para novos estudos, como: anotação genômica e predição genômica.

REFERÊNCIAS

ASHIKAWA, I.; HAYASHI N, YAMANE, H.; KANAMORI, H.; WU, J.; MATSUMOTO, T.; ONO, K.; YANO, M. Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer *pikm*-specific rice blast resistance. *genetics*, v.180, p. 2267–2276, 2008.

BEDENDO, I. P. Doenças do arroz. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. et al. Manual de fitopatologia: **Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Esalq, 1997, p.84-88.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (ed.) **Manual de fitopatologia**. v.1, 3 ed., São Paulo: Agronômica Ceres, p. 919, 1995.

BÖHNERT, H. U., FUDAL, I.; DIOH, W.; THARREAU, D. ; NOTTÉGHEM, J. L. *et al.*, 2004. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. **Plant Cell**, v. 16 p. 2499–2513, 2004.

BRYAN, G. T.; WU, K. S.; FARRALL, L.; JIA, Y.; HERSHEY, H. P.; MCADAMS, S. A.; FAULK, K. N.; DONALDSON, G. K.; TARCHINI, R. VALENT, B. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **The Plant Cell**, v. 12, p. 2033–2046, 2000.

CAMARGO, L. E. A.; . Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: Bergamim filho, A.; KIMATI, H.; AMORIRM, L. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**, p.455-469, 1995.

CANNON, S.B., ZHU, H.; BAUMGARTEN, A.M.; SPANGLER, R.; MAY, G.; COOK, D.R.; YOUNG, N.D. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. **J Mol Evol**, v. 54 p.548-562, 2002.

CAO, J.; YU, Y.; HUANG, J.; LIU, R.; CHEN, Y.; LI, S.; and LIU, J. Genome re-sequencing analysis uncovers pathogenicity-related genes under going positive selection in *Magnaporthe oryzae*. **Sci China Life**, v.60, p1–11, 2017.

CASELA, C. R.; GUIMARÃES, F. B. Rotação de genes no manejo da resistência a doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo**, v. 13, p. 321-349, 2005.

CESARI S.; KANZAKI H.; FUJIWARA, T.; BERNOUX, M.; CHALVON, V.; KAWANO, Y.; SHIMAMOTO, K. DODDS, P.; TERAUCHI, R.; KROJ, T. The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. **The EMBO Journal**, v.33, p. 1941–59, 2014.

CESARI, S.; THILLIEZ, G.; RIBOT, C.; CHALVON, V.; MICHEL, C.; JAUNEAU, A.; RIVAS, S.; ALAUX, L.; KANZAKI, H.; OKUYAMA, Y.; JEAN-BENOIT-MOREL FOURNIER E, THARREAU, D. TERAUCHI, R. KROJA, T. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-*Pia* and AVR1-CO39 by direct binding. **The Plant Cell**, v. 25, p. 1463–1481, 2013.

CHAIPANYA, C.; TELEBANCO-YANORIA, M. J.; QUIME, B.; LONGYA, A.; KORINSAK, S.; KORINSAK, S.; TOOJINDA, T.; VANAVICHIT, A.; JANTASURIYARAT, C.; ZHOU, B. Dissection of broad-spectrum resistance of the Thai rice variety Jão Hom Nin conferred by two resistance genes against rice blast. **Rice**, p. 10-18, 2017

CHAIPANYA, C.; TELEBANCO-YANORIA, M. J.; QUIME, B.; LONGYA, A.; KORINSAK, S.; BAFIELD, M. J. Polymorphic residues in rice NLRs expand binding and response to effectors of the blast pathogen. **Nat. Plants** v.4 p.576-585, 2018.

CHEN, C.; LIAN, B.; HU, J.; ZHAI, H.; WANG, X.; VENU, R. C.; LIU, E.; WANG, Z.; CHEN, M.; WANG, B. Genome comparison of two *Magnaporthe oryzae* field isolates reveals genome variations and potential virulence effectors. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p.887, 2013.

CHEN, S. et al. Genome-wide study of an elite rice pedigree reveals a complex history of genetic architecture for breeding improvement. **Scientific reports**, v.7, p.45685, 2017.

CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B. & STASKAWICZ, B. J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell** v.4 p 803-814, 2006.

De la CONCEPCION, J. C.; FRANCESCHETTI, M.; MAQBOOL, A.; SAITOH, H.; TERAUCHI, R.; KAMOUN, S.; BANFIELD, M. J. Polymorphic residues in rice NLRs expand binding and response to effectors of the blast pathogen. **Nat.Plants** v.4, p.576-585, 2018.

DEAN, R. A., TALBOT, N. J., EBBOLE, D. J. et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature** v. 434 p.980-986, 2005.

DEVANNA, N. B.; VIJAYAN, J.; SHARMA, T. R. The Blast Resistance Gene Pi54 of *Oryza officinalis* Interacts with *Avr-Pi54* through Its Novel Non-LRR Domains. **Plos One**, v. 9, n. 8, p.104840 2014.

DUITAMA, J.; QUINTERO, J. C.; CRUZ, D. F.; HUBMANN, G.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J.M.; e TOHME, J. "Uma estrutura integrada para descoberta e genotipagem de variantes genômicas de sequenciamento de alto rendimento experimentos ", **Nucleic Acids Research** , vol. 42, p. 44-44, 2014.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 953-971, 2007.

FAO 2020 <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

FARMAN, M. L.; LEONG, S. A. Chromosome walking to the *AVR1-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: Discrepancy between the physical and genetic maps. **Genetics**, v.150, p. 1049–1058, 1998.

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

FUJISAKI K.; ABE, Y.; ITO, A.; SAITOH, H.; YOSHIDA, K.; KANZAKI, H. KANZAKI, E.; UTSUSHI, H.; YAMASHITA, T.; KAMOUN, S.; TERAUCHI R. Rice Exo70 interacts with a fungal effector, *AVR-Pii*, and is required for *AVR-Pii*-triggered immunity. **The Plant Journal**, v.83, p.875–887, 2015.

GANESHAN, Veena Devi et al, A Genome-Wide Association Study Identifies SNP Markers for Virulence in *Magnaporthe oryzae* Isolates from Sub-Saharan Africa, **bioRxiv**, p. 418509, 2018.

GERHARDT, N. L. G. J.; CORSO, G. Network clustering coefficient approach to DNA sequence analysis. *Chaos, Solitons and Fractals*, v. 28, p. 1037–1045, 2006.

GLADIEUX, P.; CONDON, B.; RAVEL, S.; SOANES, D.; MACIEL, J. L. N.; NHANI, A. Jr.; et al . Gene Flow between Divergent Cereal- and Grass-Specific Lineages of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **mBio**, v. 9 p. 01219-17, 2018.

GOFF, S. A., RICKE, D., LAN, T. H., PRESTING, G. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science** v. 296 p. 92-100, 2002.

GÓMEZ, J. O. O.; LIGARRETO, G. A. Caracterización morfo agronómica del banco de germoplasma de FEDEARROZ-FNA en tres ambientes del trópico colombiano, Agronomía costarricense: **Revista de ciencias agrícolas**, v. 43, n. 2, p. 139–155, 2019.

GOWDA, M.; SHIRKE, M. D.; MAHESH, H.B.; CHANDARANA, P.; RAJAMANI, A.; CHATTOO, B. B. Genome analysis of rice-blast fungus *Magnaporthe oryzae* field isolates from southern India. **Genomics Data**, v. 5, p. 284-291, 2015.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S. K.; PARK, S. W. Genes de resistência a doenças de plantas: status atual e direções futuras. **Physiol Mol Plant Pathol**, v. 78, p. 51-65, 2012.

HAMMONDKOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**, p.1102-1156, 2000.

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A. Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology*, Orlando, v.13, p.403-418, 1989.

INOUE, Y.; VY, T.; YOSHIDA, K.; ASANO, H.; MITSUOKA, C.; ASUKE, S.; ANH, VL; CUMAGUN, CJR; CHUMA, I.; TERAUCHI, R.; KATO, K.; MITCHELL, T.; VALENT, B.; FARMAN, M.; TOSA, Y. Evolution of the wheat blast fungus through functional losses in a host specificity determinant. **Science**. V. 7;p.80-83, 2017.

ISLAM, M. T.; CROLL, D.; GLADIEUX, P. *et al.* O surgimento da explosão do trigo em Bangladesh foi causado por uma linhagem sul-americana de *Magnaporthe oryzae*. **BMC Biol.**v. 14, p. 84, 2016.

JIA, Y.; MCADAMS, S. A.; BRYAN, G. T.; HERSHEY, H. P.; VALENT, B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO J.** 2000 v. 19 p. 4004-14.

KANG, S.; SWEIGARD, J. A.; VALENT, B. The *PWL* host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, p. 939–948, 1995.

KANZAKI,H.; YOSHIDA, K.; SAITOH, H.; FUJISAKI, K.; HIRABUCHI, A.; ALAUX, L.; FOURNIER, E.; THARREAU, D. Terauchi R Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-*Pik* and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. **Plant J** v. 72, p. 894–907, 2012.

KORINSAK, S.; TANGPHATSORNRUANG, S.; POOTAKHAM, W.; WANCHANA, S.; PLABPLA, A.; JANTASURIYARAT, C.; PATARAPUWADOL, S.; VANAICHIT, A.; TOOJINDA, T.. Genome-wide association mapping of virulence gene in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* using a genotyping by sequencing approach. **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 661-668, 2019.

LIU, J.; WANG, X.; MITCHELL, T.; HU, Y.; LIU, X.; DAI, L.; WANG, GUO-LIANG. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 3, p. 419-427, 2010.

LIU, MING-HAO; KANG, H.; XU, Y.; PENG, Y.; WANG, D.; GAO, L.; WANG, X.; NING, Y.; WU, J.; LIU, W. Genome-wide association study identifies an NLR gene that confers partial resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 6, p. 1376-1383, 2019.

LONGYA, A.; CHAIPANYA, C.; FRANCESCHETTI, M.; MAIDMENT, J. H. R.; BANFIELD, MARK J.; JANTASURIYARAT, C. Gene Duplication and Mutation in the Emergence of a Novel Aggressive Allele of the AVR-Pik Effector in the Rice Blast Fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 32, n. 6, p.740-749, 2019.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**. v. 27, p. 161-168, 1997.

MCHALE, L.; TAN, X.; KOEHI, P. et al. Proteínas NBS-LRR de plantas: protetores adaptáveis. **Genome Biol**, v.7, p.212, 2006.

MGONJA, E. M.; BALIMPONYA, E. G.; KANG, H.; BELLIZZI, M.; PARK, CHAN HO; L.; MABAGALA, R.; SNELLER, C.; CORRELL, J.; OPIYO, S. Genome-Wide Association Mapping of Rice Resistance Genes Against *Magnaporthe oryzae* Isolates from Four African Countries. **Phytopathology**, Cientific Societies, v. 106, n. 11, p. 1359-1365, 2016.

MIKI, S.; MATSUI, K.; KITO, H.; OTSUKA, K.; ASHIZAWA, T.; YASUDA, N.; FUKIYA, S.; SATO, J.; HIRAYAE, K.; FUJITA, Y.; NAKAJIMA, T.; TOMITA, F.; SONE, T. Molecular cloning and characterization of the AVR-Pia locus from a Japanese field isolate of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant pathology*, v.10, p.361–374, 2009.

MUTIGA, S. K.; ROTICH, F.; DEVI GANESHAN, V.; MWONGERA, D. T.; MGONJA, E. M.; WERE, V. M.; HARVEY, J. W.; ZHOU, B.; WASILWA, L.; FENG, C.; OUÉDRAOGO, I.; WANG, G. L., MITCHELL, T. K., TALBOT, N. J.; CORRELL, J. C. Assessment of the Virulence Spectrum and Its Association with Genetic Diversity in *Magnaporthe oryzae* Populations from Sub-Saharan Africa. **Phytopathology** 107:7, 852-863, 2017.

NANODROP 2000/2000c Spectrophotometer - v1.0: user manual revised. Wilmington: Thermo Fisher Scientific, 2009. Disponível em: <https://www.mlz.garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual.pdf>. Acesso em: 23 Jan. 2020.

OKUYAMA, Y.; KANZAKI, H.; ABE, A.; YOSHIDA, K.; TAMIRU, M.; SAITOH, H.; FUJIBE, T.; MATSUMURA, H.; SHENTON, M.; GALAM, D. C.; UNLAN, J.; ITO, A.; SONE, T.; TERAUCHI, R. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. **The Plant Journal**, v. 66, p. 467–479, 2011.

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

OSE, T.; OIKAWA, A.; NAKAMURA, Y. ET AL. Estrutura da solução de uma proteína de avirulência, AVT-Pia, de *Magnaporthe oryzae*. **J. Biomol NMR**, v.63 p.229-235, 2015.

OU, S. H. Rice diseases. **London: Eastern Press**, 1972, p. 97-137.

PASCHOLATTI, S.F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 22, p. 417-453.

PEREA, C.; DE LA HOZ, J.F.; CRUZ, D.F. *et al.* Análise bioinformática de genótipo por dados de sequenciamento (GBS) com NGSEP. **BMC Genomics** v.17, p. 498 2016.

Pesquisa agropecuária brasileira. Brasília, v. 38, n. 9, p. 1045-1051, set. 2003

PRABHU, A.S.; Araújo, L.G.; Faustina, C.; Berni, R.F. Estimativa de danos causados pela brusone na produtividade de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.38, n.9, p.1045-1051, 2003.

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

QU, S. H.; LIU G. F.; ZHOU B.; BELLIZZI, M.; ZENG, L.R.; DAI, L. Y.; HAN, B.; WANG, G. L. 2006. The broad-spectrum blast resistance gene Pi9 encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. **Genetics**, v. 172, p. 1901–1914.

RAY, S.; SINGH, P. K.; GUPTA, D. K.; MAHATO, A. K.; SARKAR, C.; RATHOUR, R.; SINGH, N. K.; SHARMA, T. R. Analysis of *Magnaporthe oryzae* genome reveals a fungal effector, which is able to induce resistance response in transgenic rice line containing resistance gene, Pi54. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1140, 2016.

RIBEIRO, V., F. X.; PARLEVLIT, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v.26,n.3,p.577-589, 2001.

ROBINSON, R. A. Disease resistance terminology. **Review of Applied Mycology Surrey**, v. 48, p. 593-606, 1969.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proc Natl Acad Sci**, v.97 p. 11655-60, 2000.

SHARMA, T. R.; MADHAV, M. S.; SINGH, B. K.; SHANKER, P.; JANA, T. K.; DALAL, V.; PANDIT A, SINGH, A.; GAIKWAD, K.; UPRETI, H. C.; SINGH, N. K. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-kh* gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 274, p. 569–578, 2005.

SHARMA, T. R.; RAI, A. K.; GUPTA, S. K.; SINGH, N. K. Broadspectrum blast resistance gene *Pi-kh* cloned from rice line Tetep designated as *Pi54*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 19, p.87–89, 2010.

SILUÉ, D.; THARREAU, D.; NOTTEGHEM, J. L.; Evidence of gene-for-gene relationship in the (*Oryza sativa* – *Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* v. 82, p. 577-580, 1992.

SINGH, P. K.; MAHATO, A. K.; JAIN, P.; RATHOUR, R.; SHARMA, V.; SHARMA, T. R.. Comparative Genomics Reveals the High Copy Number Variation of a Retro Transposon in Different *Magnaporthe* Isolates. **Frontiers In Microbiolog**, v. 10, 2019.

STANKE, M.; & MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic acids research**, v. 33 p. 465–467.

STRANGE, R. N. Introduction to plant pathology. West Sussex: Wiley, 2003. 185 p.

SWEIGARD, J. A., CARROLL, A. M., KANG, S.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1221–1233, 1995.

TAKAGI, H.; UEMURA, A.; YAEGASHI, H.; TAMIRU, M.; ABE, A.; MITSUOKA, C.; UTSUSHI, H.; NATSUME, S.; KANZAKI, H.; MATSUMURA, H.; SAITOH, H.; YOSHIDA, K.; CANO, L. M.; KAMOUN, S.; TERAUCHI, R. MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. **New Phytologist**, v. 200, p. 276–283, 2013.

TANWEER, F. A.; RAFII, M.Y.; SIJAM, K., RAHIM, H. A.; AHMED, F., ASHKANI, S.; LATIF, M. A. Introgression of Blast Resistance Genes (Putative Pi-b and Pi-kh) into Elite Rice Cultivar MR219 through Marker-Assisted Selection. **Frontiers in plant science**, v.6 , p.1002, 2015.

TEIXEIRA, Z.O. **Avaliação bioinformática de montagens do genoma de piracanjuba (*brycon orbignyanus*, characiformes: bryconidae), um peixe de importância socioambiental**. Tese (Graduação BACHARELADO EM ZOOTECNIA), Universidade de São João Del Rey, Minas Gerais, 2018.

VAN DER PLANK, J.E. **Principles of plant infection**. New York: Academic, p.216, 1975.

VANDERPLANK, J.E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. Academic Press, New York. 1963.

WANG, BAO-HUA; EBBOLE, D. J.; WANG, ZONG-HUA. The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: diversity and interaction of Avr and R genes. **Journal Of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 12, p. 2746-2760, 2017.

WU, J., KOU, Y.; BAO J., LI, Y., TANG, M.; ZHU, X.; PONAYA, A.; XIAO, G.; LI J.; LI, C.; SONG, M. Y.; CUMAGUN, C. J.; DENG, Q.; LU, G.; JEON, J. S.; NAQVI,

N. I.; ZHOU, B. . Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector AvrPi9 that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice. **New Phytologist**, v.206, p. 1463–1475, 2015.

WU, W.; WANG, L.; ZHANG, S.; LI, Z.; ZHANG, Y.; LIN, F.; PAN, Q. Stepwise arms race between *AvrPik* and *Pik* alleles in the rice blast pathosystem. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, p.759–769, 2014.

XUE, M.; YANG, J.; LI, Z.; HU, S.; YAO, N. et al. Comparative Analysis of the Genomes of Two Field Isolates of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genetics*, v.8, n.8 p.100, 2012.

YAKOVCHUK, P.; PROTOZANOVA, E.; FRANK-KAMENETSKII, M. D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res*, v. 34, n. 2, p. 564–574, 2006.

YANG, Z. & DICKMAN, M.B. *Colletotrichum trifolii* mutants disrupted in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase are nonpathogenic. **Molecular Plant Microbe Interaction** 12:960-968. 1999.

YOSHIDA, K.; SAITOH, H., FUJISAWA, S.; KANZAKI, H.; MATSUMURA, H.; YOSHIDA, K.; TOSA, Y.; CHUMA, I.; TAKANO, Y.; WIN, J.; KAMOUN, S.; TERAUCHI, R. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. **The Plant Cell**, v. 21, p. 1573–1591, 2009.

YUAN, B.; ZHAI, C.; WANG, W. J.; ZENG, X. S.; XU, X. K.; HU, H. Q.; LIN, F.; WANG, L.; PAN, Q. H. The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, p. 1017–1028, 2011.

ZERBINO, D. R., & BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome research**, 18(5), 821–829, 2008.

ZHAI, C.; ZHANG Y, YAO, N.; LIN, F.; LIU, Z.; DONG, Z.; WANG, L.; PAN, Q. Function and interaction of the coupled genes responsible for Pik-h encoded rice blast resistance. *PLOS ONE*, v. 9, p. 98067, 2014.

ZHAI, C.; LIN, F.; DONG, Z. Q.; HE, X. Y.; YUAN, B.; ZENG, X. S.; WANG, L.; PAN, Q. H. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication. **New Phytologist**, v. 189, p. 321–334, 2011.

ZHANG, S.; WANG, L., WU, W.; HE, L., YANG, X.; PAN, Q. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene Avr-Pib responding to the rice blast resistance gene Pib. **Sci. Rep**, v.5, p.16-42, 2015.

ZHENG, H.; ZHONG, Z.; SHI, M.; ZHANG, L.; LIN, L.; HONG, Y.; FANG, T.; ZHU, Y.; GUO, J.; ZHANG, L. Comparative genomic analysis revealed rapid differentiation in the pathogenicity-related gene repertoires between *Pyricularia oryzae* and *Pyricularia penniseti* isolated from a Pennisetum grass. **Bmc Genomics**, v. 19, n. 1, p. 927, 2018.

ZHOU, B.; QU, S. H.; LIU, G. F.; DOLAN, M.; SAKAI, H.; LU, G. D.; BELLIZZI, M.; WANG, G. L. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between Pi2 and Piz-t resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 1216–1228, 2006.