

THIAGO ANDRADE MAIA

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FUNCIONAL DE EFETORES DE *Hemileia vastatrix*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DO CAFEEIRO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M217i
2013

Maia, Thiago Andrade, 1981-
Identificação e análise funcional de efetores de
Hemileia vastatrix, agente causal da ferrugem do cafeeiro /
Thiago Andrade Maia. – Viçosa, MG, 2013.
xi, 124 f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sergio Hermínio Brommonschenkel
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ferrugem-do-cafeeiro. 2. *Hemileia vastatrix*. 3. Interação
planta-patógeno. 4. Café - Resistência a doenças e pragas.
5. Bioinformática. 6. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.
7. Secreção. 8. Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.7394

THIAGO ANDRADE MAIA

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FUNCIONAL DE EFETORES DE *Hemileia vastatrix*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2013.

Mário Lúcio Vilela de Resende

Robert Weingart Barreto

Luís Cláudio Vieira da Cunha

Jorge Luis Badel Pacheco

Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

Ao meu pai, Junio.

Ao meu irmão, Caetano.

Aos meus sobrinhos Matheus, Vinícius e Bernardo.

À minha avó, Iza (in memoriam). Ofereço.

À mulher que sempre me incentivou
e deu apoio à minha formação,
Fátima, minha mãe. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, pela vida, saúde e oportunidade de realizar meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

À FAPEMIG, pela bolsa concedida.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia, por colaboração e pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, meu orientador, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela confiança durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À bióloga Jamile Camargos, técnica responsável pelo sequenciamento do Laboratório de Genômica.

Ao analista de sistema José Cleydson e a bioquímica Lívia Zaramela, pelas contribuições durante as análises de bioinformática.

Ao pesquisador Jorge Badel, pelas valiosas sugestões durante a elaboração da tese.

Aos professores Mário Lúcio, Robert Barreto e Luís Cláudio, por terem aceito o convite de participar da banca de defesa.

A todos os colegas de trabalho que passaram pelo Laboratório de Genômica: Michelle, Lívia, Sandra, Yukari, Poly, Gustavo, Gilson, Daniel. E aos atuais: Tadeu, Luís, Jamile, Natália, Josney, Rafael, Tácio, Paulo, Fernanda, pelo convívio e amizade.

Aos meus companheiros e ex-companheiros de república, pela amizade e pelos momentos de descontração. Em especial ao Chyrsthian, Djair, Mateus, Cassiano, Leandro e Alex.

À minha namorada, Lívia, por dividir comigo esta etapa da minha vida, por todo amor, carinho e amizade.

Aos meus familiares, que sempre torceram e se orgulharam das minhas conquistas.

Aos meus amigos e a todas as pessoas que, de alguma forma, me auxiliaram.

Meus sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

THIAGO ANDRADE MAIA, filho de Junio Cesar Rezende Maia e Fátima Maria Andrade, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 1º de março de 1981. Em março de 2004 ingressou no curso de Bacharelado em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em 16 de março de 2007.

De julho de 2004 a fevereiro de 2007, foi bolsista de iniciação científica no Departamento de Fitopatologia da UFV, onde desenvolveu atividades de pesquisa com marcadores moleculares RAPD e AFLP.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-graduação, em nível de mestrado, em Fitopatologia, na UFV, defendendo a dissertação em 16 de fevereiro de 2009.

Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-graduação, em nível de doutorado, em Fitopatologia, na UFV, submetendo-se à defesa de tese em 27 de fevereiro de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
1-INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1-Importância econômica do café	1
1.2-Aspectos gerais do patossistema Hemileia-cafeeiro.....	1
1.3-Processo infeccioso de <i>H. vastatrix</i>	4
1.4-Sistema imune vegetal	7
1.5-Proteínas efetoras de organismos associados às plantas.....	9
1.6-Identificação e caracterização funcional de genes efetores	12
2-REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DE UREDINIÓSPOROS GERMINADOS DE <i>Hemileia vastatrix</i> REVELA NOVOS CANDIDATOS A EFETORES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DURANTE A INTERAÇÃO COM O CAFEEIRO	
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1-INTRODUÇÃO	31
2-MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1-Germinação dos urediniósporos de <i>H. vastatrix</i>	35
2.2-Construção e sequenciamento da biblioteca de cDNA	35
2.3-Análises de bioinformática e predição do secretoma.....	36
2.4-Confirmação da secreção das proteínas HvECs em levedura.....	37
2.5-Análise da expressão temporal dos genes HvECs	38
2.6-Análise da estrutura genômica dos genes HvECs.....	39
3-RESULTADOS	40
4-DISCUSSÃO	52
5-REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FUNCIONAL DE EFETORES DE <i>Hemileia vastatrix</i> EXPRESSOS DURANTE A FASE BIOTRÓFICA DA INTERAÇÃO.....	
RESUMO	66
ABSTRACT	67
1-INTRODUÇÃO	68
2-MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1-Inoculação de <i>H. vastatrix</i>	72

SUMÁRIO

2.2-Construção da biblioteca de cDNA, sequenciamento Sanger e análise das sequências	72
2.3-Construção da biblioteca de cDNA normalizada, pirosequenciamento e análise das sequências	74
2.4-Análise de predição do secretoma e anotação	74
2.5-Seleção de genes candidatos a efetores e confirmação da origem fúngica dos genes selecionados por análise de RT-PCR	75
2.6-Análise da expressão temporal dos genes selecionados por qRT-PCR.....	76
2.7-Análise de expressão transiente dos candidatos a efetores em folhas de cafeeiro mediada pelo sistema pEDV e pelo Sistema de Secreção Tipo III de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	77
2.7.1-Genótipos de cafeeiro inoculados	77
2.7.2-Estirpe de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	77
2.7.3-Clonagem em pEDV e transformação de <i>P.s.</i> pv. <i>garcae</i>	77
2.7.4-Análise funcional dos genes candidatos a efetores em genótipos de cafeeiros baseado no SST3 de <i>P. s.</i> <i>garcae</i>	78
2.7.5-Coleta de amostras para determinação do crescimento de populações de <i>P. s.</i> <i>garcae</i> in vivo.....	79
2.8-Análise da secreção em levedura do efector HvEC-016	79
2.9-Análise da estrutura genômica do gene HvEC-016	80
3-RESULTADOS	81
4-DISCUSSÃO	95
5. REFERÊNCIAS	100
CONCLUSÕES GERAIS	106
ANEXOS	107

RESUMO

MAIA, Thiago Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Identificação e análise funcional de efetores de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Coorientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Marisa Vieira de Queiroz.

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*, é o principal problema fitossanitário da cafeicultura, podendo ocasionar perdas da ordem de 35 a 50% da produção se não forem implantadas medidas de controle. Durante a interação com a planta hospedeira, os fungos causadores de ferrugens secretam um arsenal de proteínas efetoras que modificam a estrutura e a função da célula hospedeira, permitindo o estabelecimento da interação biotrófica. Algumas dessas proteínas efetoras, denominadas proteínas de avirulência (Avr), são reconhecidas por proteínas codificadas por genes de resistência, o que desencadeia uma resposta de defesa da planta contra a infecção pelo patógeno. Já foram identificados geneticamente pelo menos nove genes dominantes (S_{H1} a S_{H9}) que conferem resistência à ferrugem do cafeeiro, no entanto, apesar de muitos anos de pesquisa neste patossistema, os genes Avr complementares de *H. vastatrix* ainda não foram identificados ou caracterizados. Uma abordagem que pode ser realizada com esta finalidade é a análise do transcriptoma e de bioinformática para identificar genes candidatos de *H. vastatrix* que cumpram uma lista de critérios específicos em banco de dados de sequências, seguida da validação por meio de ensaios funcionais para atividades de efetores. Diante do exposto, os objetivos desse estudo foram: (i) identificar genes de *H. vastatrix* que codificam proteínas secretadas, expressas durante a germinação dos urediniósporos e também durante a fase biotrófica da interação com o cafeeiro; (ii) expressar genes candidatos a efetores de *H. vastatrix*, utilizando o sistema armadilha de secreção em levedura YST (Yeast Secretion Trap) para confirmação biológica da predição de secreção realizada por ferramentas de bioinformática; (iii) analisar a estrutura genômica dos genes candidatos a efetores selecionados; (iv) efetuar a análise da expressão temporal dos genes identificados durante as diferentes fases da patogênese; (v) estabelecer um protocolo de expressão transiente de proteínas secretadas de *H. vastatrix* em folhas de cafeeiro, com base no Sistema de Secreção Tipo III de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Inicialmente, caracterizou-se o secretoma de urediniósporos germinados de *H. vastatrix* por meio

da construção de uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA isolado de urediniósporos germinados *in vitro* por 16 horas. Após análises das sequências por ferramentas de bioinformática, foram selecionadas 146 ORFs que codificam proteínas secretadas. Durante a anotação dessas sequências constatou-se que 20% do secretoma de urediniósporos germinados são constituídos por enzimas hidrolíticas e que a maioria (67%) das proteínas secretadas identificadas possui função desconhecida. A partir dessas sequências foram selecionadas 35 ORFs completas que codificam proteínas com características comuns aos efetores de fungos filamentosos, denominados genes candidatos a efetores de *H. vastatrix* (HvECs – *H. vastatrix effector candidates*). Desses, 22 HvECs tiveram suas sequências genômicas caracterizadas, confirmando as ORFs preditas por bioinformática. A secreção de oito HvECs selecionados foi comprovada em levedura, e sua expressão diferenciada, que possivelmente ocorre com as mudanças morfológicas do desenvolvimento do patógeno nos estágios iniciais de infecção, foi comprovada por meio RT-qPCR. Posteriormente, caracterizou-se o secretoma de *H. vastatrix* expresso durante uma interação compatível com o cafeeiro, por meio da combinação de sequenciamento Sanger e pirosequenciamento 454. Esta abordagem integrada permitiu o sequenciamento massivo de um substancial número de etiquetas de sequências expressas (ESTs) em folhas de café infectadas com *H. vastatrix*, amostradas em quatro tempos diferentes durante a fase biotrófica da interação: 48 horas, 72 horas, 9 dias e 12 dias após a inoculação. Após análises de bioinformática foram selecionados 75 genes e as análises de RT-PCR confirmaram a origem fúngica de 62 genes HvECs. Desses, 22 HvECs são preferencialmente expressos durante a interação com o cafeeiro, apresentando padrões distintos de expressão durante a fase biotrófica da interação. Adicionalmente, desenvolveu-se um protocolo de expressão transiente de proteínas secretadas de *H. vastatrix* em folhas de cafeeiro, por meio do sistema pEDV e do Sistema de Secreção Tipo III de *P. syringae* pv. *garcae*. A expressão transiente do gene HvEC-016 no citoplasma de cafeeiros resistentes à ferrugem, portadores do gene S_H1 , desencadeou uma resposta de defesa das plantas, indicando que pode ter ocorrido o reconhecimento da proteína efetora HvEC-016 mediada pela proteína R codificada pelo gene S_H1 . Esse sistema de expressão transiente e o catálogo de genes candidatos a efetores de *H. vastatrix* expressos tanto durante a germinação dos urediniósporos como na interação com o cafeeiro, disponibilizados

por esse estudo, constituem uma importante plataforma para a identificação de outros genes de avirulência de *Hemileia vastatrix*.

ABSTRACT

MAIA, Thiago Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Identification and functional analysis of effectors from *Hemileia vastatrix*, the causal agent of the coffee rust.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Marisa Vieira de Queiroz.

Coffee leaf rust, caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix*, is the main phytosanitary problem of the coffee plant. The disease may cause yield losses ranging from 35 to 50% if control measures are not implemented. During the interaction with the host plant, rust fungi secrete a variety of effector proteins that modify the structure and function of the host cell allowing the biotrophic interaction. Some of these effector proteins, known as avirulence proteins (Avr), are recognized by plant proteins encoded by resistance genes, which triggers a defense response against pathogen infection. At least nine dominant genes (S_{H1} to S_{H9}) that confer resistance to coffee leaf rust have been genetically identified, but despite many years of research on this pathosystem, the complementary Avr genes of *H. vastatrix* have not yet been identified or characterized. One approach that can be used for this purpose is to conduct a transcriptome and bioinformatics analyses in order to identify candidate genes of *H. vastatrix* that fulfill a set of specific criteria common to effector proteins, and their validation by conducting functional assays for effector activities. Therefore, the objectives of this study were: (i) to identify genes of *H. vastatrix* that encode proteins secreted during the germination of urediniospores as well as during the biotrophic interaction with the coffee plant, (ii) to express the effector gene candidates from *H. vastatrix* in the yeast secretion trap system (YST) in order to obtain biological confirmation of the secretion prediction made by bioinformatics tools, (iii) to analyze the genomic structure of a select group of effector gene candidates, (iv) to perform expression analysis of the identified candidates during different stages of infection; and (v) to establish a protocol for transient expression of *H. vastatrix* secreted proteins in coffee leaves based on the Type III Secretion System of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Initially, the secretome of germinated urediniospores of *H. vastatrix* was characterized by constructing a cDNA library from mRNA isolated from urediniospores germinated in vitro during 16 hours. After analysis of the ESTs using bioinformatics tools, 146 ORFs that encode secreted proteins were selected. Annotation of these proteins showed that 20% of the secretome from germinated urediniospores consists of hydrolytic enzymes and that most (67%) of the identified secreted proteins have unknown function. From the latter group of sequences, 35 complete ORFs encoding proteins sharing features with effectors from filamentous fungi and named *H. vastatrix* effector candidates (HvECs) were selected for further analysed. The genomic sequences of 22 of these HvECs were characterized, confirming the ORFs predicted by

bioinformatics. The secretion of eight selected HvECs was confirmed in yeast and their expression analysis revealed a differential expression, which possibly occurs in coordination with the morphological changes of the pathogen during the early stages of infection. The secretome of *H. vastatrix* during a compatible plant-rust interaction was also characterized by a combination of Sanger sequencing and 454 pyrosequencing. This integrated approach allowed the massive sequencing of a substantial number of sequence tags (ESTs) of genes expressed at four different times during the biotrophic interaction: 48 hours, 72 hours, 9 days and 12 days after inoculation of coffee leaves with *H. vastatrix*. After bioinformatics analyses of these ESTs, 75 HvECs were selected and an expression analyses based on RT-PCR confirmed the fungal origin for 62 of them. 22 of these HvECs are preferentially expressed during the interaction of the fungus with the coffee plant and show distinct patterns of expression along the progress of infection. Using the pEDV system and the Type III Secretion System of *P. syringae* pv. *garcae* it was established a protocol to express transiently secreted proteins from *H. vastatrix* in coffee leaves established. Transient expression of HvEC-016 inside the cytoplasm of coffee plants carrying the rust resistant gene S_H1 , triggered a plant defense response indicating that there may have occurred a recognition of the HvEC-016 effector protein mediated by the R protein encoded by S_H1 . The catalog of effector gene candidates for *H. vastatrix* expressed during both urediniospore germination and the interaction with the coffee plant and the transient assay established in this study is an important platform to identify additional avirulence genes from *Hemileia vastatrix*.

1-INTRODUÇÃO GERAL

1.1-Importância econômica do café

O café ocupa o segundo lugar na lista de commodities mais importantes no mercado internacional, logo depois do petróleo. Entre os consumidores, o café se destaca por ser uma bebida universalmente popular, com mais de 600 bilhões de xícaras consumidas a cada ano (IOC, 2013). A cafeicultura é praticada em mais de 60 países e fornece um meio de subsistência para cerca de 125 milhões de pessoas em todo o mundo (IOC, 2013). Historicamente, o Brasil ocupa posição de destaque no mercado internacional, sendo o principal produtor e exportador de café (MAPA, 2013).

Em 2011 o Brasil supriu 32,6% do mercado mundial em grão in natura (FAO, 2013), e a safra de 2012 foi a maior já registrada no País, com 50,83 milhões de sacas beneficiadas (MAPA, 2013). O cultivo de café encontra-se, em sua maioria, na Região Sudeste, onde estão os três principais estados produtores: Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, com 52, 26 e 9% da produção, respectivamente (CONAB, 2013). As duas espécies de café exploradas comercialmente são *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café conilon), representando, respectivamente, 75 e 25% da produção nacional (MAPA, 2013). Apesar da importância econômica, a produção de café pode ser limitada por vários fatores, dentre eles as doenças, que vêm ao longo dos anos afetando tanto a qualidade da produção quanto a produtividade do cafeeiro.

1.2-Aspectos gerais do patossistema Hemileia-cafeeiro

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., é a principal doença da cultura do café, podendo, em condições favoráveis e na ausência de controle químico, causar perdas na ordem de 35 a 50% da produção, especialmente em *C. arábica* (Zambolim et al., 2005). Recentemente, devido às condições de ambiente favoráveis e ao controle químico inadequado, surtos severos da doença foram relatados na América Central e no México (Cressey,

2013). O Instituto de Café da Costa Rica estima perdas de mais de 50% da safra 2013-2014 no país, como consequência desses surtos da ferrugem (Cressey, 2013). Os principais danos causados pela doença são a desfolha precoce e morte de ramos produtivos e, conseqüentemente, a redução da produtividade de cafeeiros. Além disso, a seca dos ramos reduz a vida útil da lavoura, tornando-a antieconômica (Zambolim et al., 1997). Estima-se que, anualmente, as perdas mundiais causadas por esta doença em café arábica ficam em torno de 1 a 2 bilhões de dólares (van der Vossen, 2005).

O gênero *Hemileia* foi descrito pela primeira vez por Berkeley e Broome, no Ceilão (atualmente Sri Lanka), em 1869, recebendo esta denominação devido à morfologia dos urediniosporos, que apresentam uma face lisa e outra equinulada (Rodrigues, 1990). Nas Américas o primeiro relato da doença foi no Brasil, em janeiro de 1970, no Estado da Bahia (Chaves et al., 1970). Dez anos após a sua descoberta no Brasil, a ferrugem do cafeeiro já havia se disseminado por quase todos os países produtores de café da América Latina (Schieber & Zentmyer, 1984). Acredita-se que os urediniosporos do fungo foram trazidos para o Hemisfério Oeste por correntes de ventos vindos da Angola (Bowden et al., 1971), ou introduzidos acidentalmente em plantas, bagagens ou roupas contaminadas (Kushalappa, 1989).

Hemileia vastatrix é classificado no filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales, família Incertae sedis (www.indexfungorum.org). Os fungos causadores de ferrugens produzem até cinco tipos de estruturas de frutificação, cada uma delas correspondendo a uma fase do ciclo de vida do patógeno (Kolmer et al., 2009). A ferrugem do cafeeiro é classificada como microcíclica, pois seu ciclo biológico apresenta apenas as fases de urédia, télia e basídia (Coutinho et al., 1995; Fernandes et al., 2009).

Na fase uredinial ocorre a produção dos urediniosporos dicarióticos, que representam a fase repetitiva da ferrugem, responsáveis pelo incremento da doença em condições de ambiente favoráveis (Agrios, 2005). Os teliósporos são formados ocasionalmente, aparecendo excepcionalmente em condições de chuva moderada e baixas temperaturas (Coutinho et al., 1995; Fernandes et al., 2009). Nos teliósporos ocorre a cariogamia, e o núcleo diplóide migra para o promicélio, onde a meiose é completada. Em seguida, ocorre a formação de quatro células no promicélio, cada uma sustentando terminalmente um basidiósporo. O núcleo haplóide de cada célula do promicélio migra para dentro dos basidiósporos (Vishveshwara & Nag Raj, 1960).

Todas as tentativas envolvendo inoculação de cafeeiros com basidiósporos não resultaram em infecção, e nenhum hospedeiro alternativo suscetível para este tipo de propágulo sustentou as fases de pécnio e écio no ciclo de vida da ferrugem do cafeeiro (Gopalkrishnan, 1951).

Teoricamente, *H. vastatrix* seria um fungo estritamente clonal, pois as combinações alélicas formadas durante a meiose, por recombinação gênica, não se estabelecem na população do patógeno, uma vez que os basiodiósporos não são infectivos. Porém, estudos sobre o comportamento nuclear, realizados na década de 1960, levantaram a possibilidade de ocorrência da cariogamia e meiose nos urediniósporos (Rajendren, 1967). Esse fenômeno, que faz com que os urediniósporos se comportem geneticamente como teliósporo, levou Rajendren (1967) a denominar o urediniósporo de *H. vastatrix* como “teliósporo-uredinióide”, e este fenômeno ficou conhecido como “fenômeno-Kamat”(Rajendren, 1967). Apesar de muitos pesquisadores terem ignorado essa descoberta por vários anos, estudos recentes, usando citometria de imagem, comprovaram a hipótese de que cariogamia, seguida de haploidização, pode ocorrer nos urediniósporos (Carvalho et al., 2011), o que pode explicar a alta diversidade genotípica verificada nas populações de *H. vastatrix* (Nunes et al., 2009; Maia et al., 2013), bem como o surgimento frequente e rápido de novas raças desse patógeno (Capucho et al., 2012).

Tradicionalmente, a variabilidade genética em *H. vastatrix* tem sido determinada pelo padrão de infecção observado em uma série de diferenciadores de cafeeiros. Os primeiros estudos sobre a especialização fisiológica do patógeno foram realizados na Índia, na década de 1930 (Mayne, 1932). Após a criação do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) em Oeiras, Portugal, em 1955, essas pesquisas foram intensificadas com a análise de amostras de urediniósporos provenientes de diferentes países (Rodrigues & Bettencourt, 1975). Têm-se, hoje, mais de 45 raças do patógeno caracterizadas no CIFC (Várzea & Marques, 2005; Silva et al., 2006). No Brasil já foram descritas 15 raças fisiológicas do fungo (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII, XXXVII) (Zambolim et al., 2005; Cabral et al., 2009; Capucho et al., 2012), sendo a raça II a raça predominante (Zambolim et al., 2005). A ocorrência de raças com amplo espectro de virulência, como a raça XXXVII (v_{2,5,6,7,9}) (Cabral et al., 2009), e a alta diversidade genética das populações do patógeno (Nunes et al., 2009; Maia et

al., 2013) representam um grande desafio aos melhoristas na busca por cultivares com resistência durável.

A abordagem mais eficaz e ambientalmente correta no controle de doenças é o desenvolvimento de plantas resistentes. Esta prática tem sido utilizada pelos melhoristas há mais de 100 anos, e sua eficácia despertou o interesse em estudos genéticos que definiram a teoria gene-a-gene em relação aos genes de resistência do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno (Flor, 1971). Estudos realizados no CIFC têm mostrado que a teoria gene-a-gene também se aplica na interação Hemileia-Coffea (Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967). Até o momento, foram geneticamente identificados nove genes dominantes (S_H1 a S_H9) que condicionam resistência à ferrugem do cafeeiro. Os genes S_H1 , S_H2 , S_H4 e S_H5 são encontrados em arábicas puros da Etiópia, o gene S_H3 é considerado derivado de Coffea liberica e os genes S_H6 , S_H7 , S_H8 , S_H9 estão presentes em derivados do Híbrido de Timor, um híbrido natural proveniente do cruzamento entre C. arabica e C. canephora, o que indica que esses genes são originados do café Robusta (C. canephora) (Rodrigues & Bettencourt, 1975; Bettencourt & Rodrigues, 1988). Os programas de melhoramento do cafeeiro visando resistência à ferrugem no Brasil têm periodicamente disponibilizado aos cafeicultores cultivares comerciais com resistência proveniente do Híbrido de Timor e de seus derivados. No entanto, a resistência de cafeeiros melhorados tem sido suplantada pelo patógeno, em curto espaço de tempo, dificultando o controle da doença por meios puramente genéticos (Zambolim et al., 2005).

1.3-Processo infeccioso de H. vastatrix

A patogênese dos fungos causadores de ferrugens compreende diferentes etapas, caracterizadas por várias mudanças morfo genéticas (Mendgen & Hahn, 2002). Após a adesão dos urediniosporos (Ur) na face abaxial da folha de café, ocorre a germinação por meio do alongamento do tubo germinativo, que se desenvolve até encontrar um estômato, onde se diferencia em apressório (Ap) (Fig. 1). O apressório se diferencia na hifa primária (HiP) que penetra através dos estômatos e forma a célula-mãe do haustório (CMH) e haustórios primários (HP) nas células subsidiárias ou adjacentes do estômato, antes mesmo da colonização do

mesófilo (Fig. 1). A formação dessas estruturas nas células epidermais é uma característica única de *H. vastatrix* (Ramiro et al., 2009). Continuando seu crescimento, a hifa de infecção atinge o mesófilo onde se diferencia numa vesícula típica em forma de âncora (An) na câmara subestomática (Fig. 1). De cada extremidade dos ramos da âncora, novas CMH são formadas, a partir das quais haustórios secundários (HS) são produzidos nas células do mesófilo (Fig. 1) (Ramiro et al., 2009).

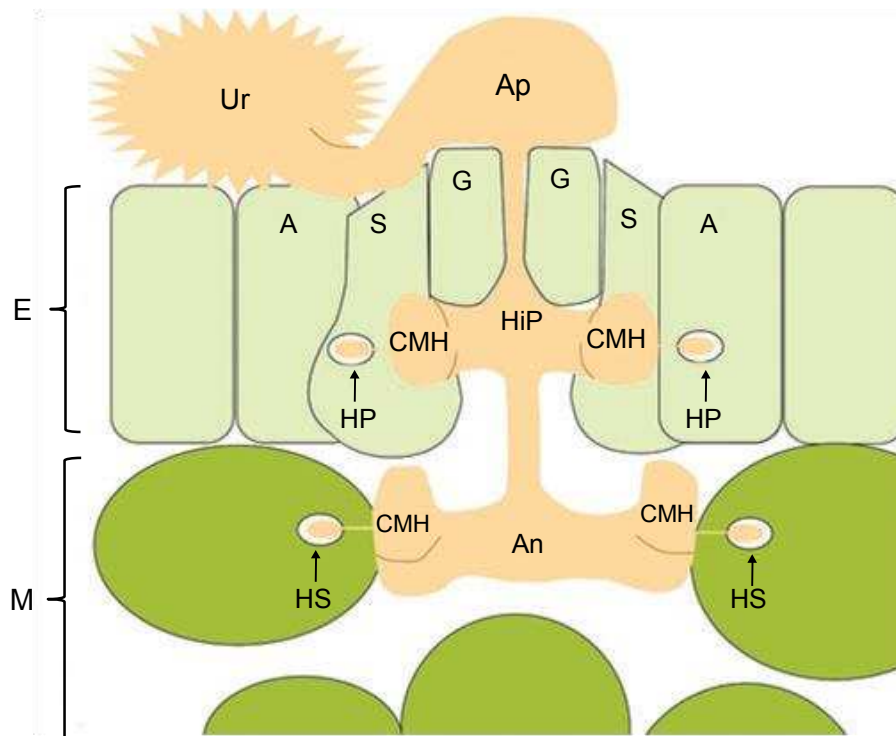


Figura 1: Esquema ilustrativo da fase inicial do desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* nos tecidos do cafeeiro. Depois da germinação dos urediniósporos (Ur) e formação de apressórios (Ap), o patógeno diferencia uma hifa intercelular de infecção primária (HiP), que forma as células-mãe do haustório (CMH), a partir da qual haustórios primários (HP) são formados dentro das células subsidiárias (S) e adjacentes (A) dos estômatos. Quando a hifa primária chega no mesófilo (M), ocorre o desenvolvimento de uma vesícula típica em forma de âncora (An) na câmara subestomática. De cada ponta dos ramos da âncora, novas CMH são formadas, a partir das quais haustórios secundários (HS) são produzidos nas células do mesófilo. E: epiderme; G: células-guarda (Adaptado de Ramiro et al., 2009).

Durante a emissão dos haustórios no interior das células do hospedeiro ocorre a dissolução da parede celular, seguida da invaginação da membrana celular do hospedeiro, que forma uma membrana extra-haustorial ao redor do haustório (Fig. 2).

Na interface entre a parede celular do haustório e a membrana extra-haustorial forma-se uma camada de substâncias gelatinosas, rica em carboidratos, denominada matriz extra-haustorial (Catanzariti et al., 2007). Os haustórios são o principal sítio de absorção de nutrientes a partir do hospedeiro e são determinantes para a fase biotrófica da infecção. Essas estruturas contêm transportadores de aminoácidos, transportadores de açúcares e bombas $H^+ATPases$ envolvidas no transporte ativo de nutrientes a partir das células do hospedeiro (Mendgen & Hahn, 2002).

A formação dos haustórios também induz a mudanças estruturais na célula hospedeira, como o rearranjo do citoesqueleto, a migração do núcleo e a condensação da cromatina (Mendgen & Hahn, 2002). Acredita-se que essas modificações são induzidas pela atuação de proteínas efetoras produzidas nos haustórios, que são secretadas na matriz extra-haustorial e translocadas para o interior da célula vegetal (Fig. 2).

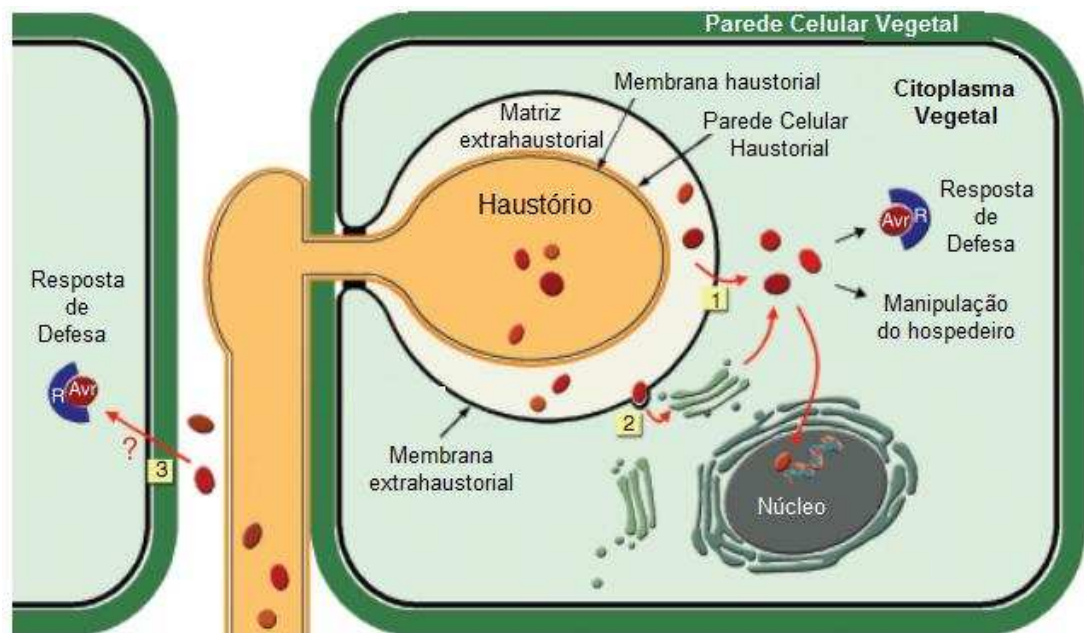


Figura 2: A interface haustório-hospedeiro. Esquema de um haustório dentro de uma célula hospedeira mostrando a membrana extra-haustorial e a matriz extra-haustorial. Proteínas efetoras são secretadas a partir dos haustórios para a matriz extra-haustorial. Um subconjunto de proteínas é translocado para dentro da célula hospedeira, atravessando diretamente a membrana extra-haustorial (1) ou por meio de vesículas do sistema de endomembranas do hospedeiro (2). Uma vez dentro do citoplasma do hospedeiro, os efetores podem alterar seu metabolismo e suas vias de defesa. As proteínas efetoras, que são reconhecidas pelas proteínas de resistência (R), são denominadas proteínas de avirulência (Avr). Este reconhecimento desencadeia as respostas de defesa da planta. Outras proteínas efetoras produzidas pelo patógeno podem ser direcionadas para organelas do hospedeiro, como o núcleo, onde podem

alterar a transcrição de genes da planta. Os efetores secretados a partir de hifas podem também entrar nas células do hospedeiro por meio de um mecanismo ainda desconhecido (3), e quando reconhecidos por uma proteína de resistência podem também desencadear respostas de defesa (Adaptado de Catanzariti et al. 2007).

1.4-Sistema imune vegetal

Bactérias, fungos, oomicetos e nematóides fitopatogênicos possuem diversas estratégias para infectar o hospedeiro, devendo ser ressaltado que, independentemente da estratégia adaptativa de qualquer patógeno, eles secretam proteínas efetoras com a função de suprimir as repostas de defesa da planta, possibilitando a colonização dos tecidos. Por outro lado, em resposta à infecção, as plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, um sistema imunológico inato que restringe a proliferação de patógenos em seus tecidos (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010).

A imunidade inata das plantas é constituída por duas linhas de defesa principais. A primeira é denominada imunidade desencadeada por PAMP (PTI – PAMP triggered immunity) e a segunda, imunidade desencadeada por efetores (ETI – Effector triggered immunity) (Jones & Dangl, 2006; Boller & Felix, 2009; Dodds & Rathjen, 2010).

A primeira linha de defesa (PTI) utiliza proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática que reconhecem padrões moleculares conservados associados a patógenos, denominado PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns)(Zipfel, 2008). Os PAMPs geralmente possuem funções estruturais, como a quitina e a flagelina (Jones & Dangl, 2006; de Wit, 2007). A quitina é o principal componente estrutural de parede celular de fungos (de Wit et al., 2009; Stergiopoulos & de Wit, 2009), e a flagelina é uma subunidade protéica que compõe o filamento flagelar (Zipfel & Felix, 2005). Embora a PTI seja suficiente para prevenir a infecção, muitos patógenos adquiriram habilidade de produzir efetores que a suprimem e, portanto, contribuem para a virulência do patógeno, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (Win et al., 2012). Em contrapartida, uma segunda linha de defesa (ETI) foi desenvolvida pelas plantas para detectar esses efetores produzidos pelos patógenos (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010).

A imunidade desencadeada por efetores (ETI) utiliza receptores intracelulares com domínios NB (nucleotide-binding) e LRR (leucine-rich repeat), que

reconhecem efetores (proteínas Avr) do patógeno. As proteínas NB-LRR enquadram-se em duas subclasses, com base na extremidade N-terminal. Um grupo possui o domínio coiled-coil (CC), enquanto a segunda subclasse compartilha similaridade com o receptor citoplasmático de interleucina IL-1 Toll (TIR) de humanos e receptores Toll-like em *Drosophilla* (Jones & Dangl, 2006). As proteínas NB-LRR são codificadas por genes de resistência (R), sendo, conseqüentemente, denominadas proteínas R. O reconhecimento dos efetores do patógeno pelas proteínas R ativa vias de sinalização celular que desencadeiam a morte celular programada no sítio de infecção, o que conduz ao colapso do tecido e à inibição completa da proliferação do patógeno. Esta forma especializada de morte celular é conhecida como reação de hipersensibilidade (HR) (Heath, 2000).

As proteínas NB-LRR podem reconhecer efetores diretamente pela associação física, ou indiretamente por meio de uma proteína acessória, que é o alvo do efector no hospedeiro. Em geral, o reconhecimento direto, também denominado modelo ligante-receptor (Stergiopoulos & de Wit, 2009), tem sido demonstrado pelo ensaio de duplo híbrido de levedura (2YH), e em alguns casos suportados por ensaios de interação *in vitro*. Por exemplo, a proteína NB-LRR de arroz, denominada Pita, se liga ao efector AvrPita de *Magnophora oryzae*, tanto em ensaios *in vitro* quanto em 2YH (Jia et al., 2000). No linho as proteínas NB-LRR L e NB-LRR M também interagem em ensaio 2YH com os efetores AvrL567 e AvrM de *Melampsora lini*, respectivamente (Dodds et al., 2006; Catanzariti et al., 2010).

Um segundo modelo de reconhecimento é conhecido como “modelo guarda”, que propõe um reconhecimento indireto entre as proteínas codificadas pelos genes R e Avr (Stergiopoulos & de Wit, 2009). De acordo com este modelo, as proteínas R atuam monitorando modificações nas proteínas-alvos dos efetores do patógeno. Estudos nesta área mostram que o modelo se aplica à maioria dos estudos de interação já descritos. Um exemplo que segue esse modelo é o reconhecimento indireto da proteína Avr2 de *Cladosporium fulvum* pela proteína Cf-2 de tomate. Quando a proteína de resistência Cf-2 está presente na planta, a proteína Avr2 se comporta como um fator de avirulência, e seu reconhecimento é mediado pela proteína Rcr-3. O complexo Rcr-3/Avr2 permite que Cf-2 desencadeie a resposta de defesa (Rooney et al., 2005).

1.5-Proteínas efetoras de organismos associados às plantas

O termo “efetor” tem sido amplamente utilizado em estudos de interações planta-patógeno. Além de serem identificados em microrganismos fitopatogênicos, recentemente os efetores também foram identificados em pragas de plantas, como os afídeos (Bos et al., 2010), e em fungos mutualistas, como *Laccaria bicolor* (Plett et al., 2011), *Glomus intraradices* (Kloppholz et al., 2011), e *Piriformospora indica* (Zuccaro et al., 2011). Desta forma, os efetores são hoje definidos como “moléculas secretadas por organismos associados às plantas que modificam a estrutura e função da célula hospedeira”(Hogenhout et al., 2009).

Vários patógenos, incluindo fungos e oomicetos, colonizam os espaços intercelulares das plantas e secretam efetores que possuem como alvo as moléculas de defesa da planta que atuam no apoplasto (Win et al., 2012). Exemplos clássicos incluem os efetores Avr2, Avr4 e Ecp6 de *C. fulvum*. Durante a infecção, Avr2 inibe pelo menos quatro cisteína proteases de tomate, o que contribui para a virulência do patógeno, pois essas proteases são importantes componentes da defesa do hospedeiro (Shabab et al., 2008). O gene Avr4 codifica uma proteína com semelhança estrutural às proteínas com domínio de ligação à quitina de invertebrados (Shen & Jacobs-Lorena, 1999). A ligação da proteína Avr4 à quitina foi confirmada experimentalmente, como também foi demonstrado que essa proteína pode proteger fungos quitinosos, como *Trichoderma viride* e *Fusarium solani*, contra a ação de quitinases básicas vegetais (van den Burg et al., 2006). Já o efetor Ecp6 é capaz de sequestrar oligômeros de quitina durante o processo de infecção do fungo, inibindo, desta forma a imunidade desencadeada pelo reconhecimento desse PAMP (de Jonge et al., 2010).

Outros patógenos secretam seus efetores dentro da célula da planta, por meio de estruturas especializadas. Bactérias fitopatogênicas gram-negativas utilizam o Sistema de Secreção Tipo III para translocação de proteínas efetoras através da parede celular e da membrana plasmática do hospedeiro, lançando-as diretamente no citoplasma vegetal (Alfano & Collmer, 2004; Buttner & He, 2009). Alguns efetores Tipo III de fitobactérias são enzimas que bioquimicamente modificam moléculas-alvos no hospedeiro, inibindo suas funções ou direcionando-as para degradação (Cunnac et al., 2009; Deslandes & Rivas, 2012). Diversas são as funções enzimáticas

desses efetores, como: proteases, hidrolases, fosfatases, transferases e ubiquitina ligase (Abramovitch et al., 2006; Janjusevic et al., 2006; Lee et al., 2012; Rodriguez-Herva et al., 2012). Outro grupo de efetores Tipo III possui especificidade de ligação ao ácido nucléico, agindo como modulares da expressão gênica do hospedeiro. Os efetores TAL (Transcription Activator-Like), de *Xanthomonas* spp., se ligam diretamente a elementos promotores para ativar a expressão de genes benéficos aos patógenos (Boch et al., 2009; Bogdanove & Voytas, 2011). Entre os genes de suscetibilidade que são induzidos por efetores TAL estão os transportadores de açúcares SWEET, que estão envolvidos com o transporte de açúcar no apoplasto, contribuindo para a nutrição e crescimento das bactérias (Chen et al., 2010).

Fungos biotróficos e oomicetos secretam e translocam seus efetores para dentro da célula da planta por meio dos haustórios (Dodds et al., 2009; de Jonge et al., 2011). Em oomicetos existem duas grandes classes de efetores citoplasmáticos. As classes mais estudadas são os efetores do tipo RxLR, que possuem um motivo Arg-X-Leu-Arg (em que “X” representa qualquer aminoácido) conservado na região N-terminal. O sequenciamento completo do genoma de *Phytophthora infestans* revelou a presença de 563 genes que codificam proteínas secretadas que contém esse motivo (Haas et al., 2009). Vários efetores RxLR têm um segundo motivo dEER [aspartato (menos conservado), glutamato, glutamato e arginina] localizado em distâncias variáveis ao sítio RxLR (Jiang et al., 2008). Os motivos RxLR e dEER são importantes para translocação dos efetores para dentro da célula da planta (Whisson et al., 2007). Dos 18 genes Avr clonados em oomicetos até agora, 17 pertencem à classe RxLR (Jiang & Tyler, 2012). A segunda classe contém os efetores Crinckler (CNR), importantes efetores citoplasmáticos de oomicetos (Schornack et al., 2010). A expressão transiente de vários efetores CNR induz a alterações fisiológicas nas plantas, como morte celular e expressão de genes de defesa (Torto et al., 2003; Haas et al., 2009). As proteínas efetoras RxLR e CNR não apresentam similaridade com proteínas de função conhecidas, e estudos determinando suas atividades bioquímicas ainda são escassos. Recentemente, demonstrou-se que um efector da classe CRN (CRN8) possui um domínio com atividade quinase. A expressão transiente do efector CRN8 in planta induziu morte celular, sendo este mecanismo dependente de sua localização no núcleo da célula vegetal (van Damme et al., 2012).

Os genomas dos basidiomicetos *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* e *Melampasora larici-populina*, causadores da ferrugem do colmo do trigo e ferrugem

da folha do álamo, respectivamente, foram recentemente disponibilizados (Duplessis et al., 2011). Análises de predições computacionais e anotações manuais desses genomas identificaram um grande repertório de genes que codificam 1.184 e 1.106 proteínas pequenas secretadas (SSP – secreted small protein) em *M. larici-populina* e *P. graminis*, respectivamente (Duplessis et al., 2011). Os genes que codificam as SSPs estão organizados em famílias. Esses genes codificam proteínas que têm padrões de espaçamentos conservados de oito a dez resíduos de cisteína (Hacquard et al., 2012). A maioria das SSPs não possui similaridade com proteínas depositadas em banco de dados e/ou apresenta similaridade com proteínas de função desconhecidas, o que dificulta inferir os seus papéis biológicos putativos (Duplessis et al., 2011).

Até o momento, poucos efetores foram caracterizados em fungos causadores de ferrugem. Quatro proteínas efetoras com atividade de avirulência foram identificadas em *M. lini* (AvrL567, AvrM, AvrP123 e AvrP4) (Dodds et al., 2004; Catanzariti et al., 2006). A expressão e secreção dessas proteínas no haustório do fungo concomitantemente com a indução de HR nas plantas indicam que os haustórios possuem papel crucial na liberação de proteínas efetoras dentro da célula da planta (Catanzariti et al., 2007). A proteína AvrP123 possui similaridade a inibidores de serinoproteases do tipo Kazal, o que evidencia o papel dessa proteína na patogênese de *M. lini*, por meio da inibição de proteases do hospedeiro (Catanzariti et al., 2006). Segundo Rafiqi et al. (2012), a proteína AvrP123 acumula-se no núcleo da célula, podendo manipular a expressão gênica do hospedeiro durante a infecção.

A proteína RTP1 (Rust Transferred Protein) de *Uromyces fabae* (Uf-RTP1) e seu homólogo em *Uromyces striatus* (Us-RTP1) são expressos nos haustórios e translocados para o citoplasma da célula vegetal (Kemen et al., 2005). Análises de 28 sequências homólogas de RTP1 em diferentes espécies de fungos causadores de ferrugem mostrou que a estrutura genômica desse efector é bipartida. Em todos os genes RTP1 analisados foram observados cinco éxons altamente conservados na região C-terminal. Por outro lado, a região N-terminal dos efetores é altamente variável, sendo constituída por um a três éxons. As análises de busca em bancos de dados por sequências homólogas revelaram que os efetores RTP1 são exclusivos da ordem Pucciniales. Além disso, constatou-se que os efetores RTP possuem atividade de inibidores de proteases, o que indica seu papel bioquímico dentro da célula da planta hospedeira (Pretsch et al., 2013).

Diferentes conjuntos de efetores são secretados em ondas sequenciais nas diferentes fases do parasitismo (Kleemann et al., 2012). Os fungos *Colletotrichum higginsianum* e *C. graminicola* infectam *Arabidopsis* e milho, respectivamente. Esses patógenos usam a regulação transcricional para síntese e secreção de diferentes conjuntos de efetores e enzimas importantes nas diferentes fases de infecção. Por exemplo, a fase biotrófica é caracterizada pelo aumento da expressão de efetores e de enzimas do metabolismo secundário, enquanto na fase necrotrófica há aumento da expressão de hidrolases e transportadores (O'Connell et al., 2012). Em *C. higginsianum*, a regulação é mais refinada durante a etapa de pré-penetração, quando os genes candidatos a efetores são regulados positivamente para preparação do ingresso na célula hospedeira (Kleemann et al., 2012). Em *Phytophthora* spp. vários efetores do tipo RxLR são induzidos na germinação dos cistos ou nos estágios iniciais da infecção, enquanto várias proteínas do tipo Nep1-like, indutores de necrose, são expressas em estágios adiantados da infecção, o que indica que essas proteínas contribuem para a fase necrotrófica da patogênese (Qutob et al., 2002; Haas et al., 2009). O efector SNE1 de *P. infestans* é transcionalmente regulado positivamente durante a fase biotrófica, supostamente para manter a célula hospedeira viva, suprimindo a ação de indutores de morte celular que são expressos durante a fase necrotrófica da interação (Kelley et al., 2010). Uma vez que a expressão dos efetores ocorre de forma regulada nos momentos e locais definidos durante a interação com o hospedeiro, eles podem interagir com proteínas da planta para exercerem suas funções, promovendo uma infecção bem-sucedida do fitopatógeno (Win et al., 2012).

1.6-Identificação e caracterização funcional de genes efetores

A abordagem típica para triagem de genes que codificam efetores consiste em duas etapas principais: (i) uso de bioinformática para identificar genes candidatos que cumpram uma lista de critérios específicos de genes efetores em banco de dados de sequências e (ii) validação desses genes candidatos por ensaios funcionais, como a expressão transiente em plantas e a avaliação para atividades semelhantes a efetores (Kamoun, 2006). A aplicação dessas estratégias computacionais, genéticas e

bioquímicas, muitas vezes associadas, permitiu a identificação de genes que codificam proteínas efetoras em oomicetos e fungos filamentosos (Ellis et al., 2009).

Patógenos filamentosos, como outros organismos eucariotos, secretam proteínas através do Sistema de Secreção Tipo II, uma via tradicional de secreção que envolve o retículo endoplasmático e a exocitose de vesículas secretoras derivadas do complexo de Golgi (Griffiths & Simons, 1986). A maioria dos efetores de fungos e oomicetos, até então conhecidos, apresenta um peptídeo sinal na extremidade N-terminal (Dodds et al., 2009; Stergiopoulos & de Wit, 2009). Sendo assim, ferramentas computacionais, em particular o algoritmo SignalP (Petersen et al., 2011), podem ser utilizadas para fazer a predição da presença de peptídeo sinal em sequências abertas de leitura (ORFs – Open Reading Frame) com alto grau de precisão (Emanuelsson et al., 2007; Min, 2010). Entretanto, como todas as ferramentas baseadas em predições, há uma taxa de erro inerente e é possível a ocorrência de falsos positivos e negativos. Desta forma, a utilização de ensaios experimentais fornece um complemento importante para as análises de bioinformática, por validar ou refutar funcionalmente as predições *in silico* (Torto et al., 2003; Lee et al., 2006).

O sistema armadilha de sinal de secreção em levedura (sistema YST - Yeast Secretion Trap) é um método para identificação de genes que codificam proteínas que apresentam sinal de secreção, utilizado com bastante sucesso na caracterização do secretoma de fungos e oomicetos (Lee et al., 2006; Link & Voegelé, 2008). O sistema consiste em um vetor de expressão que carrega um gene da invertase (SUC2), em que o códon de iniciação e a região que codifica o peptídeo sinal foram removidos (Fig. 3). A invertase codificada pelo gene SUC2 é uma sacarase extracelular que catalisa a quebra de sacarose em frutose e glicose. Nesse vetor, a transcrição da invertase é mediada pelo promotor ADH1 do gene que codifica a álcool desidrogenase (Fig. 3). Para que o gene da invertase seja transcrito e a invertase secretada, uma sequência (cDNA) contendo um códon iniciador e a região codificadora para o peptídeo sinal deve ser clonada entre o promotor ADH1 e o gene SUC2, na mesma fase de leitura (*in frame*) com a sequência desse gene. Os plasmídeos recombinantes contendo a sequência promotor-cDNA-SUC2 são utilizados para transformação de linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* contendo uma deleção genômica no loco SUC2, sendo, portanto, incapaz de secretar a enzima invertase. A seleção é realizada em meio contendo sacarose como única

fonte de carbono. Assim, apenas os clones que apresentarem seqüências de cDNA que codificam proteínas secretadas são selecionados (Jacobs et al., 1997).

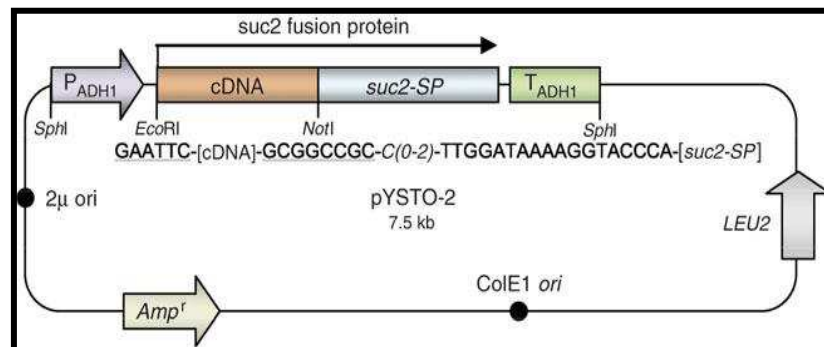


Figura 3: Mapa do vetor pYSTO-2. Amp^r – marca de resistência à ampicilina. LEU2 – marca auxotrófica para leucina. ColE1ori – origem de replicação em bactéria. 2μ ori – origem de replicação em levedura. PADH1 – promotor do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase. suc2-SP – gene da invertase sem a região que codifica para o sinal de secreção. TADH1 – região terminadora do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase (Lee et al., 2006).

A utilização do sistema YST permitiu caracterizar o secretoma do fungo biotrófico *U. fabae*, agente causal da ferrugem da fava. Foram identificados 62 e 42 genes que codificam proteínas secretadas pelos haustórios e urediniosporos germinados, respectivamente. Apenas quatro desses genes estavam expressos em ambas as estruturas do fungo analisadas, indicando uma forte regulação da expressão gênica (Link & Voegelé, 2008). Após a identificação de proteínas secretadas por fitopatógenos, o desafio seguinte é a comprovação da sua função biológica durante a interação com o hospedeiro.

Devido à dificuldade do estabelecimento de um protocolo de transformação estável para fungos biotróficos, uma estratégia para estudar as proteínas efetoras desses parasitas de plantas é a expressão transiente das proteínas secretadas no citoplasma de plantas resistentes (Vleeshouwers et al., 2006). As proteínas efetoras com atividade de avirulência são reconhecidas por proteínas de resistência do hospedeiro e, portanto, podem ser identificadas em bioensaios como moléculas que desencadeiam respostas de resistência na planta. Diversos métodos podem ser utilizados para análise de expressão transiente, por exemplo, a agroinfiltração (Janssen & Gardner, 1990) e o sistema pEDV baseado no Sistema de Secreção Tipo III de fitobactérias (Sohn et al., 2007).

A agroinfiltração é considerada uma técnica valiosa, em que os genes que codificam para as proteínas secretadas são transferidos para cassetes de expressão com base no T-DNA, de forma que a expressão dos genes seja direcionada pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Vleeshouwers et al., 2006). Este método foi utilizado com bastante sucesso para estudar genes Avr de vários fitopatógenos, inclusive do fungo biotrófico *M. lini* (Dodds et al., 2004; Catanzariti et al., 2006). No entanto, para o sistema Hemileia-cafeeiro a técnica de expressão transiente via agroinfiltração é dificultada, pelo fato das células do mesófilo de folhas de cafeeiro serem pouco suscetível à infecção por *Agrobacterium tumefaciens* (van Boxtel et al., 1995). Portanto, o sistema pEDV, pelo fato do cafeeiro ser suscetível à *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da mancha aureolada do cafeeiro, torna-se uma ferramenta promissora para estudos funcionais em *H. vastatrix*.

As bactérias gram-negativas possuem sistemas especializados de secreção que realizam o transporte de moléculas, dentre os quais se destaca o Sistema de Secreção Tipo III (SST3) (Alfano & Collmer, 2004; Buttner & He, 2009). Em fitobactérias, os genes que codificam as proteínas do SST3 são denominados genes *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity), porque mutantes nesses genes são incapazes de causar doenças em plantas hospedeiras e HR em plantas não hospedeiras ou resistentes (Bonas & Van den Ackervaken, 1997). O SST3 é um sistema complexo formado por mais de 20 proteínas e assemelha-se a um aparato molecular em forma de agulha que atravessa a membrana interna e externa da célula bacteriana e é prolongado por um canal, o pílus, até a membrana plasmática vegetal, permitindo a secreção e translocação de proteínas efetoras para o citoplasma da planta (Fig. 4).

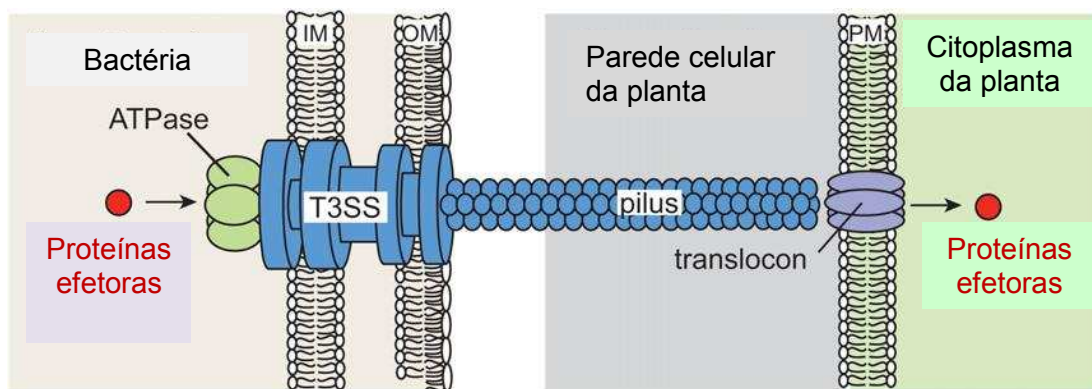


Figura 4: Representação esquemática do transporte de proteínas efetoras pelo Sistema de Secreção Tipo III (SST3). O corpo basal do SST3 se estende através da membrana interna (IM) e da membrana externa (OM) bacteriana, conectando-se a um pílus extracelular em forma de agulha que atravessa a parede celular vegetal, por onde são transportadas as proteínas efetoras até o interior da membrana da célula da planta (PM). Associado ao pílus encontra-se o complexo de translocação (translocon), que forma um canal protéico que conduz à passagem das proteínas efetoras para o citoplasma da planta. (Adaptado de Büttner & He, 2009).

Sohn et al. (2007) desenvolveram um sistema eficiente para estudar proteínas efetoras de *Hyaloperonospora parasitica*, um oomiceto biotrófico. Para isso, construíram um vetor de expressão, denominado pEDV (Effector Detector Vector), que permite a clonagem de genes in frame com a sequência que codifica um peptídeo de 136 aminoácidos localizado na região N-terminal da proteína efetora AvrRps4, que sinaliza a secreção pelo SST3 de *Pseudomonas*. Esses autores demonstraram a expressão de duas proteínas efetoras de *H. parasitica*, ATR1 e ATR13, e suas respectivas translocações via SST3 de *P. syringae* pv. tomato em *Arabidopsis*. A translocação dessas proteínas via SST3 foi capaz de desencadear HR em genótipos de *Arabidopsis* contendo os genes R correspondentes (Sohn et al., 2007).

Mais recentemente, o sistema pEDV foi utilizado para fazer a análise funcional de 64 efetores putativos de *H. parasitica*. A maioria (70%) dos efetores testados aumentou o crescimento de populações de *P. syringae* em mais de um acesso de *Arabidopsis* inoculados, o que indica que esses efetores têm um papel na virulência de *H. parasitica*. Também foi possível identificar efetores que reduziram o crescimento populacional da bactéria. Entretanto, nenhum efector foi capaz de induzir à morte celular macroscópica típica de HR nos diferentes acessos inoculados. Os resultados desse estudo demonstram que o sistema pEDV permite realizar a triagem funcional de um grande número de candidatos efetores eucariotos, facilitando a priorização de efetores promissores para estudos funcionais mais detalhados (Fabro

et al., 2011). A Figura 5 ilustra a translocação de uma proteína efetora para o citoplasma vegetal mediado pelo SST3 de uma fitobactéria transformada com o vetor pEDV e possíveis resultados decorrentes da expressão fenotípica desse efetor na célula vegetal.

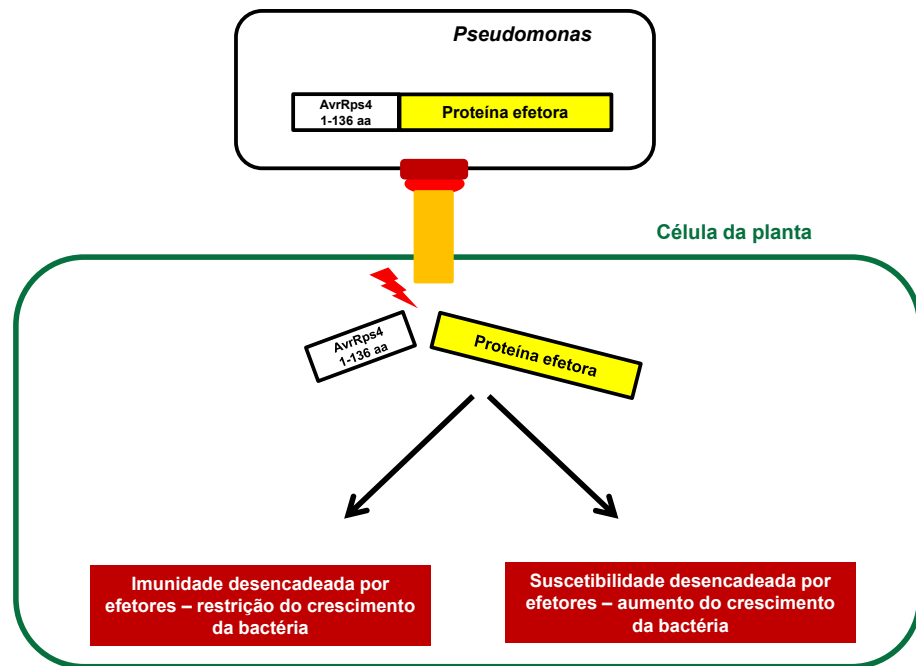


Figura 5: Representação esquemática da translocação de proteínas efetoras para o citoplasma da planta mediada pelo vetor pEDV. O gene que codifica a proteína efetora foi clonado na mesma fase de leitura com a sequência codificadora do peptídeo de 136 aminoácidos da proteína efetora *AvrRps4*, que direciona a secreção pelo SST3. O contato da bactéria com a célula hospedeira desencadeia a formação do SST3 e a expressão da proteína efetora. Após a translocação, a proteína efetora pode ser reconhecida pelas proteínas R e desencadear a resposta de defesa na planta, restringindo o crescimento da bactéria. Caso a planta não tenha uma proteína R capaz de reconhecer a proteína efetora, essa é capaz de interferir no seu alvo celular, contribuindo para o crescimento da bactéria e desenvolvimento dos sintomas da doença.

O sistema pEDV também pode ser uma ferramenta útil para análise funcional de efetores em *H. vastatrix*. Na interação Hemileia-cafeeiro, estudos citológicos e bioquímicos têm mostrado que a resistência do cafeeiro é, em geral, do tipo pós-haustorial e está associada à indução de reação de hipersensibilidade (HR) (Silva et al., 2002 ; Silva et al., 2006; Ramiro et al., 2009). Assim, é possível que proteínas efetoras produzidas no haustório e translocadas para o citoplasma do cafeeiro sejam

reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes S_H , que conferem ao cafeeiro resistência à ferrugem.

Embora o transcriptoma da interação Hemileia-cafeeiro expresso em uma fase adiantada da patogênese (esporulação) tenha sido parcialmente caracterizado (Fernandez et al., 2012), ainda são inexistentes estudos visando identificar e caracterizar efetores de *H. vastatrix*, em especial efetores reconhecidos por proteínas R, ou proteínas de avirulência. Como observado em diferentes patossistemas, mutações nos genes de avirulência permitem que os patógenos suplantem a resistência conferida por genes R (Stergiopoulos & de Wit, 2009). Logo, a clonagem dos genes *Avr* permitiria entender os mecanismos de mutação envolvidos na suplantação da resistência do cafeeiro, assim como forneceria subsídios para o desenvolvimento de cultivares de cafeeiro com resistência durável. Além disso, a disponibilidade dos genes *Avr* de *H. vastatrix* pode acelerar a identificação e a validação da durabilidade de novos genes de resistência em genótipos de cafeeiros. Pela triagem em bancos de germoplasmas usando o sistema pEDV seria possível identificar cafeeiros resistentes a vários efetores de *H. vastatrix*. Essa estratégia, denominada melhoramento assistido por efetores do patógeno, está sendo realizada com bastante sucesso no patossistema *Solanum-Phytophthora* (Vleeshouwers et al. 2008). Ela possibilitou confirmar a funcionalidade biológica de três genes R, que foram transferidos para uma cultivar de batata suscetível à requeima (Zhu et al. 2012). Essas inovações tecnológicas demonstram que o conhecimento das proteínas efetoras pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controle de doenças de plantas com base no melhoramento genético.

2-REFERÊNCIAS

- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 7(8): 601-611.
- Agrios GN. 2005. Plant Pathology: 5ª edição, Elsevier pp 562-580.
- Alfano JR, Collmer A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review of Phytopathology** 42: 385-414.
- Bettencourt AJ, Rodrigues CJ 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: Clarke RJ, Macrae R eds. Coffee: Agronomy. London: Elsevier Applied Science pp 285-292.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. **Science** 326(5959): 1509-1512.
- Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. **Science** 333(6051): 1843-1846.
- Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology** 60: 379-406.
- Bonas U, Van den Ackervaken G. 1997. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? **Plant Journal** 12(1): 1-7.
- Bos JI, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA. 2010. A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). **PLoS Genetics** 6(11): e1001216.
- Bowden J, Gregory PH, Jonhson CG. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. **Nature** 229: 500-501.
- Buttner D, He SY. 2009. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. **Plant Physiology** 150(4): 1656-1664.
- Cabral PGC, Zambolim EM, Zambolim L, Lelis TP, Capucho AS, Caixeta E. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Note** 4: 129-130.
- Capucho AS, Zambolim EM, Freitas RL, Haddad F, Caixeta ET, Zambolim L. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease Note** 7: 189-191.

- Carvalho CR, Fernandes RC, Carvalho GMA, Barreto WB, Evans HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. **Plos One** 6(11): e26387.
- Catanzariti AM, Dodds PN, Ellis JG. 2007. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters** 269(2): 181-188.
- Catanzariti AM, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **Plant Cell** 18(1): 243-256.
- Catanzariti AM, Dodds PN, Ve T, Kobe B, Ellis JG, Staskawicz BJ. 2010. The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 23: 49-57.
- Chaves GM, Cruz-Filho JD, Carvalho MG, Matsuoka K, Coelho DT, Shimoya C. 1970. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). **Seiva** 30: 1-76.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. **Nature** 468(7323): 527-532.
- Conab 2013. Companhia Nacional de Abastecimento. In. <http://www.conab.gov.br/Acessando> em: 01 de fevereiro de 2013.
- Coutinho TA, Rijkenberg FHJ, van Asch MAJ. 1995. Teliospores of *Hemileia vastatrix*. **Mycological Research** 8: 932-934.
- Cressey D. 2013. Coffee rust regains foothold. **Nature** 493(7434): 587.
- Cunnac S, Lindeberg M, Collmer A. 2009. Pseudomonas syringae type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. **Current Opinion in Microbiology** 12(1): 53-60.
- de Jonge R, Bolton MD, Thomma BPHJ. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. **Current Opinion in Plant Biology** 14: 400-406.
- de Jonge R, van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MH, Thomma BP. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. **Science** 329(5994): 953-955.
- de Wit PJ. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences** 64 (21): 2726-2732.

- de Wit PJ, Mehrabi R, Van den Burg HA, Stergiopoulos I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. **Molecular Plant Pathology** 10 (6): 735-747.
- Deslandes L, Rivas S. 2012. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets **Trends in Plant Science** 17(11): 644-655.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA, Ellis JG. 2004. The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **Plant Cell** 16(3): 755-768.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CI, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America** 103(23): 8888-8893.
- Dodds PN, Rafiqi M, Gan PHP, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG. 2009. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. **New Phytologist** 183(4): 993-999.
- Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics** 11(8): 539-548.
- Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel BL, Chiu R, Coutinho PM, Feau N, Field M, Frey P, Gelhaye E, Goldberg J, Grabherr MG, Kodira CD, Kohler A, Kues U, Lindquist EA, Lucas SM, Mago R, Mauceli E, Morin E, Murat C, Pangilinan JL, Park R, Pearson M, Quesneville H, Rouhier N, Sakthikumar S, Salamov AA, Schmutz J, Selles B, Shapiro H, Tanguay P, Tuskan GA, Henrissat B, Van de Peer Y, Rouze P, Ellis JG, Dodds PN, Schein JE, Zhong SB, Hamelin RC, Grigoriev IV, Szabo LJ, Martin F. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108 (22): 9166-9171.
- Ellis JG, Rafiqi M, Gan P, Chakrabarti A, Dodds PN. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. **Current Opinion in Plant Biology** 12(4): 399-405.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols** 2(4): 953-971.
- Fabro G, Steinbrenner J, Coates M, Ishaque N, Baxter L, Studholme DJ, Korner E, Allen RL, Piquerez SJ, Rougon-Cardoso A, Greenshields D, Lei R, Badel JL, Caillaud MC, Sohn KH, Van den Ackerveken G, Parker JE, Beynon J, Jones JD. 2011. Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity. **PLoS Pathogens** 7(11): e1002348.

- FAO 2013. FAOSTAT - FAO Statistic Division. In. <http://faostat.fao.org>. Acessado em: 01 de fevereiro de 2013.
- Fernandes RC, Evans HC, Barreto RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. **Tropical Plant Pathology** 34 (2): 108-113.
- Fernandez D, Tisserant E, Talhinhos P, Azinheira H, Vieira A, Petitot AS, Loureiro A, Poulain J, Da Silva C, Silva MDC, Duplessis S. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology** 13(1): 17-37.
- Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9: 275-296.
- Gopalkrishnan KS. 1951. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. **Mycologia** 43: 271-283.
- Griffiths G, Simons K. 1986. The Trans Golgi Network - Sorting at the Exit Site of the Golgi-Complex. **Science** 234(4775): 438-443.
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RH, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AM, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JI, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grunwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu CH, Huitema E, Jeong DH, Jones AM, Jones JD, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu Z, Ma L, Maclean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJ, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzon A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort PJ, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PR, Whisson SC, Judelson HS, Nussbaum C. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature** 461(7262): 393-398.
- Hacquard S, Joly DL, Lin YC, Tisserant E, Feau N, Delaruelle C, Legue V, Kohler A, Tanguay P, Petre B, Frey P, Van de Peer Y, Rouze P, Martin F, Hamelin RC, Duplessis S. 2012. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). **Molecular Plant-Microbe Interactions** 25(3): 279-293.

- Heath MC. 2000. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology** 44(3): 321-334.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 22(2): 115-122.
- IOC 2013. International Coffee Organization. In. <http://www.ico.org/mission07>. Acessado em: 01 de fevereiro de 2013.
- Jacobs KA, Collins-Racie LA, Colbert M, Duckett M, Golden-Fleet M, Kelleher K, Kriz R, LaVallie ER, Merberg D, Spaulding V, Stover J, Williamson MJ, McCoy JM. 1997. A genetic selection for isolating cDNAs encoding proteína secretadas. **Gene**198(1-2): 289-296.
- Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, Stebbins E. 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase **Science** 311: 222-226.
- Janssen BJ, Gardner RC. 1990. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. **Plant Molecular Biology** 14(1): 61-72.
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO Journal** 19(15): 4004-4014.
- Jiang RHY, Tripathy S, Govers F, Tyler BM. 2008. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105(12): 4874-4879.
- Jiang RHY, Tyler BM. 2012. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. **Annual Review of Phytopathology** 50: 295-318.
- Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. **Nature** 444(7117): 323-329.
- Kamoun S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology** 44: 41-60.
- Kelley BS, Lee SJ, Damasceno CM, Chakravarthy S, Kim BD, Martin GB, Rose JK. 2010. A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. **Plant Journal** 62(3): 357-366.
- Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 18(11): 1130-1139.

- Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, Ver Loren van Themaat E, van der Does HC, Hacquard S, Stuber K, Will I, Schmalenbach W, Schmelzer E, O'Connell RJ. 2012. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. **PLoS Pathogens** 8(4): e1002643.
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. **Current Biology** 21(14): 1204-1209.
- Kolmer JA, Ordonez ME, Groth JV. 2009. The rust fungi. **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)** pp. 1-8.
- Kushalappa AC 1989. Biology and Epidemiology. In: Kushalappa AC, Eskes AB eds. Coffee rust: epidemiology, resistance and management. Boca Raton: CRC Press, 13-43.
- Lee AH, Hurley B, Felsensteiner C, Yea C, Ckurshumova W, Bartetzko V, Wang PW, Quach V, Lewis JD, Liu YC, Bornke F, Angers S, Wilde A, Guttman DS, Desveaux D. 2012. A bacterial acetyltransferase destroys plant microtubule networks and blocks secretion. **PLoS Pathogens** 8(2): e1002523.
- Lee SJ, Kelley BS, Damasceno CMB, John BS, Kim BS, Kim BD, Rose JKC. 2006. A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 19(12): 1368-1377.
- Link TI, Voegelé RT. 2008. Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. **Molecular Plant Pathology** 9(1): 59-66.
- Maia TA, Zambolim EM, Caixeta ET, Mizubuti ESG, Zambolim L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathology** no prelo.
- MAPA 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>. Acessado em: 01 de fevereiro de 2013.
- Mayne WW. 1932. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* Berk & Br. **Nature** 129: 510.
- Mendgen K, Hahn M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science** 7(8): 352-356.
- Min XJ. 2010. Evaluation of computational methods for secreted proteins prediction in different eukaryotes. **Journal of Proteomics & Bioinformatics** 3: 143-147.

- Noronha-Wagner M, Bettencourt A. 1967. Genetic study of the resistance of coffee spp. to leaf rust: i. identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany** 45: 2021-2131.
- Nunes CC, Maffia LA, Mizubuti ESG, Brommonschenkel SH, Silva JC. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology** 38: 445-452.
- O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L, Alkan N, Altmuller J, Alvarado-Balderrama L, Bauser CA, Becker C, Birren BW, Chen Z, Choi J, Crouch JA, Duvick JP, Farman MA, Gan P, Heiman D, Henrissat B, Howard RJ, Kabbage M, Koch C, Kracher B, Kubo Y, Law AD, Lebrun MH, Lee YH, Miyara I, Moore N, Neumann U, Nordstrom K, Panaccione DG, Panstruga R, Place M, Proctor RH, Prusky D, Rech G, Reinhardt R, Rollins JA, Rounsley S, Schardl CL, Schwartz DC, Shenoy N, Shirasu K, Sikhakolli UR, Stuber K, Sukno SA, Sweigard JA, Takano Y, Takahara H, Trail F, van der Does HC, Voll LM, Will I, Young S, Zeng Q, Zhang J, Zhou S, Dickman MB, Schulze-Lefert P, Ver Loren van Themaat E, Ma LJ, Vaillancourt LJ. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics** 44(9): 1060-1065.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods** 8(10): 785-786.
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legue V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. **Current Biology** 21(14): 1197-1203.
- Pretsch K, Kemen A, Kemen E, Geiger M, Mendgen K, Voegelé R. 2013. The rust transferred proteins-a new family of effector proteins exhibiting protease inhibitor function. **Molecular Plant Pathology** 14(1): 96-107.
- Qutob D, Kamoun S, Gijzen M. 2002. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. **Plant Journal** 32(3): 361-373.
- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Hardham AR, Dodds PN. 2012. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 15(4): 477-482.
- Rajendren RB. 1967. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. **Nature** 213: 105-106.
- Ramiro DA, Escube J, Petitot AS, Nicole M, Maluf MP, Fernandez D. 2009. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II)

- associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology** 58: 944-955.
- Rodrigues CJ. 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. **Fitopatologia Brasileira** 15: 5-9.
- Rodrigues CJ, Bettencourt AJ. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology** 13: 49-70.
- Rodriguez-Herva JJ, Gonzalez-Melendi P, Cuartas-Lanza R, Antunez-Lamas M, Rio-Alvarez I, Li Z, Lopez-Torrejon G, Diaz I, Del Pozo JC, Chakravarthy S, Collmer A, Rodriguez-Palenzuela P, Lopez-Solanilla E. 2012. A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. **Cellular Microbiology** 14(5): 669-681.
- Rooney HC, Van't Klooster JW, van der Hoorn RA, Joosten MH, Jones JD, de Wit PJ. 2005. Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. **Science** 308(5729): 1783-1786.
- Schieber E, Zentmyer GA. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. **Plant Disease** 68: 89-93.
- Schornack S, van Damme M, Bozkurt TO, Cano LM, Smoker M, Thines M, Gaulin E, Kamoun S, Huitema E. 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 107(40): 17421-17426.
- Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintha R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, van der Hoorn RA. 2008. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. **Plant Cell** 20(4): 1169-1183.
- Shen Z, Jacobs-Lorena M. 1999. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. **Journal of Molecular Evolution** 48: 341-347.
- Silva MC, Nicole M, Guerra-Guimarães L, Rodrigues Jr CJ. 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistance coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60: 169-183.
- Silva MC, Várzea MPV, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandes D, Petitot AS, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal Plant Physiology** 18: 119-147.
- Sohn KH, Lei R, Nemri A, Jones JDG. 2007. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 19: 4077-4090. .

- Stergiopoulos I, de Wit PJ. 2009. Fungal effector proteins. **Annual Review of Phytopathology** 47: 233-263.
- Torto TA, Li S, Styer A, Huitema E, Testa A, Gow NA, van West P, Kamoun S. 2003. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. **Genome Research** 13(7): 1675-1685.
- van Boxtel J, Berthouly M, Carasco C, Dufour M, Eskes A. 1995. Transient expression of β -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. **Plant Cell Reports** 14: 748-752.
- van Damme M, Bozkurt TO, Cakir C, Schornack S, Sklenar J, Jones AME, Kamoun S. 2012. The irish potato famine pathogen translocates the CRN8 kinase into host plant cells. **PLoS Pathogens** 8(8): e1002875.
- van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MH, Vervoort J, de Wit PJ. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 19(12): 1420-1430.
- van der Vossen HAM 2005. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea MPV eds. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1-29.
- Várzea MPV, Marques DV 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea MPV eds. Durable Resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 53-74.
- Vishveshwara S, Nag Raj TR. 1960. Nuclear status in basidiospores of *Hemileia vastatrix* B. & Br. **Indian Coffee** 24(3): 118-119.
- Vleeshouwers VG, Driesprong JD, Kamphuis LG, Torto-Alalibo T, Van't Slot KA, Govers F, Visser RG, Jacobsen E, Kamoun S. 2006. Agroinfection-based high-throughput screening reveals specific recognition of INF elicitors in *Solanum*. **Molecular Plant Pathology** 7(6): 499-510.
- Vleeshouwers VG, Rietman H, Krenek P, Champouret N, Young C, Oh S-K, Kamoun S, van der Vossen EAG. 2008. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. **PLoS ONE** 3:e2875.
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, Hein I, Toth IK, Pritchard L, Birch PRJ. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. **Nature** 450(7166): 115.

- Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, Saunders DG, Yoshida K, Dong S, Schornack S, Zipfel C, Robatzek S, Hogenhout SA, Kamoun S. 2012. Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. **Cold Spring Harb Symposia on Quantitative Biology** pp. 1-13.
- Zambolim L, Vale FXR, Pereira AA, Chaves GM. 1997. Controle de doenças de Plantas. Brasília-DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento pp. 83-179.
- Zambolim L, Zambolim EM, Vale FXR, Pereira AA, Sakyama NS, Caixeta ET 2005. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil - Physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim L, M. ZE, Várzea MPV eds. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa - UFV pp. 75-98
- Zipfel C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology** 20(1): 10-16.
- Zipfel C, Felix G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current Opinion in Plant Biology** 8(4): 353-360.
- Zuccaro A, Lahrmann U, Guldener U, Langen G, Pfiffi S, Biedenkopf D, Wong P, Samans B, Grimm C, Basiewicz M, Murat C, Martin F, Kogel KH. 2011. Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. **PLoS Pathogens** 7(10): e1002290.
- Zhu S, Li Y, Vossen JH, Visser GF, Jacobsen E. 2012. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. **Transgenic Research** 21: 89-99.

**CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DE
UREDINIÓSPOROS GERMINADOS DE *Hemileia vastatrix* REVELA NOVOS
CANDIDATOS A EFETORES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS
DURANTE A INTERAÇÃO COM O CAFEIEIRO**

RESUMO

A germinação dos urediniósporos é a primeira etapa no processo de infecção e representa uma fase importante do ciclo de vida de *Hemileia vastatrix*. Durante a patogênese os fungos causadores de ferrugens secretam um arsenal de proteínas efetoras nas diferentes fases do parasitismo, para promover uma infecção bem-sucedida. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar proteínas secretadas de *H. vastatrix* expressas durante a fase de germinação dos urediniósporos, por meio da análise de sequências de uma biblioteca de cDNA construída a partir de mRNA isolado de urediniósporos germinados por 16 h. Efetuou-se o sequenciamento de 7.200 clones de cDNA, e 5.832 etiquetas de sequência expressas (ESTs) foram obtidas. O agrupamento dessas sequências gerou 1.772 unisequências, constituídas por 671 contíguos e 1.101 singletos. Análises *in silico* dessas sequências resultaram na identificação de 146 ORFs que codificam proteínas secretadas. A anotação dessas sequências revelou que 20% do secretoma de urediniósporos germinados são constituídos por enzimas hidrolíticas. A maioria (67%) das proteínas identificadas não possui função conhecida. A partir dessas sequências foram selecionados 35 genes exclusivos de *H. vastatrix* que codificam proteínas com características comuns aos efetores de fungos filamentosos. Desses genes candidatos a efetores, 22 tiveram suas estruturas genômicas completamente caracterizadas. A secreção de oito efetores putativos selecionados foi confirmada em levedura e a análise de expressão temporal, por meio de qRT-PCR, demonstrou que a indução desses oito genes ocorre de forma dinâmica, acompanhando as transições morfológicas do patógeno que ocorre durante os estágios iniciais da patogênese. Estudos funcionais deverão ser efetuados para determinar o papel desses efetores putativos durante a interação de *H. vastatrix* com o cafeeiro.

ABSTRACT

Urediniospore germination is the first stage in the infection process of *Hemileia vastatrix* and represents an important step in its life cycle. During pathogenesis, rust fungi secrete an arsenal of effector deployed during the different stages of parasitism in order to promote a successful infection. The objective of this study was to identify and characterize secreted proteins from *H. vastatrix* expressed during the stage of urediniospore germination by sequence analysis of a cDNA library constructed from mRNA isolated from germinated urediniospores. 7200 cDNA clones were sequenced and 5832 expressed sequence tags (ESTs) were obtained. Grouping of these ESTs based on sequence homology generated 1772 unisequences, consisting of 671 contigs and 1101 singlets. In silico analyses of these unisequences resulted in the identification of 146 ORFs that encode secreted proteins. Annotation of these ORFs revealed that 20% of the secretome from germinated urediniospores consists of hydrolytic enzymes. The majority (67%) of the secreted proteins identified are of unknown function. From these predicted secreted proteins, 35 that are unique to *H. vastatrix* and that share features with effectors from filamentous fungi were selected for further analysis. The genomic sequence of 22 of these effector gene candidates was fully characterized. Secretion of eight selected putative effectors was confirmed in yeast and their temporal expression analysis using qRT-PCR demonstrated that they are induced in a dynamic manner, following the morphological transitions of the pathogen that occur during the early stages of infection. Future functional studies aiming to determine the role of these putative effectors during the interaction of *H. vastatrix* with the coffee plant will be conducted.

1-INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é considerada a principal doença da cafeicultura. O uso de fungicidas para o controle da doença onera o custo de produção. Desta forma, o desenvolvimento de cultivares portadores de genes de resistência é o melhor método de controle porque é econômico, eficiente e não causa impactos ambientais (Zambolim et al., 2005). Apesar do empenho constante dos melhoristas na busca de cultivares com resistência durável, tem-se observado que a resistência dos cultivares resistentes vem sendo suplantada por novas raças fisiológicas do patógeno (Várzea & Marques, 2005).

Estudos realizados no CIFIC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro), Portugal, sobre variabilidade fisiológica de *H. vastatrix* com amostras de urediniosporos provenientes de diferentes países permitiu a identificação de pelo menos 45 raças (Várzea & Marques, 2005; Silva et al., 2006). No Brasil, já foram identificadas 15 raças do fungo (Zambolim et al., 2005; Cabral et al., 2009; Capucho et al., 2012), sendo a raça II a de maior frequência (Zambolim et al., 2005). A ocorrência de raças com amplo espectro de virulência associada à alta diversidade genotípica das populações de *H. vastatrix* (Nunes et al., 2009; Maia et al., 2013) dificulta a obtenção de cultivares de cafeeiro com resistência durável. Apesar de avanços nas áreas de pesquisa sobre diversidade fisiológica e genética de populações, existem poucos trabalhos sobre a caracterização de genes de *H. vastatrix* envolvidos no processo de patogênese e/ou virulência (Fernandez et al., 2012; Vieira et al., 2012). Esse conhecimento é fundamental para compreensão dos mecanismos de infecção do patógeno, o que abre novas perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

Durante a patogênese os fitopatógenos filamentosos secretam um arsenal de proteínas efetoras com a função de suprimir as respostas de defesa e promover o parasitismo (Ellis et al., 2009). A expressão dos genes efetores é induzida durante a colonização dos tecidos vegetais (Kamper et al., 2006; Mosquera et al., 2009; Spanu et al., 2010). Desta forma, os efetores podem ser eficientemente identificados em bibliotecas de cDNA obtidos de folhas infectadas (Bittner-Eddy et al., 2003; Catanzariti et al., 2006; Cramer et al., 2006; Torto-Alalibo et al., 2007; Bowen et al., 2009; As-sadi et al., 2011; Cabral et al., 2011). Essa estratégia, no entanto, envolve o sequenciamento de um grande número de cDNA originado da planta infectada,

devido à maior abundância do mRNA do hospedeiro comparativo ao do patógeno no tecido infectado. Uma alternativa ao uso de tecido vegetal infectado é a utilização de bibliotecas de cDNA de esporos germinados *in vitro* como fonte de etiquetas de sequências expressas (ESTs) na tentativa de identificar efetores expressos na fase inicial da infecção (Posada-Buitrago & Frederick, 2005; Zhang et al., 2008; Mestre et al., 2012; Stone et al., 2012). É importante assinalar que os esporos podem ser obtidos em quantidades consideráveis, sem dificuldades, resolvendo assim o problema da biomassa limitante do patógeno. Para *H. vastatrix* esta estratégia é facilmente exequível, pois urediniósporos de *H. vastatrix* são facilmente obtidos na face abaxial da folha e germinam facilmente *in vitro* (Vieira et al., 2012).

Eventos que antecedem a infecção são importantes para o sucesso do estabelecimento de uma relação biotrófica entre o fungo e a planta. Durante a adesão e a germinação dos urediniósporos de fungos causadores de ferrugem ocorre a formação de uma matriz extracelular (Deising et al., 1992; Braun & Howard, 1994). Nos urediniósporos e no tubo germinativo de *Uromyces vicia-fabae*, agente causal da ferrugem da fava, constatou-se que a matriz contém enzimas hidrolíticas como esterases, lipases e hidrolases, que podem desempenhar papel importante na diferenciação e no desenvolvimento do fungo antes da penetração (Deising et al., 1992; Braun & Howard, 1994). Desse modo, a caracterização de genes expressos durante a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* pode identificar os genes que codificam as enzimas secretadas na fase de pré-penetração envolvidas na patogenicidade do fungo, como também o arsenal de proteínas efetoras expressas durante a fase inicial de infecção. Embora o transcriptoma de *H. vastatrix* expresso durante a fase adiantada da patogênese tenha sido parcialmente caracterizado (Fernandez et al., 2012), não há estudos para identificar e caracterizar genes efetores expressos durante a etapa da germinação dos urediniósporos.

Ainda que o reconhecimento de proteínas efetoras ou proteínas de avirulência secretadas por fungos causadores de ferrugem ocorra dentro do citoplasma da planta (Ellis et al., 2007), o gene de avirulência *AvrM* de *Melampsora lini* é induzido durante a germinação dos urediniósporos *in vitro* (Catanzariti et al., 2006). Ademais, recentes descobertas mostraram que o gene de resistência *RPG1* em trigo é ativado dentro de 5 minutos após a inoculação com uma raça avirulenta de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Constatou-se que a indução do gene *RPG1* é dependente da associação de duas proteínas efetoras sintetizadas nos urediniósporos do fungo (Nirmala et al.,

2010; Nirmala et al., 2011), o que demonstra que as proteínas efetoras de fungos causadores de ferrugem podem ser expressas nos urediniósporos germinados do patógeno, abrindo novas possibilidades de utilizar essas estruturas do patógeno para identificação de efetores com atividade de avirulência.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo a identificação de genes de *H. vastatrix* que codificam proteínas secretadas durante a fase de germinação dos urediniósporos, por meio de análise de transcritômica e ferramentas de bioinformática, visando a futura identificação de genes de avirulência desse patógeno.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix*

Dois gramas de urediniósporos frescos de *H. vastatrix*, isolado HV-01 (raça II), foram suspensos em água destilada estéril contendo 0,05% de tween 80 (Sigma). Após agitação em vórtex por 20 minutos, os urediniósporos foram recuperados por centrifugação a 5.000 rpm, por 10 minutos. Este procedimento foi realizado três vezes, para remover impurezas. Os urediniósporos lavados foram distribuídos de forma homogênea, utilizando-se uma espátula estéril no fundo de placas de poliestireno, na presença de um filme de água. As placas foram fechadas com parafilm® e envolvidas com papel de alumínio para criar um ambiente escuro e úmido necessário à germinação dos esporos. As placas foram incubadas a 22°C por 16 horas. Após esse período avaliou-se a germinação dos esporos com o auxílio de um microscópio de luz. Os urediniósporos germinados e não germinados foram raspados das placas, com auxílio de lamínulas estéreis, e imediatamente triturados em nitrogênio líquido para extração do RNA.

2.2-Construção e sequenciamento da biblioteca de cDNA

O RNA total foi extraído dos urediniósporos germinados utilizando-se o protocolo-padrão desenvolvido por Bilgin et al.(2009). Purificou-se o mRNA conforme instruções do NucleoTrap® mRNA Midi Kit (Macherey-Nagel), e a biblioteca de cDNA unidirecional foi construída conforme instruções do kit Creator™ SMART™ cDNA library construction kit (Clontech), a partir de 0,5 µg de RNA poliadenilado. Os cDNAs resultantes foram clonados no vetor pDNR-LIB (Clontech) e transformados em *Escherichia coli* EC-100 (Epicentre) por eletroporação, e plaqueados em meio LB contendo cloranfenicol (30 µg/ml).

A extração do DNA plasmidial foi realizada ao repicar as colônias para placas de microcultura contendo 1 ml de meio Circle Grow, acrescido de 30 µg/ml de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas, a 280 rpm. Após esse período, elas foram centrifugadas a 2.500 rpm, por 10 minutos, e descartado o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 240 µl de solução G.E.T. pH 7,4

(EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris-HCl 1 M, Glicose 20%) e centrifugadas a 3.000 rpm, por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 80 µl de solução G.E.T. contendo RNase (150 mg/ml) e agitadas por 2 minutos. Uma alíquota de 60 µl da suspensão de células foi transferida para placas de polipropileno de fundo redondo e, em seguida, foram adicionados a cada poço 80 µl de NaOH 0,2 N e SDS 1% (1:1). As placas foram seladas, invertidas quatro a seis vezes e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. As placas foram centrifugadas a 3.700 rpm, por 2 minutos, fez-se a adição de 80 µl de KOAc 3 M pH 4,8, homogeneizou-se por inversão e incubou-se no gelo por 10 minutos. As placas foram então incubadas em estufa a 90°C por 30 minutos, colocadas novamente no gelo por 10 minutos e centrifugadas a 3.700 rpm, por 9 minutos. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante foi filtrada em uma placa Millipore (MAGV N22) por meio de centrifugação (3.000 rpm por 6 minutos). Por fim, foram adicionados 100 µl de isopropanol, homogeneizados por inversão e centrifugados a 3.700 rpm, por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com etanol 70%, centrifugado a 3.700 rpm, por 5 minutos, e ressuspensado em água milli-Q. A quantidade e qualidade do DNA extraído foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, seguido de coloração com brometo de etídeo.

As reações de sequenciamento de 7.200 clones foram realizadas por passagem única, usando o iniciador universal M13F, com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare). A leitura das reações foi realizada em sequenciador automático MegaBACE™ 1000 de 96 capilares (GE Healthcare), no Laboratório de Genômica/BIOAGRO/UFV.

2.3-Análises de bioinformática e predição do secretoma

A qualidade das sequências obtidas foi verificada por meio do pacote phred/phrap/consed (www.phrap.org). Após a remoção de sequências do vetor pelo programa Cross_match (www.phrap.org), elas foram agrupadas pelo programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). A predição das sequências abertas de leitura (ORFs) foi realizada por meio de um script Perl, nas três possíveis fases de leitura positivas. A predição das ORFs na fita antisenso não foi efetuada, uma vez que a clonagem e o sequenciamento foram direcionais (5' - 3'). As proteínas deduzidas das

ORFs foram analisadas com os algoritmos SignalP v4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e TargetP v.1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), para predição de peptídeo sinal e exclusão de sequências protéicas com predição de localização mitocondrial, respectivamente. Um script implementado em Perl foi desenvolvido para remoção do peptídeo sinal, e as proteínas maduras foram analisadas pelo programa TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), para verificação da presença de domínios transmembranas. As sequências das proteínas secretadas foram comparadas com as sequências de proteínas não redundantes do Genbank/NCBI, usando o algoritmo BLASTP ($E_{\text{value}} = 10^{-5}$).

As proteínas que não demonstraram similaridade com as proteínas depositadas no Genbank, codificadas por ORFs completas, foram denominadas de candidatos a efetores de *H. vastatrix* (HvECs). Essas proteínas foram analisadas quanto ao número e à percentagem de resíduos de cisteína na proteína madura e à presença de domínios PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), indicativos de sua provável função biológica. Domínios com valores de $E_{\text{value}} > 10^{-5}$ foram ignorados (Saunders et al. 2012). Por fim, foram comparadas as ORFs completas dos genes candidatos a efetores, por meio do algoritmo BLASTN, com o banco de dados de cDNA obtido de folhas infectadas por *H. vastatrix*, 21 dias após a inoculação, desenvolvido por Fernandez et al.(2012).

2.4-Confirmação da secreção das proteínas HvECs em levedura

As ORFs dos genes HvECs foram amplificadas a partir dos clones originais provenientes da biblioteca de urediniosporos germinados. As sequências dos oligonucleotídeos usados para amplificação das ORFs estão listadas no Anexo 1. Os amplicons obtidos foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e NotI (Invitrogen) e posteriormente submetidos à reação de ligação com o vetor pYST-1 (Lee et al., 2006), previamente digeridos com a mesmas enzimas. O produto da reação de ligação foi usado para transformação de *E. coli* DH5 α e os transformantes foram selecionados em meio LB contendo ampicilina (150 $\mu\text{g/ml}$). Após confirmação dos clones positivos, por PCR de colônia, realizou-se a purificação do DNA plasmidial, usando o kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel). As reações

de sequenciamento foram realizadas com os oligonucleotídeos Y5 (sequenciamento da extremidade 5') e YST-R1 (sequenciamento da extremidade 3') para confirmação da clonagem das ORFs in frame com a invertase. A estirpe BY4742, acesso YIL162w (MAT α , SUC2, his3 Δ , leu2 Δ , lys Δ , ura3 Δ), de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes e confirmação da secreção. A transformação foi realizada de acordo com Gietz & Woods (2002). Os transformantes foram plaqueados em meio YPS sólido (5,0 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona, 25 ml/L de sacarose 40%, 10,0 g/L de ágar) acrescido de antibiótico gentamicina (150 μ g/ml).

2.5-Análise da expressão temporal dos genes HvECs

O protocolo desenvolvido por Bilgin et al. (2009) foi usado para extração de RNA total de urediniósporos dormentes, urediniósporos germinados, folhas de “Catuaí” não inoculadas e folhas de “Catuaí” inoculadas nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação (hai) e 9 dias e 15 dias após inoculação (dai). Os RNAs foram tratados com DNase I RNase-free (Qiagen), seguindo-se a purificação das amostras utilizando o RNeasy CleanUp Kit (Qiagen). A concentração e a qualidade dos RNAs obtidos foram verificadas em NanoDropTM (Thermo Fisher Scientific) e em gel desnaturante de agarose 1,2%, respectivamente. O RNA total de cada amostra foi utilizado para a síntese de cDNA, conforme instruções do kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

A análise de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada pelo método comparativo $2^{-\Delta C_t}$ (Livak & Thomas, 2001). Para quantificação da expressão gênica em cada amostra utilizou-se o valor médio de Ct, resultante de três réplicas biológicas e duas réplicas técnicas. A expressão de cada gene-alvo foi normalizada em relação a expressão dos genes endógenos de *H. vastatrix* GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), CytIII (citocromo c oxidase subunidade III) e *β tub* (β -tubulina), que já foram validados como normalizadores para análises de expressão de genes de *H. vastatrix* in planta (Vieira et al. 2011). As reações de PCR foram feitas com o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Para cada reação de um volume final de 20

μL foram adicionados 40 ng de cDNA, 8 mM de cada iniciador e 12 μL de SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A especificidade das reações foi avaliada por meio da curva de dissociação com gradiente variando de 60°C a 95°C, com incremento de 1°C a cada 30 segundos. As sequências dos oligonucleotídeos dos genes analisados por qRT-PCR estão listadas em Anexo 2.

2.6-Análise da estrutura genômica dos genes HvECs

O DNA genômico de *H. vastatrix*, isolado HV-01 (raça II), foi extraído de 50 mg de urediniósporos, segundo Maia et al. (2013). As sequências genômicas das ORFs dos genes HvECs foram amplificadas por PCR a partir desse DNA, utilizando os oligonucleotídeos listados no Anexo 1. Os amplicons resultantes foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em *E. coli* estirpe DH5 α , por choque térmico. Os clones transformantes recombinantes foram selecionados em meio LB contendo ampicilina (150 mg/ml), IPTG (100 mg/ml) e X-Gal (20 mg/ml). A purificação do DNA plasmidial dos clones positivos foi realizada com o kit NucleoSpin[®]Plasmid e os plasmídeos foram quantificados por eletroforese em gel de agarose 1%. As reações de sequenciamento foram realizadas como descrita no tópico 2.2, utilizando os oligonucleotídeos M13F e M13R. A presença de íntrons nas sequências genômicas foi detectada por meio do alinhamento com as sequências dos cDNAs correspondentes, usando o programa ClustalW.

3-RESULTADOS

Após a incubação dos urediniósporos frescos de *H. vastatrix* (raça II) por 16 horas em placas de poliestireno, observou-se que aproximadamente 80% dos urediniósporos tinham germinado, produzindo um tubo germinativo longo e reamificado (Fig. 1).

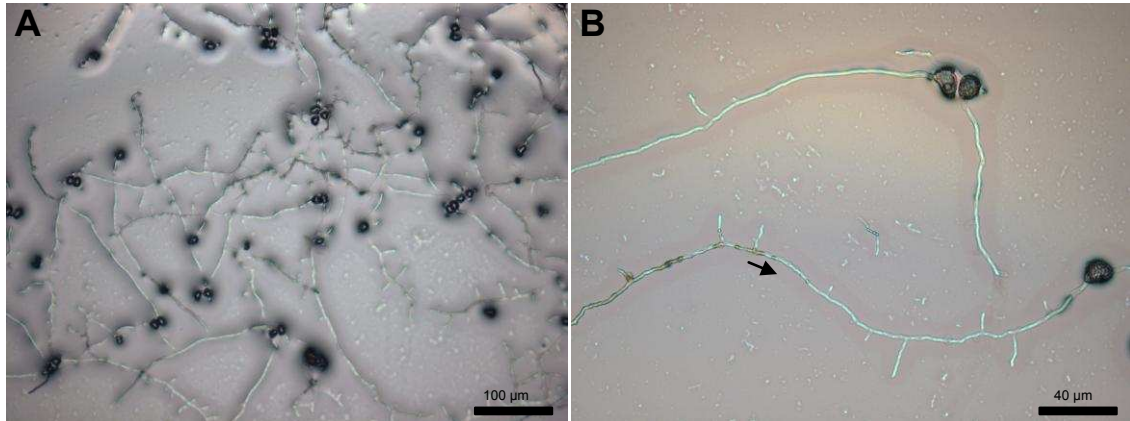


Figura 1: Morfologia dos urediniósporos germinados de *H. vastatrix* (raça II) após 16 horas de incubação em superfície plástica de poliestireno. (A) urediniósporos e tubos germinativos aderidos ao fundo da placa. (B) urediniósporo emitindo um tubo germinativo longo e ramificado de aproximadamente 320 μm (seta preta).

Foram sequenciados 7.200 clones da biblioteca de cDNA construída com a utilização de mRNA isolado de urediniósporos germinados in vitro (Fig. 1), tendo sido obtidos 5.832 ESTs com qualidade phred > 20 e tamanho superior a 70 nucleotídeos. O agrupamento dessas sequências com o algoritmo CAP3 resultou em 1.772 unisequências, com o comprimento médio de 553 pb, constituídas por 671 contíguos e 1.101 singletos (Tabela 1).

Tabela 1: Unisequências obtidas pelo agrupamento de 5.832 ESTs geradas por sequenciamento Sanger da biblioteca de cDNA de urediniósporos germinados de *Hemileia vastatrix*.

Sequências analisadas	Singletos	Contíguos	Unigenes
Número de sequências	1.101	671	1.772
Comprimento médio das sequências	503 pb	636pb	553 pb
Nº de bases analisadas	0,55 Mb	0,43 Mb	0,98 Mb

A triagem das sequências protéicas deduzidas a partir das ORFs preditas com os algoritmos SignalP, TargetP e TMHMM resultou na identificação de 146 proteínas com um peptídeo sinal na extremidade N-terminal e sem domínio transmembrana (Fig. 2A). Cinquenta proteínas preditas (34,25%) não demonstraram similaridade significativa ($E_{\text{value}} > 10^{-5}$) com sequências protéicas depositadas no Genbank; 48 proteínas (32,88%) apresentaram similaridade com proteínas cujas funções são ainda desconhecidas; 29 (19,86%) apresentaram similaridade com enzimas hidrolíticas; e 19 (13,01%) foram similares a proteínas com outras funções (Fig. 2B).

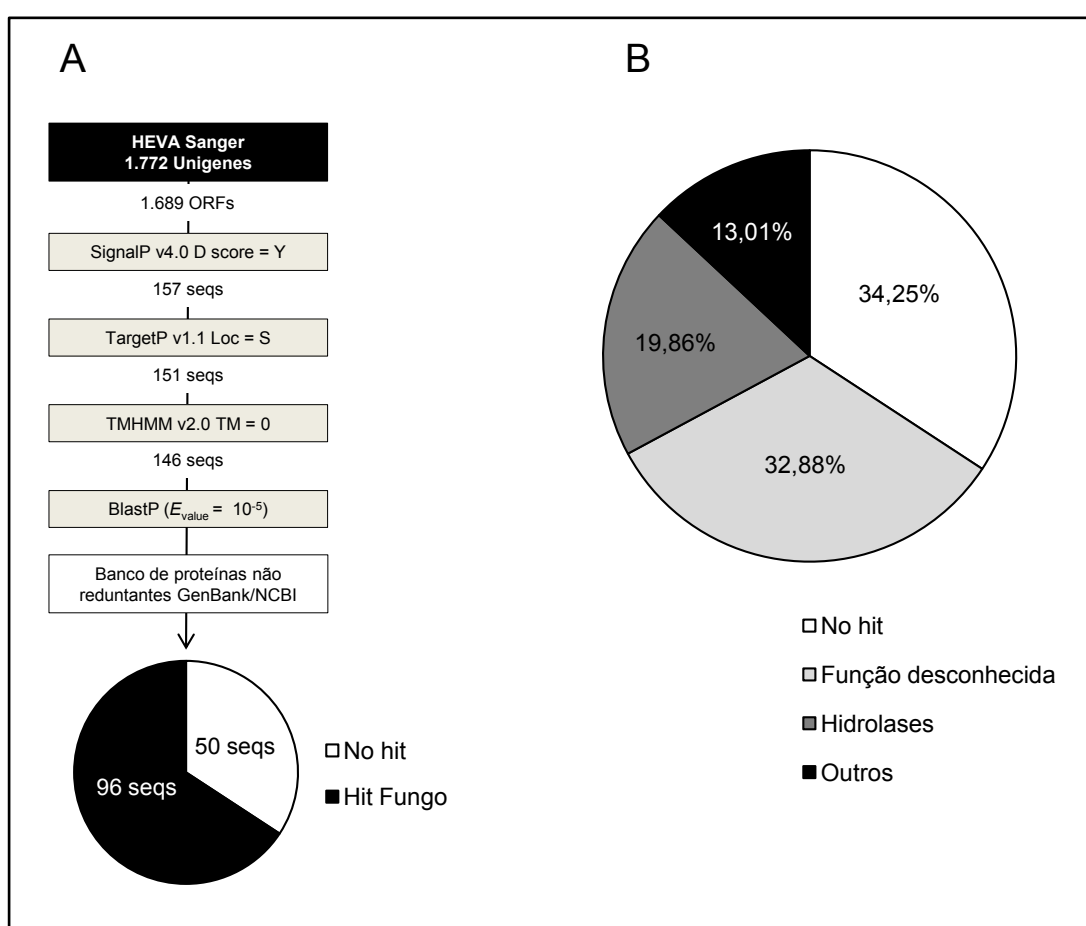


Figura 2: Análises de predições e anotação do secretoma de urediniósporos germinados de *H. vastatrix*. **(A)** Análise de bioinformática realizada para fazer a predição de proteínas secretadas sem domínio transmembranas. **(B)** Classificação das proteínas secretadas: 50 proteínas (34,25%) não apresentaram similaridade (No hit) com sequências protéicas depositadas no Genbank; 48 proteínas (32,88%) apresentaram similaridade com sequências protéicas de função desconhecidas; 29 proteínas (19,86%) apresentaram similaridade com enzimas hidrolíticas; e 19 proteínas (13,01%) apresentaram similaridade com outras funções.

Das 146 unisequências que codificam proteínas secretadas sem domínio transmembrana, 43 (29,5%) são constituídas por pelo menos 10 ESTs (Fig.3).

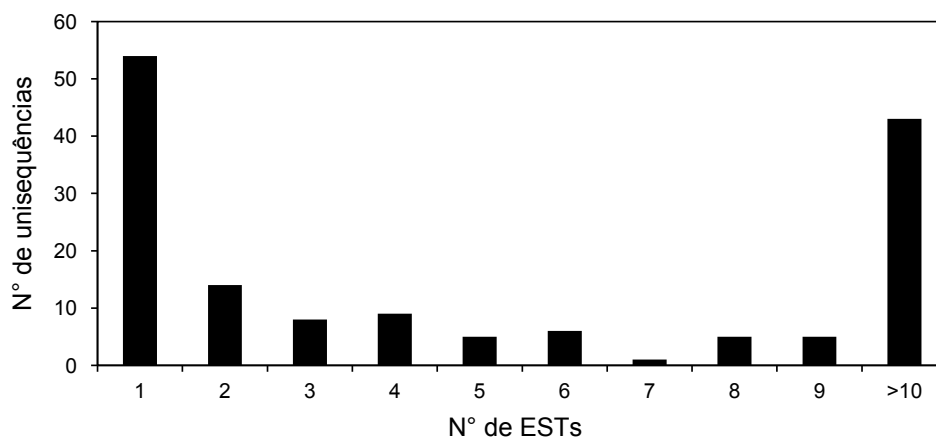


Figura 3: Frequência da distribuição dos ESTs pertencentes ao mesmo contíguo ou singleto que codificam proteínas do secretoma de urediniósporos germinados: 53 unisequências foram constituídas por um EST; 50 contíguos foram constituídos por 2 a 9 ESTs; e 43 contíguos foram constituídos por no mínimo 10 ESTs.

Entre as 48 proteínas anotadas com função desconhecida (Fig. 2B), 16 têm similaridade com proteínas secretadas de *Melampsora larici-populina* e 32 sequências protéicas têm similaridade com proteínas hipotéticas (Anexo 3). No conjunto de proteínas com similaridade a enzimas hidrolíticas destacam-se algumas que mostraram similaridade com enzimas extracelulares conhecidas, que podem contribuir para a patogenicidade ou desenvolvimento do patógeno.

Dezesseis proteínas apresentaram similaridade com glicosídeos hidrolases (GH), também conhecidas como glicosidases (Anexo 3). Entre os contíguos que codificam proteínas com similaridade à GH, somente três (contíguo 173, contíguo 484 e contíguo 607) representam GH que possuem como substrato a parede celular vegetal, dentre elas as GH26, GH27 e GH61 (Duplessis et al. 2011). Por outro lado, foram identificadas nove unisequências que codificam proteínas apresentando similaridade à GH, membros das famílias GH16 (contíguo 149, contíguo 506, contíguo 582, contíguo 588), GH17 (contíguo 514), GH18 (HEVA-02-044-B05), GH71 (contíguo 175) e GH76 (contíguo 465), que possuem como substratos componentes da parede celular do fungo (Duplessis et al. 2011).

As hidrolases também foram representadas por dois contíguos (contíguo 27 e contíguo 568) que codificam proteínas com similaridade à quitina deacetilase e três contíguos (contíguo 297, contíguo 446 e contíguo 629) que codificam proteínas similares à família quatro de carboidrato esterase, que também possuem atividade de

quitina deacetilase (<http://www.cazy.org/CE4.html>). Também foram identificadas quatro unisequências que codificam para proteínas com similaridade a lípases (contíguo 165, HEVA-03-010-B03, HEVA-02-043-F10 e HEVA-01-019-D05) (Anexo 1).

Ainda dentro das hidrolases, destacam-se dois contíguos que codificam proteínas com similaridade a carboxipeptidase (contíguo 335) e com subtilisina protease (contíguo 480). O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução das ORFs completas representadas pelos contíguos 335 e 480 comparados com as sequências de aminoácidos parciais das proteínas carboxipeptidase e subtilisina protease, respectivamente, é demonstrado na Figura 4.

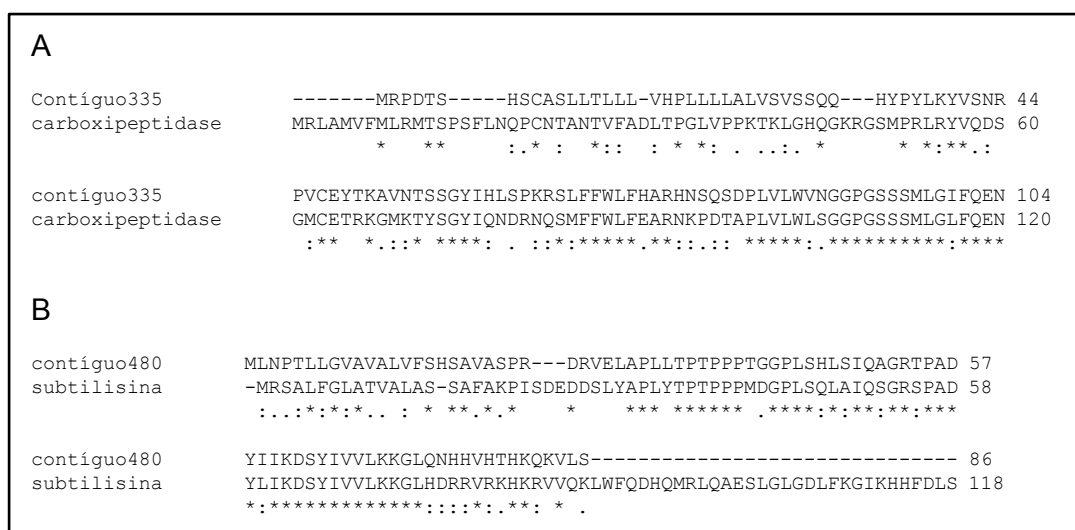


Figura 4: Alinhamento pelo programa ClustalW das sequências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução das ORFs completas representadas pelas unisequências contíguo 335 (A) e contíguo 480 (B), quando comparadas com as sequências de aminoácidos das proteínas carboxipeptidase (acesso: EGG07771) e subtilisina protease (acesso: EGG04425), respectivamente, que apresentaram similaridade de sequência quando comparadas pelo algoritmo BLASTP. Pontos: “*” = identidade; “:” = substituição conservada; “.” = substituição semi-conservada.

Entre as proteínas classificadas em outras funções destacam-se dois singletos HEVA-03-001-F10 e HEVA-01-019-H03 que codificam proteínas com similaridade à enzimas dissulfeto isomerases (Anexo 3). Seguindo a mesma linha de proteínas classificadas com outras funções, foram identificados dois contíguos (contíguo 368 e contíguo 398) que codificam proteínas com similaridade a superóxido dismutase, enzima relacionada com detoxificação de espécies reativas de oxigênio. O alinhamento de aminoácidos deduzidos a partir das ORFs completa e parcial

representadas pelas unisequências contíguo 368 e contíguo 398, respectivamente, é apresentado na Figura 5.



Figura 5: Alinhamento pelo programa ClustalW das sequências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução dos contíguo 368 (A) e contíguo 398 (B) que codificam para proteínas com similaridade a manganês superóxido dismutase (Mn-SOD; acesso: EGG05480) e cobre e zinco superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD; acesso: EGF98975), respectivamente, que apresentaram similaridade de sequência quando comparadas pelo algoritmo BLASTP.

As 50 proteínas secretadas que não demonstraram similaridade com sequências protéicas depositadas no Genbank (Fig. 2) podem ser proteínas específicas de *H. vastatrix*. Essas proteínas, prováveis efetores expressos durante a fase de germinação, foram denominados HvECs (*H. vastatrix* effector candidates). Dessas proteínas, foram selecionadas 35 HvECs que são codificadas por ORFs completas e possuem tamanho variando de 71 a 289 aminoácidos (Tabela 2). Dezesete HvECs contém quatro ou mais resíduos de cisteína no peptídeo maduro e 14 HvECs possuem > 5% de resíduos de cisteína em suas sequências protéicas

(Tabela 2). Nenhum dos HvECs apresentou similaridade significativa ($E_{\text{value}} < 10^{-5}$) com domínios Pfam (Tabela 2).

Dez ORFs HvEC-024, HvEC-025, HvEC-030, HvEC-033, HvEC-037, HvEC-040, HvEC-042, HvEC-043, HvEC-047, HvEC-118, apresentaram identidade com as sequências descritas por Fernandez et al. (2012) (Tabela 2). No entanto, o alinhamento das ORFs HvEC-040, HvEC-042, HvEC-118 demonstrou que as sequências relatadas por esses pesquisadores não estão completas. Adicionalmente, constatou-se que cinco ORFs HvEC-026, HvEC-029, HvEC-045, HvEC-114, HvEC-122, apresentaram similaridade com as sequências de Fernandez et al. (2012), mas o alinhamento demonstrou tratar-se de genes diferentes. Por fim, 20 HvECs não apresentaram similaridade com as sequências identificadas por esses pesquisadores (Tabela 2). Desse modo, pode-se concluir que 28 genes HvECs (80%) representam novas sequências que codificam proteínas secretadas durante a fase de germinação de *H. vastatrix*.

Para validar funcionalmente a predição do peptídeo sinal dos genes HvECs com ORFs completas, realizou-se um ensaio de secreção no sistema armadilha de sinal de secreção em levedura (Yeast Secretion Trap). A secreção foi confirmada *in vitro* para oito HvECs, HvEC-025, HvEC-027, HvEC-030, HvEC-034, HvEC-035, HvEC-041, HvEC-042, HvEC-043 (Tabela 2).

Tabela 2: Genes candidatos a efetores de *H. vastatrix* (HvECs) preditos no secretoma de urediniósporos germinados, cujas ORFs estão completas e não possuem similaridade com sequências depositadas no Genbank.

Genes	Contig/Singletos	N° ESTs	N° aas Proteína	SignalP D-value	N° aas Ptn Madura	N° Cisteína	% Cisteína	Secreção Levedura	BLASTN Fernandez et al. (2012)
HvEC-024*	Contig104	6	81	0,871	62	1	1,6	N.D.	contig03273 (Evalue = 10 ⁻¹³⁸)
HvEC-025*	Contig129	8	74	0,886	54	0	0	positiva	contig08019(Evalue = 10 ⁻⁵⁸)
HvEC-026	Contig132	13	74	0,882	54	0	0	N.D.	contig08019 (Evalue = 10 ⁻³²)
HvEC-027	Contig149	23	186	0,699	164	1	0,6	positiva	No hit
HvEC-028	Contig173	55	289	0,598	267	0	0	N.D.	No hit
HvEC-029	Contig200	27	117	0,806	101	4	4	N.D.	contig13668 (Evalue = 10 ⁻¹⁷)
HvEC-030*	Contig289	12	127	0,875	107	6	5,6	positiva	contig11424(Evalue = 0)
HvEC-031	Contig355	13	108	0,840	85	9	10,6	N.D.	No hit
HvEC-032	Contig401	2	82	0,732	62	1	1,6	N.D.	No hit
HvEC-033*	Contig428	2	89	0,754	67	0	0	N.D.	contig03932 (Evalue = 10 ⁻¹⁴³)
HvEC-034	Contig567	67	108	0,856	85	9	10,6	positiva	No hit
HvEC-035	Contig605	5	124	0,831	105	0	0	positiva	No hit
HvEC-036	HEVA_01_002_A12	1	104	0,832	75	0	0	N.D.	No hit
HvEC-037*	HEVA_02_006_A06	1	87	0,678	68	0	0	N.D.	contig07307 (Evalue = 10 ⁻¹²¹)
HvEC-038	HEVA_02_025_F09	1	112	0,757	95	6	6,3	N.D.	No hit
HvEC-039	HEVA_02_034_E12	1	89	0,721	68	1	1,5	N.D.	No hit
HvEC-040 ^Δ	HEVA_02_041_B08	1	109	0,829	84	1	1,2	N.D.	contig10278 (Evalue = 10 ⁻¹⁰⁰)
HvEC-041	HEVA_03_006_F11	1	112	0,756	90	6	6,7	positiva	No hit
HvEC-042 ^Δ	HEVA_01_010_F02	1	174	0,814	152	4	2,6	positiva	contig12383(Evalue = 10 ⁻⁹⁹)
HvEC-043*	HEVA_01_018_E05	1	71	0,815	52	0	0	positiva	contig00063(Evalue = 10 ⁻⁷⁹)
HvEC-045	HEVA_01_015_A06	1	127	0,719	104	4	3,8	N.D.	contig17858 (Evalue = 10 ⁻⁷²)
HvEC-046	HEVA_01_018_G12	1	185	0,784	165	0	0	N.D.	No hit

Tabela 2: Continuação

Genes	Contig/Singletos	N° ESTs	N° aas Proteína	SignalP D-value	N° aas Ptn Madura	N° Cisteína	% Cisteína	Secreção Levedura	BLASTN Fernandez et al. (2012)
HvEC-047*	HEVA_01_018_H12	1	149	0,860	129	8	6,2	N.D.	contig22364(Evalue = 0)
HvEC-113	Contig128	28	107	0,877	84	9	10,7	N.D.	No hit
HvEC-114	Contig14	5	79	0,882	59	0	0	N.D.	contig08019 (Evalue = 10 ⁻³²)
HvEC-115	Contig160	5	78	0,572	51	2	3,9	N.D.	No hit
HvEC-116	Contig201	7	122	0,882	101	10	9,9	N.D.	No hit
HvEC-117	Contig202	21	107	0,899	85	8	9,4	N.D.	No hit
HvEC-118 ^Δ	Contig424	3	122	0,837	103	10	9,7	N.D.	contig23102 (Evalue = 10 ⁻¹²⁴)
HvEC-119	Contig98	18	107	0,899	85	8	9,4	N.D.	No hit
HvEC-120	HEVA_01_013_D07	1	129	0,508	98	9	9,2	N.D.	No hit
HvEC-121	HEVA_02_002_H07	1	102	0,496	80	1	1,3	N.D.	No hit
HvEC-122	HEVA_02_003_H07	1	126	0,865	106	10	9,4	N.D.	Contig17928 (Evalue = 10 ⁻³²)
HvEC-123	HEVA_02_032_G08	1	132	0,580	120	10	8,3	N.D.	No hit
HvEC-124	HEVA_03_010_B04	1	98	0,697	82	3	3,7	N.D.	No hit

* ORFs apresentando identidade com sequências completas identificadas por Fernandez et al. (2012).

^Δ ORFs apresentando identidade com sequências incompletas identificadas por Fernandez et al. (2012).

N.D. = não determinado.

A análise de expressão dos oito genes HvECs, que codificam proteínas secretadas em levedura (Tabela 2), foi feita por PCR em tempo real (Fig. 6). O nível de expressão relativa desses genes em urediniósporos dormentes e germinados foi baixo, comparado ao nível de expressão observado durante a interação de *H. vastatrix* com o cafeeiro (Fig.6). Cinco padrões diferentes de expressão foram observados (Fig.6A, B, C, D e E). O gene HvEC-025 apresentou maior nível de expressão em 24 hai (Fig. 6A) e os genes HvEC-42 e HvEC-41 apresentaram maior nível de expressão nos tempos 48 e 72 hai, respectivamente (Fig. 6B e C). Já os genes HvEC-027, HvEC-30, HvEC-34 e HvEC-35 apresentaram padrões semelhantes de expressão com maiores níveis de expressão nos tempos 24, 48 e 72 hai (Fig. 6E). O gene HvEC-034 foi o que apresentou o maior nível de expressão, aproximadamente 200 vezes maior do que os controles endógenos (Fig.6E). Esse resultado está de acordo com o grande número de ESTs (64 clones) encontrados na biblioteca de urediniósporos germinados (Tabela 2). Apenas o gene HvEC-043 apresentou expressão aos 15 dpi (Fig. 6D).

A estrutura genômica foi determinada para 22 genes HvECs (Tabela 3). Os amplicons obtidos a partir da amplificação realizada com DNA genômico apresentaram tamanho variando de 216 (HvEC-043) à 778 (HvEC-027) nucleotídeos (Tabela 3). O gene HvEC-035 apresentou dois amplicons genômicos de tamanhos diferentes. O amplicon menor possui 375 pb e o maior 625 pb (Tabela 3). Com base no alinhamento das ORFs deduzidas a partir das sequências de cDNA com as sequências dos amplicons obtidos a partir do DNA genômico, verificou-se o sítio de splicing na junção éxon-íntron (Fig. 7). Dos 23 amplicons genômicos analisados, 16 apresentam íntrons, sendo que a maioria deles (dez genes HvECs) possui dois íntrons (Tabela 3). As junções de splicing canônicas do tipo GT-AG nas regiões que flanqueiam as possíveis sequências intrônicas foram identificadas em 30 íntrons, correspondendo a 86% dos íntrons analisados. O resultado do alinhamento da sequência de cDNA do gene HvEC-043 com seus dois amplicons genômicos HvEC-043A e HvEC-043B é apresentado na Figura 7.

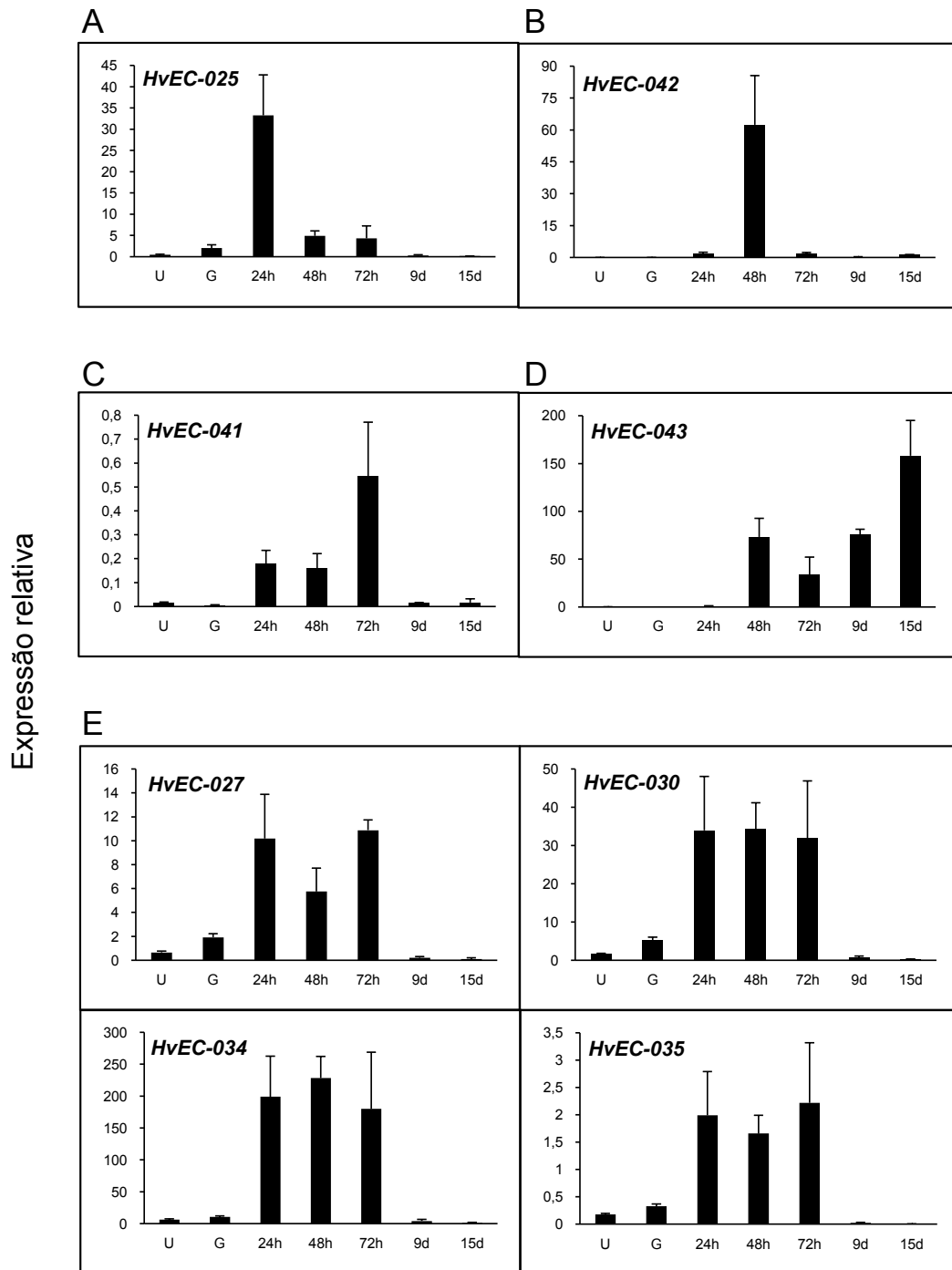


Figura 6: Análise de expressão por PCR em tempo real (qRT-PCR) de oito genes HvECs que codificam proteínas secretadas por urediniósporos germinados, cuja secreção foi confirmada em levedura. O padrão de expressão relativa dos genes-alvo foi acessado em urediniósporos dormentes (U), urediniósporos germinados (G) e plantas de “Catuaí” nos tempos 24 horas (24h), 48 horas (48h), 72 horas (72h), 9 dias (9d) e 15 dias (15) após a inoculação com *H. vastatrix*. O nível de expressão dos genes-alvo foi normalizado com três genes endógenos de *H. vastatrix*: CytIII, GADPH e β -tub. (A) HvEC-025 com maior nível de expressão em 24h; (B) HvEC-042 com maior nível de expressão em 48h; (C) HvEC-041 com maior nível de expressão em 72h; (D) HvEC-045 com nível de expressão em 15d; (E) HvECs com maiores níveis de expressão em 24, 48 e 72h.

Tabela 3: Análise da estrutura genômica de 23 genes candidatos a efetores de *H. vastatrix* (HvECs) expressos durante a germinação dos urediniósporos.

Genes HvECs	Comprimento das ORFs	Comprimento dos amplicons genômicos	Nº de íntrons
HvEC-024	246 pb	384 pb	2
HvEC-025	225 pb	363 pb	2
HvEC-026	225 pb	360 pb	2
HvEC-027	561 pb	778 pb	3
HvEC-029	354 pb	521 pb	2
HvEC-030	384 pb	582 pb	2
HvEC-031	327 pb	458 pb	2
HvEC-032	249 pb	399 pb	2
HvEC-033	270 pb	270 pb	0
HvEC-034	327 pb	459 pb	2
HvEC-035A	375 pb	375 pb	0
HvEC-035B	375 pb	625 pb	3
HvEC-036	315 pb	315 pb	0
HvEC-037	264 pb	332 pb	1
HvEC-038	339 pb	339 pb	0
HvEC-039	270 pb	350 pb	1
HvEC-040	330 pb	330 pb	0
HvEC-041	339 pb	338 pb	0
HvEC-042	525 pb	690 pb	3
HvEC-043	216 pb	216 pb	0
HvEC-045	384 pb	663 pb	4
HvEC-046	558 pb	703 pb	2
HvEC-047	450 pb	557 pb	2

HvEC_cDNA_035	ATGTTTTTGCGGTCTATAATTTTTTTTACTCTGAGCT-----	37
HvEC_gDNA_35A	ATGTTTTTGCGGTCTATAATTTTTTTTACTCTGAGCT-----	37
HvEC_gDNA_35B	ATGTTTTTGCGGTCTATAATTTTTTTTACTCTGAGCT <u>gttagttgaccocctatatatcg</u>	60

HvEC_cDNA_035	-----TCATTGGCTTTTCCCATGCTG	58
HvEC_gDNA_35A	-----TCATTGGCTTTTCCCATGCTG	58
HvEC_gDNA_35B	<u>tttcgtgttacttctgatactcatttttattttatttag</u> TCATTGGCTTTTCCCATGCTG	120

HvEC_cDNA_035	CTCTACAACAAGGACTTAAAAG-----	80
HvEC_gDNA_35A	CTCTACAACAAGGACTTAAAAG-----	80
HvEC_gDNA_35B	CTCTACAACAAGGACTTAAAAG <u>gtatgcaaaattcaatagcgaagaaaatattcatctttc</u>	180

HvEC_cDNA_035	-----CCTGGTGATTCTCGGATGCTTCTACCAA	110
HvEC_gDNA_35A	-----CCTAGGTGATTCTCGGATGCTTCTACCAA	110
HvEC_gDNA_35B	<u>taattaactgtgtattttcaaaatttgaag</u> CCTGGTGATTCTCGGATGCTTCTACCAA	240
.**		
HvEC_cDNA_035	TTTGGGGGCTATTCCAATCCTTTAGACCTAATTCATTTGGAGCGAAGAAGCTTATAGTCC	170
HvEC_gDNA_35A	TTTGGGGGCTATTCCAATCCTTTAGACCTAATTCATTTGGAGCGAAGAAGCTTATAGTCC	170
HvEC_gDNA_35B	TTTGGGGGCTATTCCAATCCTTTAGACCTAATTCATTTGGAGCGAAGAAGCTTATAGTCC	300

HvEC_cDNA_035	AAGGTCAAATGG-----	182
HvEC_gDNA_35A	AAGGTCAAATGG-----	182
HvEC_gDNA_35B	AAGGTCAAATGG <u>gtgaagcctctaactctttcttctcgttgcaactctaagttatgctaaa</u>	360

HvEC_cDNA_035	-----	
HvEC_gDNA_35A	-----	
HvEC_gDNA_35B	<u>cggaacatcttcttaacaggctttacattatataatattgcctgtggtatgattttt</u>	420

HvEC_cDNA_035	-----ATTGAAGCCCATAAAAAGACCTCTGAAAGAGTCAAGAGCTTTGAGCTT	230
HvEC_gDNA_35A	-----ATTGAAGCCCATAAAAAGACCTCTGAAAGAGTCAAGAGCTTTGAGCTT	230
HvEC_gDNA_35B	<u>tccttttccag</u> ATTGAAGCCCATAAAAAGACTTCTGAAAGAGTCAAGAGCTTTGAGCTT	480

HvEC_cDNA_035	ATCCATACCGAGTCAAACCTTATATGAAGTACCCAGAACCAAAAGGATAACAGTGGTCC	290
HvEC_gDNA_35A	ATCCATACCGAGTCAAACCTTATATGAAGTACCCAGAACCAAGAGGATAACAGTGGTCC	290
HvEC_gDNA_35B	ATCCATACCGAGTCAAACCTTATATGAAGTACCCAGAACCAAGAGGATAACAGTGGTCC	540

HvEC_cDNA_035	TTTCACTATAATTGATAATCTTTCATCAAACCTCGACTCTAGTTCCTTTTGTAGAGATAGG	350
HvEC_gDNA_35A	TTTCACTATAATTGATAATCTTTCATCAAACCTCGACTCTAGTTCCTTTTGTAGAGATAGG	350
HvEC_gDNA_35B	TTTCACTATAATTGATAATCTTTCATCAAACCTCGACTCTAGTTCCTTTGTAAAGATTGG	600

HvEC_cDNA_035	GGGTCAAGTTTTAAGCAAATCTTGA	375
HvEC_gDNA_35A	GGGTCAAGTTTTAAGCAAATCTTGA	375
HvEC_gDNA_35B	GGGTCAAGTTTTAAGCAAATCTTGA	625

Figura 7: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos fragmentos genômicos amplificados dos genes HvEC-035A e HvEC-035B com o cDNA correspondente referente à região codificadora do gene HvEC-035, utilizando o programa ClustalW. Em letras minúsculas e em itálico estão as possíveis seqüências intrônicas. As junções de splicing canônicas do tipo GT-AG nas regiões que flanqueiam as possíveis seqüências intrônicas do gene HvEC-035B estão sublinhadas. Os éxons estão representados por letras maiúsculas.

4-DISCUSSÃO

Por meio das análises de bioinformática de um banco de ESTs construído pelo sequenciamento de cDNA de urediniósporos germinados, foi possível identificar 146 ORFs que codificam proteínas secretadas sem domínios transmembranas, demonstrando que a abordagem adotada foi eficiente para caracterizar parcialmente o secretoma expresso em urediniósporos germinados de *H. vastatrix*. A anotação dessas proteínas demonstrou que a maioria (34,23%) não possui similaridade no Genbank, as quais podem ser consideradas proteínas específicas de *H. vastatrix*. Das sequências protéicas que apresentam similaridade no banco de dados, a maioria (50%) é representada por proteínas de função desconhecidas.

Entre as proteínas anotadas com função conhecidas, a maioria (60%) apresentou similaridade com enzimas hidrolíticas. Dentre elas, 16 demonstraram similaridade a glicosídeos hidrolases (GH), enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica para gerar moléculas de açúcares menores (www.cazypedia.org). Apenas três proteínas apresentaram similaridade com GH envolvidas com a degradação de parede celular vegetal, membros da família GH26, GH27 e GH61, as quais possuem atividade de endo- β -1,4-mananase, α -galactosidase e endo- β -1,4-glucanase, respectivamente (www.cazy.org). Esse reduzido número de enzimas com atividade sobre componentes da parede celular vegetal pode ser explicado pelo fato da penetração de *H. vastatrix* ocorrer de forma passiva, através dos estômatos, na face abaxial da folha do cafeeiro. Duplessis et al. (2011) constataram que no genoma completo de *M. larici-populina* e *P. graminis* sp. *tritici* a quantidade de genes que codificam para GH é bem menor que em outros fitopatógenos com estilos de vida hemibiotrófico ou necrotrófico, indicando que os fungos causadores de ferrugem possuem um limitado conjunto de enzimas hidrolíticas para degradação do tecido vegetal.

Por outro lado, a maioria das GH anotadas no secretoma de urediniósporos germinados tem especificidade por componentes da parede celular do fungo. Foram identificadas nove proteínas com similaridade à GH membros das famílias GH16, GH17, GH18, GH71 e GH76, as quais possuem atividade de β -glucanase, β -1,3-glucanase, quitinase, α -1,3-glucanase e α -mananase, respectivamente (Duplessis et al. 2011). Durante a germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix* ocorre a

formação de um tubo germinativo ramificado. Para construção dessa estrutura, o fungo necessita romper localmente sua parede celular para ocorrer a elongação do tubo germinativo e, em seguida, a formação do apressório para penetrar o tecido vegetal (Coutinho et al., 1993). Sendo assim, as proteínas com similaridade à GH identificadas estão possivelmente envolvidas com a modelagem das estruturas da parede celular do patógeno.

Entre as unisequências relacionadas às hidrolases, destacam-se dois contíguos (contíguo 27 e contíguo 568) que codificam proteínas com similaridade a quitina deacetilase e três contíguos (contíguo 297, contíguo 446 e contíguo 629) que codificam proteínas com similaridade à família quatro de carboidrato esterase, enzima cuja função também está relacionada com atividade de quitina deacetilase (www.cazy.org/CE4). A conversão de quitina à quitosano não somente protege as estruturas do fungo contra o ataque de quitinases presentes nos tecidos da planta, como também previne a liberação de oligômeros de quitina responsáveis por desencadear a resistência da planta (El Gueddari et al., 2002). Os genomas de *M. larici-populina* e *P. graminis* f. sp. *tritici* são enriquecidos com sequências que codificam quitina deacetilase (Duplessis et al., 2011), indicando que a ação dessas enzimas é importante durante a patogênese das ferrugens.

As proteases são importantes enzimas hidrolíticas de fitopatógenos que podem ter papéis na sinalização, nutrição, degradação da parede celular e digestão de proteínas envolvidas na resposta de defesa da planta (Carlile et al., 2000; Olivieri et al., 2002; Thon et al., 2002; Plummer et al., 2004). No secretoma de urediniosporos germinados foram identificados dois contíguos (contíguo 335 e contíguo 480) que codificam proteínas com similaridade à carboxipeptidase e subtilisina protease, respectivamente. Estas proteases são conhecidas por apresentarem papel na patogenicidade, pois podem estar envolvidas com a degradação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, que são proteínas que se acumulam na parede celular vegetal e podem contribuir para resistência, agindo como uma barreira estrutural (Dow et al., 1998; Sreedhar et al., 1999; Di Pietro et al., 2001). Membros dessas proteases foram constatadas estar em expansão nos genomas de *M. larici-populina* e *P. graminis* f. sp. *graminis* (Duplessis et al., 2011). A identificação dessas proteases durante a germinação de urediniosporos indica o possível papel dessas enzimas durante a fase inicial da patogênese de *H. vastatrix*.

As unisequências representadas pelo contíguo 165 e os singletons HEVA-03-010-B03 e HEVA-02-043-F10 codificam proteínas com similaridade a lipases, que também podem apresentar papel importante na patogenicidade. Os fungos secretam esterases e cutinases que catalizam a hidrólise das ligações éster dos polímeros de ácidos graxos, facilitando a penetração através da cutícula (Kolattukudy, 1985; Rogers et al., 1994; Voigt et al., 2005). No caso de *H. vastatrix*, a penetração ocorre através dos estômatos, levando assim ao questionamento da necessidade dessas enzimas hidrolíticas no processo infeccioso desse patógeno. Sendo assim, convém especular que a necessidade dessas enzimas pode estar relacionada com o processo de adesão dos urediniósporos na superfície do hospedeiro (Deising et al., 1992) e/ou com o reconhecimento da topografia da superfície requerida para tigmotropismo do tubo germinativo (Braun & Howard, 1994).

No grupo das proteínas anotadas com outras funções destacam-se dois contíguos que codificam proteínas com similaridade a superoxide dismutase (SOD), uma Manganês-SOD (contíguo 368) e uma Cobre/Zinco-SOD (contíguo 398). Duplessis et al. (2011) constataram que os genomas de *M. larici populina* e *P. graminis* f. sp. *graminis* têm maior número de genes que codificam SOD que outros fungos. As SOD são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio produzidas pela planta em resposta à infecção do patógeno (Heath, 1998).

Foram identificados também três singletons, HEVA-03-001-F10, HEVA-02-042-H05 e HEVA-01-19-H03, que codificam proteínas com similaridade a proteínas dissulfeto isomerase. As famílias de proteínas dissulfeto isomerase estão envolvidas com o mecanismo oxidativo de enovelamento de proteínas e desempenham um papel importante na formação de ligações dissulfídicas (Sato & Inaba, 2012). Essas enzimas podem estar relacionadas com a formação e a manutenção das ligações dissulfídicas intramoleculares das proteínas ricas em resíduos de cisteínas, que são secretadas pelo fungo durante as etapas iniciais de infecção.

A maioria (50%) das proteínas secretadas anotadas apresenta similaridade com proteínas de função desconhecidas. Dessas proteínas constatou-se que a maioria (96%) possui similaridade com proteínas de fungos causadores de ferrugem. As proteínas sem similaridade com sequências protéicas depositadas no genbank (No hits) podem ser proteínas específicas de *H. vastatrix* e foram consideradas efetores putativos do fungo HvECs, pois uma característica importante das proteínas efetoras

é que suas sequências não apresentam similaridade com sequências de espécies relacionadas (Ellis et al., 2009).

Trinta e cinco proteínas HvECs são codificadas por ORFs completas e foram analisadas mais detalhadamente. Dezessete genes HvECs codificam proteínas contendo 4 ou mais resíduos de cisteína. Esses resíduos de cisteínas podem auxiliar na estabilidade da proteína efetora no meio extracelular pela formação de pontes dissulfídicas intramoleculares (Templeton et al. 1995; Rep 2005). Por exemplo, pontes dissulfeto são importantes para a estabilidade e atividade das proteínas de avirulência Avr4 e Avr9 de *Cladosporium fuvum*, agente causal da cladosporiose em tomateiro (Stergiopoulos et al. 2009). Motivos ricos em cisteínas foram identificados em abundância no secretoma de *M. larici-populina* e *P. graminis* f. sp. *tritici*, o que evidencia que esses motivos são características importantes para os efetores desses fungos biotróficos (Duplessis et al. 2011; Saunders et al. 2012). A anotação no banco de dados de domínio Pfam mostrou que nenhuma função pode ser atribuída para as 35 HvECs. Comparando suas sequências nucleotídicas com o banco de dados de cDNA de Fernandez et al. (2012), gerado a partir de folhas de café infectadas com *H. vastatrix*, constatou-se que 28 HvECs (80%) representam novas sequências que codificam proteínas expressas durante a germinação de *H. vastatrix*. Este fato demonstra que a estratégia adotada foi eficiente para identificar novos genes candidatos a efetores do fungo.

O sistema armadilha de secreção em levedura YST foi utilizado para confirmação biológica da predição do peptídeo sinal realizada por ferramentas de bioinformática dos HvECs. O algoritmo SignalP utiliza o valor de probabilidade (D-score) para fazer a predição da presença e localização do sítio de clivagem do peptídeo sinal. Valores D-score > 0,5 são considerados predições positivas para presença peptídeo sinal (Petersen et al., 2011). No entanto, como todas as ferramentas baseadas em predições, há uma taxa de erro inerente e é possível a ocorrência de falsos positivos e negativos (Torto et al., 2003). Desta forma, a análise da secreção no sistema YST fornece complemento importante para as análises de bioinformática por validar ou refutar funcionalmente as predições. Os valores de probabilidade da região atribuída ao peptídeo sinal (D-score) dos oito HvECs cuja secreção foi confirmada *in vitro* variou de 0,699 (HvEC-027) a 0,886 (HvEC-025) (Tabela 2). Dos 27 HvECs que ainda não foram analisados pelo sistema YST, 23

HvECs apresentaram valores de D-score > de 0,699 (Tabela 2), indicando que a secreção dessas proteínas também poderá ser comprovada pelo sistema YST.

Os níveis de expressão relativa de oito HvECs que codificam proteínas, cuja secreção foi confirmada em levedura, foram menores em urediniósporos dormentes e germinados do que em tecido infectado. Além disso, sucessivos picos de expressão foram constatados durante a interação de *H. vastatrix* com o cafeeiro. O gene HvEC-025 apresentou maior nível de expressão em 24 hai, enquanto os genes HvEC-042 e HvEC-041 tiveram maiores níveis de expressão em 48 e 72 hai, respectivamente (Fig. 6A,B,C). Os genes HvEC-027, HvEC-030, HvEC-034 e HvEC-035 apresentaram maior nível de expressão entre 24 e 72 hai (Fig.6E). Os níveis de expressão dos genes analisados, exceto o gene HvEC-045, foram menores nos estágios adiantados do parasitismo, o que demonstra o papel importante desses genes durante a penetração e/ou na fase inicial da colonização dos tecidos do cafeeiro.

Em estudos histológicos de interações compatíveis no sistema Hemileia-cafeeiro constatou-se que em 24 hai os estágios de desenvolvimento do fungo mais frequentes identificados nos sítios de infecção são apressório, hifa de penetração e haustórios primários (Ganesh et al., 2006; Ramiro et al., 2009; Vieira et al., 2012), e que nos tempos de 48 e 72 hai são observadas células-mãe do haustório com haustórios na maioria dos sítios de infecção (Ganesh et al., 2006; Vieira et al., 2012). Estas mudanças morfológicas durante o processo de infecção podem ser correlacionadas com a dinâmica do perfil de expressão dos genes caracterizados neste estudo. Apesar da resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem ocorrer geralmente após o desenvolvimento dos haustórios no mesófilo foliar (Ramiro et al., 2009), a reação de hipersensibilidade (HR) já foi observada nas células dos estômatos de cafeeiros durante interações incompatíveis, indicando que o contato do fungo com as células-guarda e adjacentes dos estômatos é suficiente para induzir HR (Silva et al., 2002 ; Diniz et al., 2012). Como nessas células são produzidos os haustórios primários, é possível que algumas proteínas efetoras secretadas pelos esporos germinados e com maior nível de expressão nas etapas iniciais da patogênese sejam secretadas por esses haustórios, com a finalidade de suprimir a maquinaria de defesa celular das células-guardas do estômato, contribuindo para a penetração e estabelecimento do patógeno no mesófilo foliar. Em interações incompatíveis, essas proteínas poderiam ser reconhecidas como proteínas Avr. Estudos de

imunolocalização e de expressão transiente in planta poderão confirmar ou refutar essas possibilidades.

A caracterização da estrutura genômica de 23 HvECs confirmou que as ORFs preditas computacionalmente são verdadeiras, descartando a possibilidade de terem sido geradas como artefatos das análises de bioinformática. A maioria dos íntrons identificados (86%) apresentou sítio de splicing canônicos do tipo GT-AG na junção éxon-íntron. Apenas cinco (11%) íntrons foram encontrados com sítios de splicing não canônicos. Porém, este estudo pode ter superestimado a porcentagem de sítio de splicing não canônico devido à pequena quantidade de genes analisados. Também não se pode descartar a possibilidade de esses sítios de splicing não canônicos terem sido gerados por erro de sequenciamento. Sítios de splicing não canônicos ocorrem numa frequência de 1,7% em *Arabidopsis* (Zhu et al., 2003) e 1% em mamíferos (Bursat et al., 2000). Os dois fragmentos genômicos amplificados para o gene HvEC-035 podem representar genes parálogos ou diferentes alelos do mesmo loco, resultado este passível de ocorrência em razão da natureza dicariótica de *H. vastatrix*. A presença de íntrons em genes efetores pode ser benéfica devido às suas associações com elementos regulatórios e com mecanismo de splicing alternativo, que permite que uma única sequência de DNA codifique para mais de uma proteína funcional (Federova & Fedorov, 2003).

Com a identificação dos genes que codificam prováveis efetores expressos nas etapas iniciais da patogênese, o grande desafio agora é demonstrar a sua função biológica. Porém, estudos funcionais em *H. vastatrix* são difíceis de ser realizados, por vários motivos. Em primeiro lugar, esse fungo não possui o ciclo de vida completo (Fernandes et al. 2009), o que dificulta estudos genéticos de associação para estabelecer a ligação gênica entre candidatos a efetores e genes Avr. Em segundo lugar, a falta de um sistema de transformação estável dificulta a manipulação genética requerida para análise molecular da patogenicidade e virulência desse fungo por meio da geração de mutantes ou transformantes. Além disso, por se tratar de um parasita obrigatório, tanto a transformação quanto a seleção dos transformantes devem ser efetuadas in vivo, no próprio cafeeiro. Em terceiro lugar, estudos com base na inativação gênica são dificultados pela natureza dicariótica predominante no ciclo de vida do fungo.

Para contornar essas dificuldades é fundamental a realização de estudos de imunolocalização dessas proteínas efetoras nas estruturas fúngicas produzidas

durante o processo de patogênese, por meio de técnicas de imunolocalização e microscopia confocal. Adicionalmente, uma alternativa para a identificação de proteínas efetoras com características de proteínas de avirulência seria a translocação de efetores putativos para dentro das células de cafeeiros, portadores de genes de resistência à ferrugem, mediada pelo vetor pEDV e pelo Sistema de Secreção Tipo III de *Pseudomonas syringae*. Esta abordagem, denominada sistema pEDV (Effector Delivery Vector), foi usado com bastante sucesso na caracterização funcional de proteínas efetoras do oomiceto *Hyaloperonospora parasitica* (Sohn et al., 2007). Corrobora essa possibilidade o fato de o cafeeiro ser suscetível a *P. s. pv. garcae* (Oliveira et al., 1991; Kairu et al., 1997). A aplicação dessa abordagem pode representar um avanço no contexto da caracterização funcional de efetores de *H. vastatrix*, visando a identificação de genes de avirulência do patógeno e entendimentos dos mecanismos geradores de novas raças fisiológicas, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para obtenção de resistência durável à ferrugem do cafeeiro.

5-REFERÊNCIAS

- As-sadi F, Carrere S, Gascuel Q, Hourlier T, Rengel D, Le Paslier MC, Bordat A, Boniface MC, Brunel D, Gouzy J, Godiard L, Vincourt P. 2011. Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. **BMC Genomics** 12:498.
- Bilgin DD, DeLucia EH, Clough SJ. 2009. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. **Nature Protocols** 4(3): 333-340.
- Bittner-Eddy PD, Allen RL, Rehmany AP, Birch P, Beynon JL. 2003. Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology** 4(6): 501-507.
- Bowen JK, Mesarich CH, Rees-George J, Cui W, Fitzgerald A, Win J, Plummer KM, Templeton MD. 2009. Candidate effector gene identification in the ascomycete fungal phytopathogen *Venturia inaequalis* by expressed sequence tag analysis. **Molecular Plant Pathology** 10(3): 431-448.
- Braun EJ, Howard RJ. 1994. Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. **Protoplasma** 181: 202-212.
- Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV. 2000. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. **Nucleic Acids Research** 28(21): 4364-4375.
- Cabral A, Stassen JHM, Seidl MF, Bautor J, Parker JE, Van den Ackerveken G. 2011. Identification of *Hyaloperonospora arabidopsidis* transcript sequences expressed during infection reveals isolate-specific effectors. **PLoS One** 6(5): e19328.
- Cabral PGC, Zambolim EM, Zambolim L, Lelis TP, Capucho AS, Caixeta E. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Note** 4: 129-130.
- Capucho AS, Zambolim EM, Freitas RL, Haddad F, Caixeta ET, Zambolim L. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease Note** 7: 189-191.
- Carlile AJ, Bindschedler LV, Bailey AM, Bowyer P, Clarkson JM, Cooper RM. 2000. Characterization of SNP1, a cell wall-degrading trypsin, produced during infection by *Stagonospora nodorum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13(5): 538-550.

- Catanzariti AM, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **Plant Cell** 18(1): 243-256.
- Coutinho TA, Rijkenberg FHJ, Van Asch MAJ. 1993. Appressorium formation by *Hemileia vastatrix*. **Mycological Research** 97(8): 951-956.
- Cramer RA, LA Rota CM, Cho Y, Thon M, Craven KD, Knudson DL, Mitchell TK, Lawrence CB. 2006. Bioinformatic analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Alternaria brassicicola*-*Brassica oleracea* interaction. **Molecular Plant Pathology** 7(2): 113-124.
- Deising H, Nicholson RL, Haug M, Howard RJ, Mendgen K. 1992. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. **Plant Cell** 4(9): 1101-1111.
- Di Pietro A, Huertas-Gonzalez MD, Gutierrez-Corona JF, Martinez-Cadena G, Meglec E, Roncero MIG. 2001. Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 14(5): 653-662.
- Diniz I, Talhinhos P, Azinheira HG, Varzea V, Medeira C, Maia I, Petitot AS, Nicole M, Fernandez D, Silva MD. 2012. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. **European Journal of Plant Pathology** 133(1): 141-157.
- Dow JM, Davies HA, Daniels MJ. 1998. A metalloprotease from *Xanthomonas campestris* that specifically degrades proline/hydroxyproline-rich glycoproteins of the plant extracellular matrix. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 11: 1085-1093.
- Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel BL, Chiu R, Coutinho PM, Feau N, Field M, Frey P, Gelhaye E, Goldberg J, Grabherr MG, Kodira CD, Kohler A, Kues U, Lindquist EA, Lucas SM, Mago R, Mauceli E, Morin E, Murat C, Pangilinan JL, Park R, Pearson M, Quesneville H, Rouhier N, Sakthikumar S, Salamov AA, Schmutz J, Selles B, Shapiro H, Tanguay P, Tuskan GA, Henrissat B, Van de Peer Y, Rouze P, Ellis JG, Dodds PN, Schein JE, Zhong SB, Hamelin RC, Grigoriev IV, Szabo LJ, Martin F. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108(22): 9166-9171.
- El Gueddari NE, Rauchhaus U, Moerschbacher BM, Deising HB. 2002. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. **New Phytologist** 156: 103-112.

- Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ. 2007. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. **Annual Review of Phytopathology** 45: 289-306.
- Ellis JG, Rafiqi M, Gan P, Chakrabarti A, Dodds PN. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. **Current Opinion in Plant Biology** 12(4): 399-405.
- Federova L, Fedorov A. 2003. Introns in gene evolution. **Genetica** 118: 123-131.
- Fernandes RC, Evans HC, Barreto RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. **Tropical Plant Pathology** 34 (2): 108-113.
- Fernandez D, Tisserant E, Talhinhos P, Azinheira H, Vieira A, Petitot AS, Loureiro A, Poulain J, Da Silva C, Silva MDC, Duplessis S. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology** 13(1): 17-37.
- Ganesh D, Petitot AS, Silva MC, Alary R, Lecouls AC, Fernandes D. 2006. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science** 170: 1045-1051.
- Gietz RD, Woods RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods Enzymology** 350: 87-96.
- Heath MC. 1998. Involvement of reactive oxygen species in the response of resistant (hypersensitive) or susceptible cowpeas to the cowpea rust fungus. **New Phytologist** 138(2): 251-263.
- Kairu GM. 1997. Biochemical and pathogenic differences between Kenyan and Brazilian isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Plant Pathology** 46: 239-246.
- Kamper J, Kahmann R, Bolker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Muller O, Perlin MH, Wosten HA, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Snetselaar K, McCann M, Perez-Martin J, Feldbrugge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, Gonzalez-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho EC, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Hauser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Guldener U, Munsterkotter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW,

- DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature** 444(7115): 97-101.
- Kolattukudy PE. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 92: 4080–4087.
- Lee SJ, Kelley BS, Damasceno CMB, John BS, Kim BS, Kim BD, Rose JKC. 2006. A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 19(12): 1368-1377.
- Livak KJ, Thomas DS. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods** 25: 402–408.
- Maia TA, Zambolim EM, Caixeta ET, Mizubuti ESG, Zambolim L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathology** no prelo.
- Mestre P, Piron MC, Merdinoglu D. 2012. Identification of effector genes from the phytopathogenic Oomycete *Plasmopara viticola* through the analysis of gene expression in germinated zoospores. **Fungal Biology** 116(7): 825-835.
- Mosquera G, Giraldo MC, Khang CH, Coughlan S, Valent B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. **Plant Cell** 21(4): 1273-1290.
- Nirmala J, Drader T, Chen X, Steffenson B, Kleinhofs A. 2010. Stem rust spores elicit rapid RPG1 phosphorylation. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 23(12): 1635-1642.
- Nirmala J, Drader T, Lawrence PK, Yin CT, Hulbert S, Steber CM, Steffenson BJ, Szabo LJ, von Wettstein D, Kleinhofs A. 2011. Concerted action of two avirulent spore effectors activates reaction to *Puccinia graminis* 1 (Rpg1)-mediated cereal stem rust resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108(35): 14676-14681.
- Nunes CC, Maffia LA, Mizubuti ESG, Brommonschenkel SH, Silva JC. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology** 38: 445-452.
- Oliveira JR, Romeiro RS, Muchovej JJ. 1991. Population tendencies of *Pseudomonas cichorii* and *P. syringae* pv. *garcae* in young and mature coffee leaves. **Journal Phytopathology** 131: 210-214.

- Olivieri F, Eugenia Zanetti M, Oliva CR, Covarrubias AA, Casalongue CA. 2002. Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology** 108: 63-72.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods** 8(10): 785-786.
- Plummer KM, Clark SJ, Ellis LM, Loganathan A, Al-Samarrai TH, al. e. 2004. Analysis of a secreted aspartic peptidase disruption mutant of *Glomerella cingulata*. **European Journal of Plant Pathology** 110: 265–274.
- Posada-Buitrago ML, Frederick RD. 2005. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics Biology** 42(12): 949-962.
- Ramiro DA, Escoube J, Petitot AS, Nicole M, Maluf MP, Fernandez D. 2009. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology** 58: 944-955.
- Rep M. 2005. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. **FEMS Microbiology Letters** 253(1): 19-27.
- Rogers LM, Flaishman MA, Kolattukudy PE. 1994. Cutinase gene disruption in *Fusarium solanifsp.pisi* decreases its virulence on pea. **Plant Cell** 6(7): 935-945.
- Sato Y, Inaba K. 2012. Disulfide bond formation network in the three biological kingdoms, bacteria, fungi and mammals. **FEBS Journal** 279 (13): 2262–2271.
- Saunders DGO, Win J, Cano LM, Szabo LJ, Kamoun S, Raffaele S. 2012. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. **PloS One** 7(1).
- Silva MC, Nicole M, Guerra-Guimarães L, Rodrigues Jr CJ. 2002 Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistance coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60: 169-183.
- Silva MC, Várzea MPV, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandes D, Petitot AS, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal Plant Physiology** 18: 119-147.
- Sohn KH, Lei R, Nemri A, Jones JDG. 2007 The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 19: 4077-4090.

- Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, Burgis TA, Soanes DM, Stuber K, Ver Loren van Themaat E, Brown JK, Butcher SA, Gurr SJ, Lebrun MH, Ridout CJ, Schulze-Lefert P, Talbot NJ, Ahmadinejad N, Ametz C, Barton GR, Benjdia M, Bidzinski P, Bindschedler LV, Both M, Brewer MT, Cadle-Davidson L, Cadle-Davidson MM, Collemare J, Cramer R, Frenkel O, Godfrey D, Harriman J, Hoede C, King BC, Klages S, Kleemann J, Knoll D, Koti PS, Kreplak J, Lopez-Ruiz FJ, Lu X, Maekawa T, Mahanil S, Micali C, Milgroom MG, Montana G, Noir S, O'Connell RJ, Oberhaensli S, Parlange F, Pedersen C, Quesneville H, Reinhardt R, Rott M, Sacristan S, Schmidt SM, Schon M, Skamnioti P, Sommer H, Stephens A, Takahara H, Thordal-Christensen H, Vigouroux M, Wessling R, Wicker T, Panstruga R. 2010. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. **Science** 330(6010): 1543-1546.
- Sreedhar L, Kobayashi DY, Bunting TE, Hillman BI, Belanger FC. 1999. Fungal proteinase expression in the interaction of the plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host. **Gene** 235(1-2): 121-129.
- Stergiopoulos I, de Wit PJ. 2009. Fungal effector proteins. **Annual Review of Phytopathology** 47: 233-263.
- Stone CL, McMahon MB, Fortis LL, Nunez A, Smythers GW, Luster DG, Frederick RD. 2012. Gene expression and proteomic analysis of the formation of *Phakopsora pachyrhizi* appressoria. **BMC Genomics** 13: 269.
- Templeton MD, Rikkerink EHA, Beever R. 1994. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 7: 320-325.
- Thon MR, Nuckles EM, Takach JE, Vaillancourt LJ. 2002. CPR1: a gene encoding a putative signal peptidase that functions in pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* to maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 15:120-128.
- Torto-Alalibo TA, Tripathy S, Smith BM, Arredondo FD, Zhou L, Li H, Chibucos MC, Qutob D, Gijzen M, Mao C, Sobral BW, Waugh ME, Mitchell TK, Dean RA, Tyler BM. 2007. Expressed sequence tags from *Phytophthora sojae* reveal genes specific to development and infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 20: 781-793.
- Torto TA, Li S, Styer A, Huitema E, Testa A, Gow NA, van West P, Kamoun S. 2003. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. **Genome Research** 13(7): 1675-1685.
- Várzea MPV, Marques DV 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea MPV eds. Durable Resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 53-74.

- Vieira A, Talhinhos P, Loureiro A, Duplessis S, Fernandez D, Silva M. C, Paulo O. S, Azinheira H. G. 2011. Validation of RT-qPCR reference genes for in planta expression studies in *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust. **Fungal Biology** 115:891-901.
- Vieira A, Talhinhos P, Loureiro A, Thürich J, Duplessis S, Fernandez D, Silva MC, Paulo OS, Azinheira HG. 2012. Expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. **European Journal of Plant Pathology** 133: 261-277.
- Voigt CA, Schafer W, Salomon S. 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. **Plant Journal** 42(3): 364-375.
- Zambolim L, Zambolim EM, Vale FXR, Pereira AA, Sakyama NS, Caixeta ET 2005. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil - Physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim L, M. ZE, Várzea MPV eds. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa - UFV pp. 75-98.
- Zhang YH, Qu ZP, Zheng WM, Liu B, Wang XJ, Xue XD, Xu LS, Huang LL, Han QM, Zhao J, Kang ZS. 2008. Stage-specific gene expression during urediniospore germination in *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. **BMC Genomics** 9: 203.
- Zhu W, Schlueter SD, Brendel V. 2003. Refined annotation of the *Arabidopsis* genome by complete expressed sequence tag mapping. **Plant Physiology** 132 (2): 469-484.

**CAPÍTULO 2- IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FUNCIONAL DE EFETORES
DE *Hemileia vastatrix* EXPRESSOS DURANTE A FASE BIOTRÓFICA DA
INTERAÇÃO**

RESUMO

Durante a patogênese os fungos causadores de ferrugens secretam um arsenal de proteínas efetoras nas diferentes fases do parasitismo, para promover uma infecção bem-sucedida. Este estudo teve por objetivos a identificação e caracterização de efetores de *H. vastatrix*, secretados durante a interação compatível com o cafeeiro, o estabelecimento de um protocolo de expressão transiente das proteínas codificadas por esses efetores em folhas de cafeeiro. Efetuou-se o sequenciamento massivo de um substancial número de cDNAs sintetizados a partir de RNAs extraídos de folhas de cafeeiro infectadas com *H. vastatrix* (raça II), em diferentes tempos, durante a fase biotrófica da interação: 48 horas, 72 horas, 9 dias e 12 dias após a inoculação. Análises de bioinformática foram realizadas com a finalidade de identificar efetores putativos de *H. vastatrix* com base em características comuns às proteínas efetoras de fungos filamentosos. Com base nessas análises, foram selecionadas 75 ORFs completas representadas por contíguos constituídos por grande número de reads e/ou que codificam proteínas ricas em cisteínas. Desses, 62 genes candidatos a efetores tiveram sua origem fúngica confirmada, e pelas análises de RT-PCR constatou-se que 23 genes são preferencialmente expressos durante a interação com o cafeeiro. A análise de expressão mais detalhada desses 23 genes foi realizada por qRT-PCR, e constatou-se que 22 genes são regulados positivamente durante a interação com o cafeeiro, os quais apresentaram padrões distintos de expressão, indicando atividade de transcrição altamente dinâmica durante a fase biotrófica de *H. vastatrix*. Adicionalmente, estabeleceu-se um protocolo de translocação de efetores putativos de *H. vastatrix* com base no vetor pEDV e no Sistema de Secreção Tipo III de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. A expressão transiente do efector candidato HvEC-016 no citoplasma de cafeeiros resistentes à ferrugem, portadores do gene S_{H1} , desencadeou resposta de defesa nas plantas, o que demonstra que pode ter ocorrido o reconhecimento da proteína efectora HvEC-016 pela proteína R codificada pelo gene S_{H1} . O catálogo de efetores putativos de *H. vastatrix* expressos na interação com o cafeeiro identificados nesse estudo, e também a demonstração do potencial do sistema pEDV para estudos funcionais de efetores de *H. vastatrix*, fornecem excelentes perspectivas para a identificação de genes de avirulência de *H. vastatrix*.

ABSTRACT

During pathogenesis, rust fungi secrete an arsenal of effector deployed during the different stages of parasitism in order to promote a successful infection. The aim of this study was to identify and functionally characterize *H. vastatrix* effectors secreted during a compatible plant-rust interaction. For this purpose, it was performed a massive sequencing of a substantial number of cDNAs synthesized from RNAs extracted from coffee leaves infected with *H. vastatrix* (race II) at four different times during the biotrophic interaction: 48 hours, 72 hours, 9 days and 12 days after inoculation. Bioinformatics analyzes were conducted in order to identify putative *H. vastatrix* effectors based on common features found in effector proteins from filamentous fungi. Seventy five complete ORFs formed by contigs consisting of large number of reads and /or encoding proteins rich in cysteine were selected for further analysis. The fungal origin of 62 of these candidates was confirmed by RT-PCR, which also demonstrated that 23 genes are preferentially expressed during the interaction with the coffee plant. A more detailed analysis of the expression of these 23 genes conducted using qRT-PCR showed that 22 genes are positively regulated in planta displaying distinct patterns of expression indicating a highly dynamic transcriptional activity of effectors during the biotrophic stage of *H. vastatrix*. In addition, a protocol for translocation of putative effectors from *H. vastatrix* was established based on the pEDV vector and the Type Three Secretion System of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Transient expression of the effector candidate HvEC-016 in the cytoplasm of coffee plants expressing the rust resistant gene S_{H1} , triggered a defense response that may have occurred upon recognition of the effector protein HvEC-016 by the R protein encoded by S_{H1} . The catalog of effector gene candidates for *H. vastatrix* expressed during the interaction with the coffee plant and the transient assay established in this study is an important platform to identify additional avirulence genes from *Hemileia vastatrix*.

1-INTRODUÇÃO

A ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* é a principal doença do cafeeiro, e seu controle pode ser eficientemente realizado pela aplicação de fungicidas protetores e sistêmicos (Zambolim et al., 2005). Apesar da eficácia dos fungicidas, o desenvolvimento de cultivares com resistência genética é economicamente a melhor alternativa para o controle da doença, por ser uma tecnologia incluída na semente, sem custos adicionais para o produtor, de fácil utilização e sem possíveis impactos ambientais. No entanto, a resistência de cafeeiros melhorados tem sido suplantada pelo patógeno, em curto espaço de tempo, o que tem dificultado o controle da doença por meios puramente genéticos (Várzea & Marques, 2005).

A curta vida útil das cultivares resistentes à ferrugem tem sido atribuída ao alto potencial evolutivo de populações de *H. vastatrix* (Nunes et al., 2009; Maia et al., 2013), que confere ao patógeno capacidade de suplantar os genes de resistência introgrididos nas cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento (McDonald & Linde, 2002). Até o momento, 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram identificadas (Várzea & Marques, 2005), e 15 destas foram relatadas no Brasil (Zambolim et al., 2005; Cabral et al., 2009; Capucho et al., 2012). Essa diversidade é gerada por mutação (Rodrigues, 1990), responsável por criar novos alelos na população do patógeno, e amplificada durante a recombinação dos alelos de locos diferentes que pode ocorrer cripticamente nos urediniósporos do patógeno (Carvalho et al., 2011).

H. vastatrix apresenta padrão morfológico particular nos estágios iniciais de infecção. Após a formação do apressório sobre o estômato ocorre a formação da hifa de infecção, que se diferencia na célula-mãe do haustório. Em seguida, os haustórios são formados nas células subsidiárias ou adjacentes do estômato, antes mesmo da colonização do mesófilo. Esses haustórios precocemente produzidos na fase de penetração foram denominados de haustórios primários, diferenciando daqueles que são produzidos no mesófilo, que foram chamados de haustórios secundários (Ramiro et al., 2009). Embora o processo infeccioso de *H. vastatrix* seja bem compreendido durante a interação com o cafeeiro em termos histológicos (Matsuoka & Vanetti, 1993; Silva et al., 2002 ; Ganesh et al., 2006; Silva et al., 2008; Vieira et al., 2012;

Ramiro et al., 2009), estudos sobre a biologia dos fatores de patogenicidade e virulência do patógeno ainda são escassos.

Fungos filamentosos e oomicetos secretam diversas proteínas efetoras durante o processo de patogênese, para suplantar as respostas de defesa da planta e promover o parasitismo (Dodds et al., 2009; Panstruga & Dodds, 2009). O aumento no número de genomas e transcriptomas de fungos sequenciados proporciona um cenário favorável para identificação de proteínas secretadas por meio de ferramentas de bioinformática (Brown et al., 2012; Fernandez et al., 2012; Kleemann et al., 2012; Saunders et al., 2012). As proteínas secretadas expressas durante a interação com o hospedeiro (in planta) são consideradas candidatas a efetores, e há grande número de pesquisas sendo realizadas para definir seus papéis biológicos (Ellis et al., 2009; Rafiqi et al., 2012).

Algumas proteínas efetoras podem ser reconhecidas por proteínas da planta codificadas por genes de resistência (R), sendo, neste caso, tradicionalmente conhecidas como proteínas de avirulência, e os genes correspondentes genes Avr (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010). De acordo com a teoria gene-a-gene proposta por Flor (1971), com base em estudos genéticos do patossistema *Melampsora lini*-linho, para cada gene Avr no patógeno há um gene R correspondente no hospedeiro. A interação direta ou indireta entre os produtos desses dois genes leva à imunidade desencadeada por efetores (ETI – Effectors Triggered Immunity), caracterizada pela ocorrência da resposta de hipersensibilidade (HR)(Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010).

Estudos realizados no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, têm mostrado que a teoria gene-a-gene também se aplica à interação *Hemileia-Coffea* (Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967), onde a resistência à ferrugem é condicionada por pelo menos nove genes dominantes (S_H1 - S_H9), sozinhos ou associados (Rodrigues & Bettencourt, 1975; Bettencourt & Rodrigues, 1988). Assim, pode-se inferir a existência de pelo menos nove genes de avirulência em *H. vastatrix*. Todavia, apesar de muitos anos de pesquisa nesse patossistema ainda não se identificou proteínas efetoras com atividade de avirulência em *H. vastatrix*.

Recentemente, o transcriptoma da interação *Hemileia*-cafeeiro, expresso na fase de esporulação (21 dias após a inoculação), foi parcialmente caracterizado por Fernandez et al. (2012). Como os genes que codificam proteínas efetoras em fungos

filamentosos são expressos em ondas sequenciais que acompanham as diferentes fases do parasitismo (Hacquard et al., 2012; Kleemann et al., 2012; Win et al., 2012), a caracterização do secretoma expresso em diferentes tempos após a inoculação é indispensável para identificar o repertório completo de genes efetores de *H. vastatrix*. De modo geral, a resistência do cafeeiro à ferrugem ocorre após a formação dos haustórios secundários no mesófilo, a qual é fenotipicamente caracterizada pela indução de HR (Silva et al., 2002 ; Silva et al., 2008; Ramiro et al., 2009). Assim, é possível que proteínas efetoras produzidas no haustório e translocadas para o citoplasma do cafeeiro sejam reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes S_H . Dessa forma, a expressão transiente de proteínas secretadas de *H. vastatrix* no citoplasma de cafeeiros portadores de genes S_H pode ser utilizada como estratégia para identificar efetores com atividade de avirulência.

Como a técnica de expressão transiente via agroinfiltração é dificultada pelo fato de o tecido foliar do cafeeiro ser resistente a *Agrobacterium tumefaciens* (van Boxtel et al., 1995), um protocolo de expressão transiente em folhas de cafeeiro pode ser desenvolvido pela translocação de proteínas de *H. vastatrix*, com base no Sistema de Secreção Tipo III (SST3) de fitobactérias. Essa abordagem, denominada sistema pEDV (Effector Delivery Vector), foi utilizada com bastante sucesso na caracterização funcional de efetores do oomiceto *Hyaloperonospora parasitica* (Sohn et al., 2007; Fabro et al., 2011). Pelo fato do cafeeiro ser suscetível a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal da mancha aureolada do cafeeiro, o sistema pEDV pode ser uma ferramenta promissora para análise funcional de efetores em *H. vastatrix*.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar o secretoma de *H. vastatrix* expresso durante uma interação compatível com o cafeeiro, visando identificar genes candidatos a efetores diferencialmente expressos durante a fase biotrófica do fungo. Adicionalmente, analisou-se o potencial do sistema pEDV para translocação de efetores putativos do fungo via SST3 de *P. s. pv. garcae* em genótipos de cafeeiros portadores de genes S_H .

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Inoculação de *H. vastatrix*

Para as inoculações utilizou-se um isolado monopustular de *H. vastatrix* da raça II (isolado Hv-01). A inoculação foi realizada com auxílio de um pincel, depositando-se os urediniósporos do fungo nas faces abaxiais de folhas jovens e completamente desenvolvidas de mudas do cultivar Catuaí Vermelho IAC 44. Em seguida, aspergiu-se água destilada sobre as folhas, até atingir um leve molhamento superficial. As plantas foram transferidas para câmara de nevoeiro a 22°C, na ausência de luz, por 48 horas. Após este período, os urediniósporos que permaneceram na face abaxial das folhas foram removidos com algodão, para evitar a colonização de fungos hiperparasitas. As plantas foram levadas para câmara de crescimento a 22°C e fotoperíodo de 12 horas.

2.2-Construção da biblioteca de cDNA, sequenciamento Sanger e análise das sequências

O protocolo-padrão desenvolvido por Bilgin et al., (2009) foi usado para extração de RNA total de folhas de “Catuaí” infectadas com o isolado Hv-01, 12 dias após a inoculação. Purificou-se o mRNA conforme instruções do NucleoTrap[®] mRNA Midi Kit (Macherey-Nagel). A biblioteca de cDNA unidirecional foi construída conforme instruções do kit Creator[™] SMART[™] cDNA library construction kit (Clontech), a partir de 0,5 µg de RNA poliadenilado. Os cDNAs resultantes foram clonados no vetor pDNR-LIB (Clontech) e transformados em *Escherichia coli* EC-100 (Epicentre), por eletroporação, e os clones recombinantes selecionados em meio LB contendo cloranfenicol (30 µg/ml).

A extração do DNA plasmidial foi realizada repicando-se as colônias para placas de microcultura contendo 1 ml de meio Circle Grow acrescido de 30 µg/ml de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas, a 280 rpm. Após esse período, elas foram centrifugadas a 2.500 rpm, por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 240 µl de solução G.E.T. pH 7,4 (EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris-HCl 1 M, Glicose 20%) e centrifugadas a 3.000 rpm, por

7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 80 µl de solução G.E.T. contendo RNase (150 mg/ml) e agitadas por 2 minutos. Uma alíquota de 60 µl da suspensão de células foi transferida para placas de polipropileno de fundo redondo e, em seguida, foram adicionados a cada poço 80 µl de NaOH 0,2 N e SDS 1% (1:1). As placas foram seladas, invertidas quatro a seis vezes e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Então, as placas foram centrifugadas a 3.700 rpm, por 2 minutos, fez-se a adição de 80 µl de KOAc 3 M pH 4,8, homogeneizou-se por inversão e incubou-se no gelo por 10 minutos. Após este procedimento, as placas foram incubadas em estufa a 90°C por 30 minutos, colocadas novamente no gelo por 10 minutos e centrifugadas a 3.700 rpm, por 9 minutos. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante foi filtrada em uma placa Millipore (MAGV N22), por meio de centrifugação (3.000 rpm, por 6 minutos). Por fim, foram adicionados 100 µl de isopropanol, homogeneizados por inversão e centrifugados a 3.700 rpm, por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com etanol 70%, centrifugado a 3.700 rpm, por 5 minutos, e ressuspendido em água milli-Q. A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, seguida de coloração com brometo de etídeo.

As reações de sequenciamento de 12.288 clones foram realizadas por passagem única, usando o iniciador universal M13F, com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare). As reações foram analisadas no sequenciador automático MegaBACE™ 1000 de 96 capilares (GE Healthcare), no Laboratório de Genômica/BIOAGRO/UFV.

A qualidade das seqüências foi verificada por meio do pacote phred/phrap/consed (www.phrap.org). Após a remoção de seqüências do vetor pelo programa Cross_match (www.phrap.org), as seqüências obtidas foram alinhadas pelo programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). As unisequências formadas (contíguos e singletos) foram inicialmente comparadas com 254.546 ESTs de *Coffea* spp., depositadas no GenBank, por meio do algoritmo BLASTN. As seqüências que não apresentaram similaridade significativa ($E_{\text{value}} > 10^{-3}$) com ESTs de *Coffea* spp. foram submetidas à predição de seqüências abertas de leitura (ORFs), por meio de um script Perl, nas três possíveis fases de leitura positivas.

2.3-Construção da biblioteca de cDNA normalizada, pirosequenciamento e análise das sequências

As inoculações foram realizadas nas mesmas condições descritas no item 2.1. Amostras de RNA total foram extraídas, conforme item 2.2., de três réplicas biológicas de folhas de “Catuai” infectadas com *H. vastatrix* (isolado Hv-01), nos tempos 48 horas, 72 horas e 9 dias após a inoculação. Quantidades equimolares das amostras de RNA foram precipitadas e enviadas para preparação de uma biblioteca normalizada de cDNA e pirosequenciamento pela plataforma de alto desempenho 454 GS-FLX (Roche) na empresa Eurofins MWG (Huntsville, EUA). As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa MIRA-assembler v3.4 (<http://mira-assembler.sourceforge.net/>), e os contíguos dessa biblioteca foram avaliados quanto à origem vegetal ou fúngica, conforme descrito no item 2.1. As sequências que não apresentaram similaridade significativa ($E_{\text{value}} > 10^{-3}$) com ESTs de *Coffea* spp. foram submetidas à predição de sequências abertas de leitura (ORFs), por meio de um script Perl, nas seis possíveis fases de leitura. Os singletos não foram incluídos nas análises.

2.4-Análise de predição do secretoma e anotação

As sequências peptídicas deduzidas das ORFs preditas para cada biblioteca (454 e Sanger) foram submetidas, separadamente, a um pipeline para identificação de proteínas secretadas sem domínio transmembrana. Inicialmente, as sequências proteicas foram analisadas nos programas SignalP v.4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e TargetP v.1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), para predição de peptídeo sinal e exclusão de proteínas com predição de localização mitocondrial, respectivamente. Por meio de um script implementado em Perl removeu-se o peptídeo sinal das proteínas preditas, e os peptídeos maduros foram submetidos ao programa TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), para identificação de proteínas com domínio transmembrana. Em seguida, o secretoma predito em cada biblioteca foi anotado com base na comparação de sequências de proteínas depositadas no

Genbank/NCBI, por meio do algoritmo BLASTP. Como este trabalho foi focado apenas em sequências novas, supostamente específicas de *H. vastatrix*, as proteínas secretadas das duas bibliotecas (454 e Sanger), que não apresentaram similaridade ($E_{\text{value}} > 10^{-3}$) com proteínas depositadas no Genbank, foram combinadas para formar um único banco de efetores putativos, denominado Secretoma No hit. A redundância de sequências no Secretoma No hit combinado foi corrigida por meio do alinhamento entre as proteínas, usando o algoritmo BLASTP. Para isto, sequências presentes nas duas bibliotecas com 100% de identidade foram reduzidas para uma no conjunto de dados final. As proteínas secretadas deduzidas das ORFs completas foram submetidas à predição de localização celular por meio do algoritmo WolfPSORT (<http://wolfpsort.org/>), e todas proteínas com predição de localização extracelular ou nuclear foram mantidas no conjunto de dados do secretoma. Para excluir sequências expressas na fase de germinação de *H. vastatrix*, foram eliminadas as sequências que apresentaram similaridade significativa (BLASTN, $E_{\text{value}} < 10^{-10}$) com sequências de uma biblioteca contendo 5.832 ESTs, obtida a partir de uredinióporos germinados (capítulo 1). O número de resíduos de cisteína das proteínas preditas sem peptídeo sinal foi computado com o uso de um script Perl. Para inferir possíveis domínios funcionais, as proteínas secretadas foram mapeadas no banco de dados Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Domínios com valores de $E_{\text{value}} > 10^{-5}$ foram ignorados (Saunders et al. 2012). Por fim, as ORFs completas dos genes candidatos a efetores foram comparadas, por meio do algoritmo BLASTN, com o banco de dados de cDNA obtido de folhas infectadas por *H. vastatrix*, 21 dias após a inoculação (Fernandez et al., 2012).

2.5-Seleção de genes candidatos a efetores e confirmação da origem fúngica dos genes selecionados por análise de RT-PCR

A extração de RNA total de uredinióporos dormentes, uredinióporos germinados, folhas de café não inoculadas e folhas de café inoculadas nos tempos 24 horas e 12 dias após inoculação foi realizada segundo Bilgin et al. (2009). Os RNAs foram tratados com DNase I RNase-free (Qiagen) e, em seguida, fez-se a purificação das amostras utilizando o RNeasy CleanUp kit (Qiagen). A concentração e a qualidade dos RNAs obtidos foram verificadas em NanoDropTM (Thermo Fisher

Scientific) e em gel desnaturante de agarose 1,2%, respectivamente. Dez microgramas de RNA total de cada amostra foram usados para a síntese de cDNA, utilizando o iniciador Oligo(dT)₁₂₋₁₈, conforme instruções do kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), para uma reação de volume final de 40 µL. A eficiência da síntese de cDNA foi avaliada por PCR, usando os oligonucleotídeos dos genes endógenos Ubiquitina e β-tubulina do cafeeiro e *H. vastatrix*, respectivamente. Cada reação de RT-PCR foi constituída de uma desnaturação a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguida da extensão final a 72°C por 5 minutos. Os amplicons foram analisados em gel de agarose 1,2% e apresentaram tamanho variando de 72 a 173 pb, com exceção do amplicon referente ao gene endógeno GADPH, que tem 280 pb. As sequências dos oligonucleotídeos específicos dos genes e o tamanho dos amplicons esperados estão listadas em Anexo 4.

2.6-Análise da expressão temporal dos genes selecionados por qRT-PCR

A extração do RNA e a síntese de cDNA foram realizadas conforme mencionado no item 2.4. Para quantificação da expressão gênica foi usado o método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Thomas, 2001), empregando-se o valor médio de Ct, resultante de três réplicas biológicas e duas réplicas técnicas em cada tempo amostrado: 24 horas, 48 horas, 72 horas, 9 dias e 15 dias após a inoculação. A expressão de cada gene-alvo foi normalizada pela média dos valores de Ct, obtidos pela expressão de três genes endógenos do fungo: GADPH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), CytIII (citocromo c oxidase subunidade III) e *βtub* (β-tubulina). Esses genes normalizadores já foram validados para análises de expressão de genes de *H. vastatrix* in planta (Vieira et al. 2011). As reações foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), programado para desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Cada reação foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo 40 ng de cDNA, 8 mM de cada iniciador e 12 µL de solução do kit SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A especificidade das reações foi avaliada por meio da curva de dissociação obtida com gradiente variando de 60 a 95°C, com a taxa de incremento de 1°C a cada 30 segundos.

2.7-Análise de expressão transiente dos candidatos a efetores em folhas de cafeeiro mediada pelo sistema pEDV e pelo Sistema de Secreção Tipo III de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

2.7.1-Genótipos de cafeeiro inoculados

As plantas utilizadas para o ensaio de infiltração pertencem à coleção de genótipos de cafeeiros diferenciadores de raças de *H. vastatrix*, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, os quais se diferenciam pela presença de diferentes genes de resistência à ferrugem. Os cafeeiros diferenciadores (clones de plantas originais) foram propagados vegetativamente por meio de enraizamento de estacas e/ou por enxertia utilizando o Catuaí Vermelho IAC-44 como porta-exerto. Após quatro meses de enviveiramento, quando as mudas apresentaram dois a três pares de folhas elas foram transferidas para a casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia/UFV. Os clones foram cultivados em vasos plásticos de 5 litros de capacidade, contendo substrato constituído de terra de camada subsuperficial e esterco de curral curtido, na proporção de 3:1, adubado com 1,5 Kg de NPK na formulação 4-14-8 por m³ de substrato. Foram efetuados tratamentos fitossanitários para controle de cochonilha, ácaro e pulgões e foi feita adubação com solução nutritiva para correção de deficiência de micronutrientes.

2.7.2-Estirpe de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

O isolado de *P. syngae* pv. *garcae*, estirpe 1725, foi obtido da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, São Paulo-SP.

2.7.3-Clonagem em pEDV e transformação de *P.s.* pv. *garcae*

Dez ORFs completas que codificam proteínas secretadas foram selecionadas para a análise funcional em genótipos de cafeeiro, utilizando a translocação mediada pelo SST3 de *P. s. garcae*: HvEC-002, HvEC-004A, HvEC-004B, HvEC-005, HvEC-006, HvEC-007, HvEC-008, HvEC-009, HvEC-016, HvEC-021.

A partir dessas sequências foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores sem a região que codifica para o peptídeo sinal, acrescentado do sítio CACC no iniciador Forward para clonagem pelo sistema Gateway[®] (Invitrogen). Os genes foram amplificados por PCR a partir dos clones originais da biblioteca CaHv-Sanger e, em seguida, clonados no vetor de entrada pENTTM/D-TOPO[®] (Invitrogen). Posteriormente, as sequências foram recombinadas no vetor de destino pEDV, seguindo-se as instruções do manual Gateway[®] LR ClonaseTM II Enzyme Mix (Invitrogen). O vetor pEDV codifica um peptídeo de 136 aminoácidos localizado na região N-terminal da proteína efetora AvrRps4, que sinaliza a secreção pelo SST3 (Sohn et al., 2007). Os clones resultantes pEDV-HvECs contém a sequência codificadora do peptídeo AvrRps4 fusionado às ORFs HvECs, que codificam candidatos efetores do fungo sem o peptídeo sinal. Efetuou-se o sequenciamento dos clones com os oligonucleotídeos M13F e M13R, para confirmação das clonagens das ORFs HvECs in frame com a sequência que codifica o peptídeo AvrRps4N. As construções pEDV-HvECs foram transferidas para *P. s. garcae* por eletroporação. As células transformadas foram selecionadas em meio seletivo contendo os antibióticos rifampicina (100 µg/mL) e gentamicina (25 µg/mL).

2.7.4-Análise funcional dos genes candidatos a efetores em genótipos de cafeeiros baseado no SST3 de *P. s. garcae*

As células de *P. s. garcae* transformadas com as construções pEDV-HvEC foram estriadas em placas de meio King B sólido contendo os antibióticos adequados e crescidas a 28°C por 24 horas. As células foram ressuspensas em solução salina de cloreto de magnésio (MgCl₂, a 10 mM) e centrifugadas a 5.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensado em 50 mL de solução salina. A concentração da suspensão de infiltração foi ajustada para 2 x 10⁸ ufc/mL e as infiltrações foram realizadas com o auxílio de seringas hipodérmicas em folhas de cafeeiros. Essa mesma suspensão foi infiltrada em tabaco para verificar se a expressão dos genes HvECs poderia interferir na funcionalidade do SST3 de *P. s. garcae*. Como controle negativo utilizou-se a bactéria transformada com o vetor vazio, construção pEDV-vazio.

2.7.5-Coleta de amostras para determinação do crescimento de populações de *P. s. garcae* in vivo

O crescimento da população de *P. s. garcae* contendo as construções pEDV-vazio e pEDV-HvEC16 foram avaliadas no limbo foliar do genótipo de cafeeiro Dilla & Algue, portador do gene de resistência S_H1 . O experimento foi realizado pelo método de diluição e contagem das colônias em placas, conforme descrito por Oliveira et al. (1991), com algumas modificações. As culturas de *P. s. garcae* contendo as construções pEDV-vazio e pEDV-HvEC16 foram ressuspendidas em tampão $MgCl_2$ 10 mM. Essas suspensões tiveram sua concentração ajustada para 5×10^6 ufc/ml. As suspensões foram injetadas, com o uso de seringas hipodérmicas, em folhas novas de cafeeiro, completamente expandidas, de modo a ocupar todos os espaços entre as nervuras laterais das folhas. Este fato pôde ser observado quando todo o limbo foliar apresentou-se encharcado. Foram inoculadas quatro folhas para cada tratamento. Com auxílio de um furador de micélio, foram retirados discos de folha de 0,75 cm de diâmetro, em intervalos de 0, 48, 72, 96 e 120 horas após a infiltração. Cada disco de folha foi macerado em tubos de 1,5 ml, contendo 250 μ l de tampão $MgCl_2$ 10mM. De cada macerado, obtiveram-se diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-4} . Em placas de Petri, que continham meio King B com rifampicina (100 μ g/mL) e gentamicina (25 μ g/mL), foi adicionado 0,1 ml da diluição correspondente. As placas foram incubadas a 28°C, por 48 horas, e procedeu-se a contagem do número de colônias.

2.8-Análise da secreção em levedura do efetor HvEC-016

A ORF do gene HvEC-016 foi amplificada pelos oligonucleotídeos HvEC-016F e HvEC-016R, os quais possuem sítio de clivagem para as enzimas EcoRI e NotI, respectivamente (Anexo 4). O amplicon obtido foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e NotI (Invitrogen) e submetido à reação de ligação com o vetor pYST-1 (Lee et al., 2006), previamente digerido com a mesmas enzimas. O produto da reação de ligação foi usado para transformação de *E. coli* DH5 α , e os transformantes foram selecionados em meio LB contendo ampicilina (150 μ g/ml). Após confirmação dos clones positivos por PCR realizou-se a purificação do DNA

plasmidial, usando o kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel). As reações de sequenciamento foram realizadas com os oligonucleotídeos Y5 (sequenciamento da extremidade 5') e YST-R1 (sequenciamento da extremidade 3'), para confirmação da clonagem da ORF do gene HvEC-016 in frame com a sequência codificadora da invertase. A estirpe BY4742, acesso YIL162w (MAT α , SUC2, his3 Δ , leu2 Δ , lys Δ , ura3 Δ) de *Saccharomyces cerevisiae* foi transformada com a construção YST1-HvEC16, de acordo com o protocolo de Gietz & Woods (2002). Os transformantes foram plaqueados em meio YPS sólido (5,0 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona, 25 ml/L de sacarose 40%, 10,0 g/L de ágar), acrescido de antibiótico gentamicina (150 μ g/ml). A secreção foi confirmada pelo crescimento de colônias no meio YPS.

2.9-Análise da estrutura genômica do gene HvEC-016

Os oligonucleotídeos HvEC-016F e HvEC-016R usados na clonagem da ORF para o ensaio de secreção em levedura também foram usados para amplificação da sequência genômica correspondente do isolado HV-01. O amplicon resultante foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). As clonagens, a purificação de plasmídeo e sequenciamento foram realizados como descritos anteriormente. A sequência genômica obtida foi alinhada com o cDNA, para a identificação das junções íntron-éxon, usando o programa SIM 4 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/members/duret/cours/inserm210604/exercise4/sim4.html>).

3-RESULTADOS

Efetuuou-se o sequenciamento Sanger de 12.288 clones provenientes de uma biblioteca construída a partir de folhas de cafeeiro infectadas com *H. vastatrix* (raça II), 12 dias após a inoculação. O agrupamento dessas sequências gerou 4.305 unisequências, com comprimento médio de 469 pb (Tabela 1).

Tabela 1: Número de unisequências obtidas pelo agrupamento de 9.828 ESTs geradas pelo sequenciamento Sanger de clones de cDNA da biblioteca CaHv-Sanger, construída a partir de mRNA isolado de folhas da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 inoculadas com o isolado monopustular de *H. vastatrix* da raça II (isolado Hv-01) e coletadas 12 dias após a inoculação.

Biblioteca CaHv-Sanger	Singletos	Contíguos	Unigenes
Número de sequências	3.301	1.004	4.305
Comprimento médio das sequências	421 pb	626 pb	469 pb
Nº de bases analisadas	1,4 Mb	0,6 Mb	2,0 Mb

Pelo sequenciamento da biblioteca normalizada utilizando a tecnologia de alto desempenho 454-GS-FLX (Roche) foram gerados 629.890 ESTs, que foram agrupados pelo programa MIRA-assembler v3.4 em 43.763 contíguos com comprimento médio de 867 pb e cobertura média de 5,3X (Tabela 2). A maioria dos contíguos (77%) apresentou tamanho superior a 500 pb e 28% (12.310 contíguos) foram maiores que 1 kb.

Tabela 2: Número de reads e contíguos obtidos pelo pirosequenciamento de cDNAs da biblioteca CaHv-454, construída a partir da amostra constituída por quantidades equimolares de mRNA isolado de folhas da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44, inoculadas com o isolado monopustular de *H. vastatrix* da raça II (isolado Hv-01) e coletadas às 24 hai, 48 hai e 9 dai.

Biblioteca CaHv-454	
Nº total de reads	719.563
Nº de reads agrupadas em contíguos	629.890
Nº de contíguos	43.763
Nº médio de reads por contíguos	14,4
Comprimento médio dos contíguos	867pb
Nº total de bases analisadas	38 Mb
Cobertura média dos contíguos	5,3X

Setenta e cinco por cento dos contígus da biblioteca CaHv-454 e 70% das unisequências da biblioteca CaHv-Sanger apresentaram similaridade significativa (BLASTN, $E_{\text{value}} < 10^{-3}$) com 254.546 ESTs de *Coffea* spp. depositados no Genbank. As sequências que não apresentaram similaridade com café foram submetidas à triagem para proteínas secretadas sem domínio transmembrana. Para isso, uma estratégia baseada em abordagens de predições paralelas entre as duas bibliotecas CaHv (454 e Sanger) foi estabelecida para identificar proteínas secretadas do fungo, expressas durante a interação com o cafeeiro (Fig. 1).

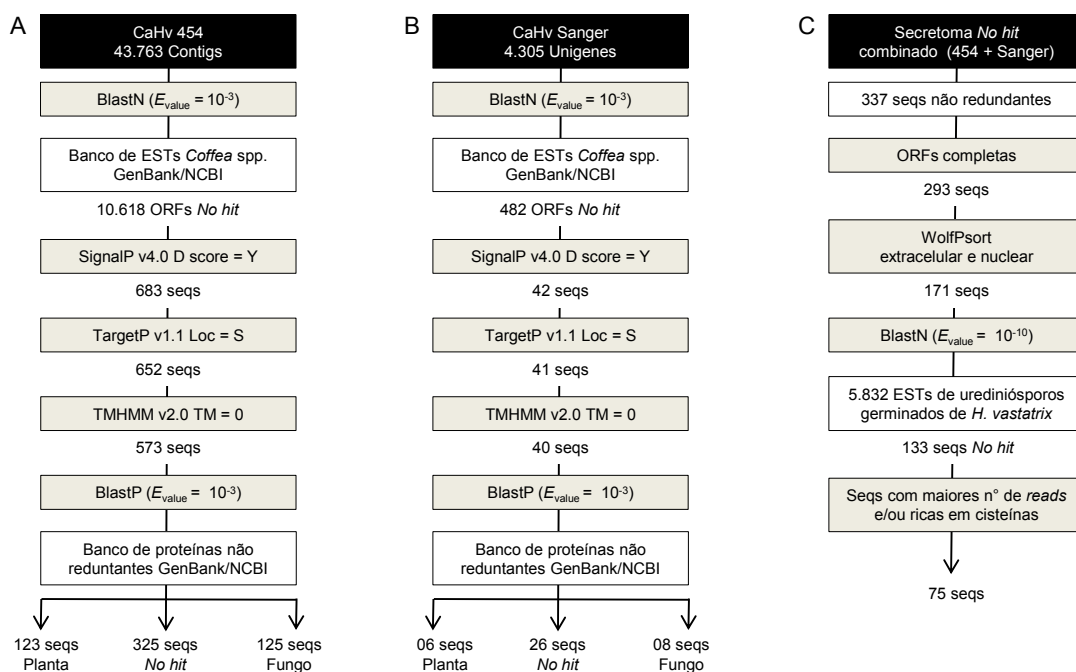


Figura 1: Análises de bioinformática realizadas para fazer a predição do secretoma de *H. vastatrix* expresso durante a interação com o cafeeiro suscetível. **(A)** Sequências provenientes da biblioteca CaHv-454; **(B)** Sequências provenientes da biblioteca CaHv-Sanger; e **(C)** Secretoma *No hit* não redundante obtido pela combinação das proteínas secretadas sem domínio transmembrana identificadas nas duas bibliotecas (CaHv-454 e CaHv-Sanger).

Das 573 sequências da biblioteca CaHv-454, 57% (325 seqs) codificam proteínas secretadas que não apresentaram similaridade com sequências protéicas depositadas no Genbank, sendo, portanto, sequências pressupostamente específicas de *H. vastatrix* (Fig. 1A). Cento e vinte cinco sequências codificam proteínas com similaridade a proteínas de fungo depositadas no Genbank, entre elas as sequências dos contígus CAHV_rep_c13089 e CAHV_c1569 destacam-se por apresentar similaridade à proteína RTP1 (Rust Transferred Protein), que é expressa nos

haustórios de *Uromyces fabae* (Kemen et al., 2005) (Tabela 3). Um contíguo CAHV_c5217 que também codifica proteína com similaridade à RTP1 foi detectado no proteoma não secretado (Tabela 3). Os alinhamentos das sequências deduzidas de aminoácidos dos produtos das traduções das ORFs completas de *H. vastatrix* representadas pelos contíguos CAHV_rep_c13089, CAHV_c1569 e CAHV_c5217 com a sequência de aminoácidos deduzida da proteína RTP1 de *U. fabae* estão apresentados na Figura 2.

Tabela 3: Contíguos de ESTs com ORFs completas que codificam proteínas com similaridade a RTP1 (Rust Transferred Protein) (BLASTP $E_{\text{value}} < 10^{-5}$).

Contíguos	Siglas	Nº reads	Comprimento da ORF (pb)	SignalP D-score	Nº do acesso	Espécie	E-value
CAHV_rep_c13089	HvRTP-01A	75	564	0,758	CAI96535.1	<i>U. viciae-fabae</i>	4,0E-10
CAHV_c1569	HvRTP-01B	13	642	0,793	CAI96535.1	<i>U. viciae-fabae</i>	7,0E-36
CAHV_c5217*	HvRTP-01C	11	468	0,105	CAI96535.1	<i>U. viciae-fabae</i>	8,0E-32

*Resultado negativo (D-score < 0,5) para predição de sinal de secreção usando o algoritmo SignalP.

Embora alguns efetores de diferentes espécies de fungos compartilhem similaridades (Hacquard et al., 2012), neste estudo foram definidas como candidatos efetores de *H. vastatrix* (HvECs) somente as proteínas secretadas sem similaridade (No hit) com proteínas de outros organismos, ou seja, que fossem proteínas exclusivas de *H. vastatrix*.

A triagem biocomputacional do Secretoma No hit combinado (454+Sanger) permitiu a identificação de 133 ORFs completas sem similaridade com 5.832 ESTs provenientes de urediniósporos germinados de *H. vastatrix*, ou seja, que codificam proteínas expressas in planta e com localização extracelular ou nuclear (Fig. 1C).

Para estabelecer uma ordem de prioridade para desenho de oligonucleotídeos e confirmação da origem fúngica, foram selecionadas 75 sequências que apresentaram maior número de reads por contíguo e/ou codificavam proteínas ricas em cisteínas (Fig. 1C). A origem fúngica para 62 genes HvECs foi confirmada por PCR utilizando cDNAs sintetizados a partir de RNAs isolados de urediniósporos dormentes e germinados, como também a partir de DNA genômico do fungo (Anexo 5). Cerca de 52% dos 62 HvECs foram compostos por no mínimo dez reads (Tabela 4).

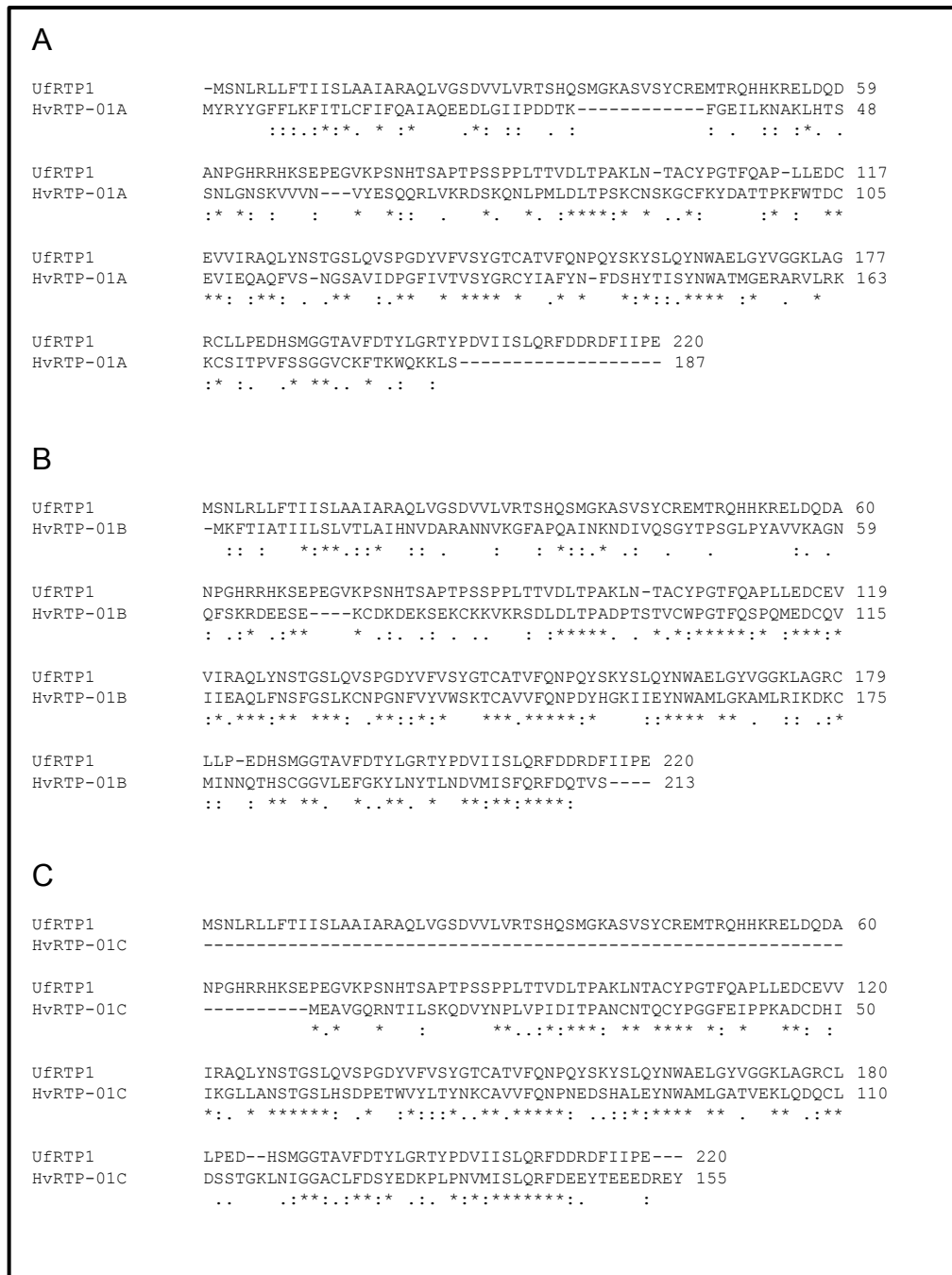


Figura 2: Alinhamento pelo programa ClustalW das sequências deduzidas de aminoácidos dos produtos da tradução das ORFs completas representadas pelos contíguos CAHV_rep_c13089 (A), CAHV_c1569 (B) e CAHV_c5217 (C), quando comparadas com a sequência de aminoácidos da proteína RTP1 de *U. fabae* (acesso: CAI96535), que apresentaram similaridade de sequências quando comparadas pelo algoritmo BLASTP. Pontos: “*” = identidade; “:” = substituição conservada; “.” = substituição semi-conservada.

Tabela 4: Predições de bioinformática dos 62 genes candidatos a efetores de *H. vastatrix* (HvECs) selecionados no banco do Secretoma No hit de ESTs da interação ferrugem-cafeeiro.

Genes	Contíguo/singletos	Biblioteca	Nº Reads	Cobertura	Tamanho Proteína	SignalP 4.0.		Peptídeo maduro			BLASTN Fernandes et al. (2012)
						Sítio clivagem	D-Score	Nº aas	Nº Cis	% Cis	
HVEC-002 ^Δ	Contig721	Sanger	016	-	97	21	0,927	77	0	0	contig20598 (Evalue = 10 ⁻¹¹⁵)
HVEC-004A ^Δ	CAHV_rep_c12639	Sanger + 454	122	45,17	193	21	0,909	173	2	1,156	contig19461 (Evalue = 0)
HVEC-004B ^Δ	CAHV_rep_c13186	Sanger + 454	079	34,38	192	21	0,917	172	1	0,581	contig18299 (Evalue = 10 ⁻¹²⁵)
HVEC-005	Contig1001	Sanger	003	-	120	20	0,551	101	9	8,911	No hit
HVEC-006 ^Δ	CAHV_rep_c13482	Sanger + 454	034	17,98	131	21	0,859	111	0	0	contig00104 (Evalue = 10 ⁻⁸⁸)
HVEC-007	Contig799	Sanger	002	-	106	24	0,605	83	2	2,41	No hit
HVEC-008 ^Δ	Contig641	Sanger	005	-	114	18	0,860	97	6	6,186	contig00104 (Evalue = 10 ⁻¹⁶¹)
HVEC-009 ^Δ	Contig971	Sanger	006	-	175	20	0,815	156	2	1,282	contig00063 (Evalue = 10 ⁻⁷⁹)
HVEC-016*	CAHV_rep_c12874	Sanger + 454	101	47,65	225	25	0,798	201	7	3,483	contig21571 (Evalue = 0)
HVEC-020*	CAHV_c39345	Sanger + 454	002	1,12	226	25	0,717	202	2	0,99	contig04087 (Evalue = 0)
HVEC-021*	CAHV_c12335	Sanger + 454	006	1,98	194	21	0,776	174	12	6,897	contig07172 (Evalue = 0)
HVEC-022 ^Δ	CAHV_CD_02_167_D05	Sanger	001	-	125	21	0,931	105	8	7,619	contig19429 (Evalue = 10 ⁻⁶⁴)
HVEC-048 ^Δ	CAHV_c2499	454	007	5,07	133	21	0,534	113	3	2,655	contig19256 (Evalue = 0)
HVEC-049 ^Δ	Contig84	Sanger	004	-	151	27	0,866	125	10	8	contig19256 (Evalue = 0)
HVEC-050 ^Δ	CAHV_rep_c13133	454	123	36,77	276	21	0,766	256	6	2,344	contig21820 (Evalue = 0)
HVEC-051 ^Δ	CAHV_c7469	454	115	16,4	295	21	0,900	275	6	2,182	contig21649 (Evalue = 0)
HVEC-052*	CAHV_c3914	454	111	32,74	219	19	0,875	201	6	2,985	contig22188 (Evalue = 0)
HVEC-053 ^Δ	CAHV_rep_c12948	454	097	54,49	132	20	0,833	113	0	0	contig00179 (Evalue = 10 ⁻¹²⁹)
HVEC-054*	CAHV_rep_c13199	454	080	30,95	157	23	0,877	135	0	0	contig10792 (Evalue = 0)
HVEC-055*	CAHV_rep_c13325	454	074	32,48	115	21	0,644	95	6	6,316	contig18142 (Evalue = 0)
HVEC-056 ^Δ	CAHV_rep_c19116	454	071	17,87	284	17	0,509	268	9	3,358	contig22151 (Evalue = 0)
HVEC-057*	CAHV_rep_c13238	454	070	24,92	126	22	0,894	105	10	9,524	contig22131 (Evalue = 0)
HVEC-058 ^Δ	CAHV_rep_c13531	454	064	28,07	115	17	0,747	99	6	6,061	contig07361 (Evalue = 10 ⁻¹⁴¹)
HVEC-059*	CAHV_rep_c13764	454	059	29,22	125	23	0,887	103	9	8,738	contig19976 (Evalue = 0)
HVEC-060 ^Δ	CAHV_rep_c13688	454	055	16,25	125	21	0,931	105	8	7,619	contig19429 (Evalue = 10 ⁻⁶⁴)
HVEC-061 ^Δ	CAHV_rep_c13955	454	055	14,43	340	24	0,745	317	8	2,524	contig03158 (Evalue = 0)
HVEC-062 ^Δ	CAHV_c4378	454	044	12,77	326	24	0,932	303	8	2,64	contig20476 (Evalue = 0)
HVEC-063*	CAHV_rep_c14650	454	038	16,72	121	24	0,744	98	6	6,122	contig19643 (Evalue = 0)
HVEC-064*	CAHV_rep_c14458	454	036	25,91	124	19	0,896	106	10	9,434	contig21565 (Evalue = 0)

Tabela 4: Continuação

HVEC-065	CAHV_rep_c14935	454	031	22,27	115	22	0,594	94	6	6,383	No hit
HVEC-066*	CAHV_rep_c14642	454	030	15,61	115	23	0,729	93	7	7,527	contig00470 (Evalue = 0)
HVEC-067 ^Δ	CAHV_rep_c15881	454	026	7,34	333	24	0,882	310	8	2,581	contig12622 (Evalue = 10 ⁻¹⁴²)
HVEC-068*	CAHV_c4356	454	025	11,01	196	18	0,864	179	3	1,676	contig09165 (Evalue = 0)
HVEC-069*	CAHV_rep_c15345	454	025	12,21	112	23	0,863	90	6	6,667	contig19203 (Evalue = 0)
HVEC-070 ^Δ	CAHV_c4915	454	024	6,36	375	28	0,793	348	10	2,874	contig19933 (Evalue = 10 ⁻¹³⁹)
HVEC-071	CAHV_c11544	454	018	10,19	112	22	0,510	91	6	6,593	No hit
HVEC-072	CAHV_rep_c22536	454	016	6,35	262	33	0,695	230	10	4,348	No hit
HVEC-074	CAHV_c9004	454	014	9,59	113	17	0,895	97	0	0	No hit
HVEC-075	CAHV_c9304	454	013	9,15	109	20	0,944	90	6	6,667	No hit
HVEC-077	CAHV_c2511	454	022	5,46	137	32	0,770	106	1	0,943	No hit
HVEC-078 ^Δ	CAHV_rep_c15902	454	011	8,72	134	28	0,583	107	10	9,346	contig06133 (Evalue = 10 ⁻⁷⁵)
HVEC-079*	CAHV_rep_c19900	454	009	5,56	80	18	0,544	63	4	6,349	contig18061 (Evalue = 10 ⁻¹²⁸)
HVEC-080 ^Δ	CAHV_rep_c21947	454	009	5,11	125	21	0,931	105	8	7,619	contig19429 (Evalue = 10 ⁻⁶⁴)
HVEC-081*	CAHV_c7809	454	008	5,45	120	21	0,822	100	6	6	contig10821 (Evalue = 0)
HVEC-083 ^Δ	CAHV_rep_c20162	454	008	7,29	116	24	0,715	93	7	7,527	contig00470 (Evalue = 0)
HVEC-084 ^Δ	CAHV_rep_c16754	454	007	3,57	110	30	0,811	81	2	2,469	contig16967 (Evalue = 10 ⁻⁵⁴)
HVEC-085 ^Δ	CAHV_c3415	454	006	4,66	155	19	0,783	137	4	2,92	contig17116 (Evalue = 10 ⁻⁵⁰)
HVEC-086	CAHV_c3510	454	006	3,77	123	24	0,768	100	7	7	contig00812 (Evalue = 10 ⁻⁹)
HVEC-087	CAHV_rep_c17555	454	006	4,51	202	21	0,846	182	6	3,297	contig13793 (Evalue = 10 ⁻¹⁴⁰)
HVEC-089	CAHV_c8188	454	005	4,94	113	20	0,729	94	6	6,383	No hit
HVEC-090 ^Δ	CAHV_c29828	454	004	1,79	90	25	0,774	66	4	6,061	contig03347 (Evalue = 10 ⁻¹³⁶)
HVEC-092	CAHV_c7923	454	004	2,97	87	21	0,834	67	2	2,985	No hit
HVEC-094	CAHV_rep_c27464	454	004	3,46	82	24	0,742	59	3	5,085	No hit
HVEC-095	CAHV_c11762	454	003	2,42	122	25	0,654	98	6	6,122	No hit
HVEC-096	CAHV_c27910	454	003	3,01	77	18	0,624	60	4	6,667	No hit
HVEC-099	CAHV_c31271	454	003	1,94	107	22	0,547	86	5	5,814	No hit
HVEC-101	CAHV_c37134	454	003	2,92	104	22	0,936	83	2	2,41	No hit
HVEC-102	CAHV_rep_c25198	454	003	2,55	115	19	0,862	97	6	6,186	No hit
HVEC-104	CAHV_c30319	454	002	1,92	110	20	0,845	91	4	4,396	No hit
HVEC-105	CAHV_c32113	454	002	1,63	131	21	0,854	111	13	11,71	contig13373 (Evalue = 10 ⁻⁴⁵)
HVEC-109 ^Δ	CAHV_rep_c39301	454	002	1,66	115	17	0,748	99	6	6,061	contig07361 (Evalue = 10 ⁻¹⁴³)
HVEC-110	CAHV_rep_c39301	454	002	1,62	81	19	0,568	77	8	10,39	contig22151 (Evalue = 10 ⁻⁹⁵)

* ORFs apresentando $\geq 98\%$ identidade com seqüências completas identificadas por Fernandez et al. (2012).

^Δ ORFs apresentando $\geq 98\%$ de identidade com seqüências incompletas identificadas por Fernandez et al. (2012).

Dos 62 HvECs, 45 HvECs apresentaram ≥ 4 resíduos de cisteína e 33 HvECs contêm $\geq 5\%$ de resíduos de cisteína em suas sequências proteicas (Tabela 4). Onze proteínas com mais de 5% de resíduos de cisteína com tamanho variando entre 91 a 100 aminoácidos no peptídeo maduro (Tabela 4) apresentaram padrões de espaçamento semelhantes em seis resíduos de cisteína (Fig. 3).

HvEC-058		KD	SDQG-QGRQFPLNKPGRSQ	ERVQHSAGHAVRMIVDRKNFGV	IGFVYNDNA	CIY--SPVQVIADDTGR-----	QNTTFPKDI--WSYNVRC
HvEC-109		KD	SDQG-QGRQFPLNKPGRSQ	ERVQHSAGHAVRMIVDRKNFGV	IGFVYNDNA	CIY--SPVQVIADDTGR-----	QNTTFPKDI--WSYNVRC
HvEC-066		AN	QGGQ-TPLNFTDDYNLNSV	KQVNGSFSPCAKFSINSPTSS	IGYVFHDSS	CTV--LWGRIRPDDANT--TTVT	QAL--KQGV--FSIQVRC
HvEC-083		AN	QGGQ-TPLNFTDDYNLNSV	KQVNGSFSPCAKFSINSPTSS	IGYVFHDSS	CTV--LWGRIRPDDANT--TTVT	QAL--KQGV--FSIQVRC
HvEC-065		NT	CKGDS-PGIYLTSDDG---	VRLLKAS-GHSVVYSEPPGPYK	GYALYHDNQ	SSDTLMSTIISTQAPY-----	C--TDGI--WSYKFC
HvEC-055		TC	QTGY-NYFNYTEKANTRFC	KSEPFGAHSLKMFPTPGNYIE	QVDFSDNR	GS-RINPSIVPNFRNP-----	QNDI-STGV--WSYKFC
HvEC-089		ND	SGYK-NFLKFSSENGVYNGA	LSLHPVPGNSISVQTGPSHLDC	VANIFSDSR	GH--IIRPVRPDPNGL-----	QWEN-TSDI--RSYRVLC
HvEC-081		DF	CTKGR-RINLDSRNKGAGQ	IQQTGVNSTFVNI-DPGTKY	CVNFYFDHY	CKT--IYTRVPPNTRSI-----	CNPL--SGLPMRSFKINCT
HvEC-063		HC	AGQP-QYFPFDDSKGDKQA	QVNGSFHPGAKFTASPEYRI	QYAHFYHDAR	QVV--PWGTPIPAQPSDLGIEIK	QPL--TSGS--FSLRVRC
HvEC-071		SS	IGAP-NTANYNESPQGTSR	FTIEGSAPHAVMLPDRFHPGN	CLSSFFHNNK	QSD--LLGEVNGSTGSF-----	CHPF--NGI--WSYRIHCL
HvEC-095		KN	CTKPLTSYPFTKDSYVSSP	IQVFERAAQSIRLYVEDVDIGR	ISRAFHS	GNCD---WTTAFKETLKS-KNNTN	CQN--QNGI--WSYTFSCA

Figura 3: Alinhamento múltiplo parcial das sequências de peptídeos deduzidos a partir das ORFs preditas de onze efetores candidatos de *H. vastatrix* (HvECs). Em destaque os padrões de espaçamento de seis resíduos de cisteínas conservados.

Adicionalmente, para tentar inferir a provável função biológica dos 62 HvECs, foram mapeados os domínios Pfam nos candidatos a efetores. Apenas um candidato (HvEC-056) apresentou similaridade significativa ($E_{\text{value}} = 10^{-6}$) com o domínio CFEM (PF05730), que é constituído por oito resíduos de cisteína e é específico de fungos (Kulkarni et al., 2003).

As ORFs dos 62 genes HvECs foram comparadas, por meio do algoritmo BLASTN, com as sequências de nucleotídeos da biblioteca de cDNA construída a partir de folhas de cafeeiro infectadas por *H. vastatrix*, 21 dias após a inoculação (Fernandez et al., 2012). Quarenta e uma ORFs apresentaram $\geq 98\%$ de identidade com as sequências descritas por esses pesquisadores. No entanto, o alinhamento demonstrou que 26 ORFs identificadas por eles são incompletas (Tabela 4). As quatro ORFs dos genes HvEC-086, HvEC-087, HvEC-105, HvEC-107 apresentaram similaridade com as sequências de Fernandez et al. (2012), mas o alinhamento demonstrou tratar-se de genes diferentes (Tabela 4). Finalmente, constatou-se que 17 HvECs não apresentaram similaridade com as sequências identificadas por eles (Tabela 2). Desta forma, pode-se concluir que 47 genes HvECs (75,8%) foram aqui descritos pela primeira vez.

Para seleção dos candidatos efetores do fungo expressos preferencialmente na interação com o cafeeiro empregou-se, inicialmente, a técnica de RT-PCR (Anexo 5). Amostras de cDNA de urediniósporos dormentes, urediniósporos germinados e

folhas de café inoculadas nos tempos 24 horas e 12 dias após a inoculação foram amplificadas, usando oligonucleotídeos específicos para os 62 genes HvECs, previamente selecionados com base em maiores números de reads e/ou ricos em cisteínas (Anexo 5). Adicionalmente avaliou-se a expressão dos três genes, HvRTP-01A, HvRTP-01B e HvRTP-01C, que codificam proteínas com similaridade à RTP1 (Tabela 3).

Trinta e cinco genes HvECs e o gene HvRTP-01C apresentaram padrão de expressão em esporos dormentes, esporos germinados e durante a interação com o cafeeiro (Anexo 5). Porém, constatou-se que 23 genes HvECs e os genes HvRTP-01A e HvRTP-01B apresentaram regulação positiva durante a interação com o cafeeiro, sendo mais abundante ou preferencialmente expressos in planta (Anexo 5). A análise detalhada da expressão desses 23 genes HvECs e também dos três genes similares à RTP1 foi efetuada pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR), nos tempos 24, 48, 72 horas após inoculação (hai) e 9 e 15 dias após inoculação (dai), assim como em urediniósporos dormentes e germinados (Fig. 4). Padrões de expressão temporal gênica distintos foram observados para os genes HvECs selecionados e para os genes com similaridade à RTP1 durante a infecção do fungo em folhas de "Catuai", mas alguns genes HvECs apresentaram padrões de expressão similares (Fig. 4).

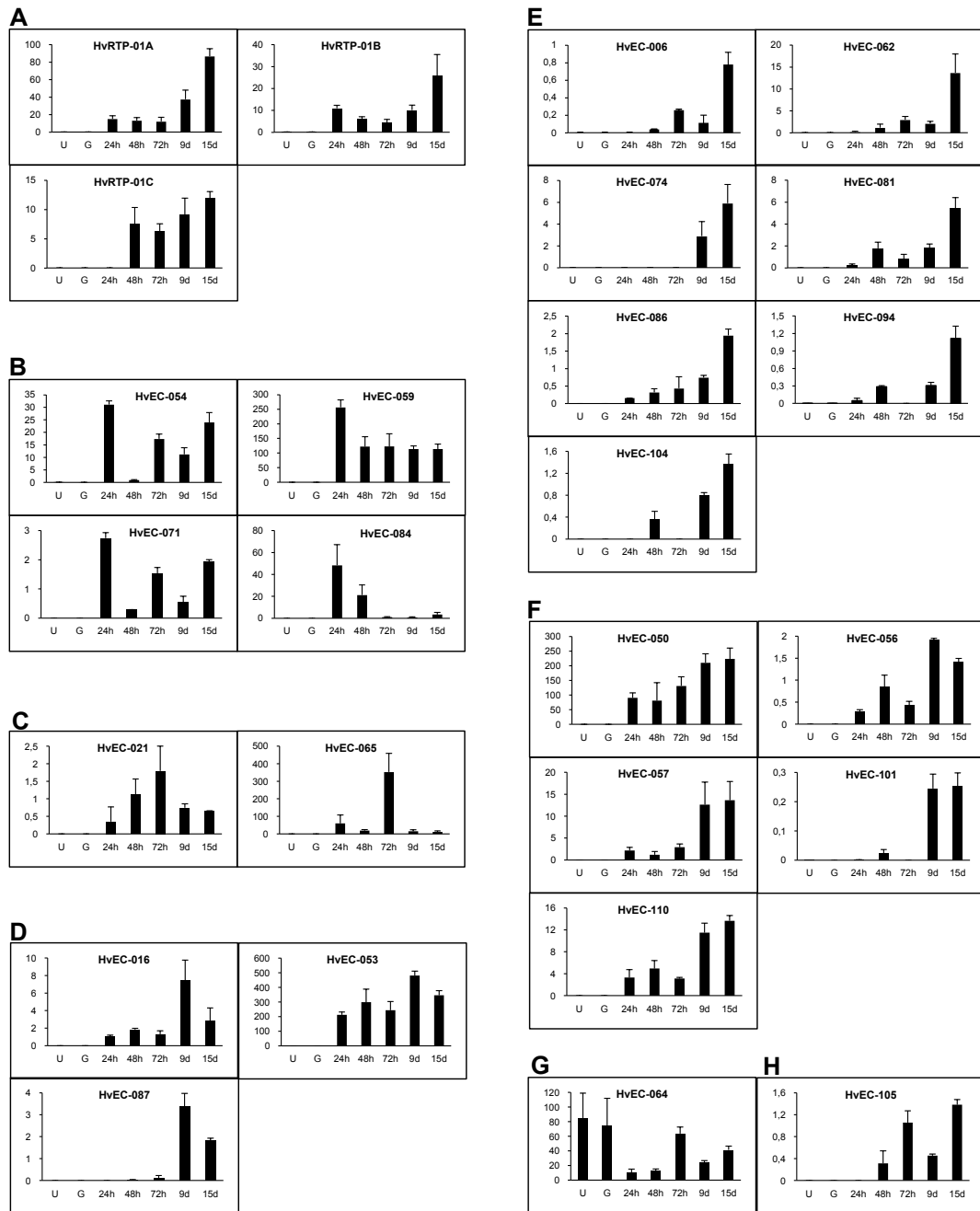


Figura 4: Análise da expressão temporal de genes de *H. vastatrix* que codificam proteínas secretadas por qRT-PCR. Os 23 genes HvECs foram pré-selecionados com base no padrão de expressão usando RT-PCR (Anexo 5). O padrão de expressão foi acessado em urediniósporos dormentes (U), urediniósporos germinados (G), plantas inoculados às 24 horas (24h), 48 horas (48h), 72 horas (72h) após a inoculação, e em plantas inoculadas aos 9 dias (9d) e 15 dias (15d) após a inoculação. O nível de expressão de cada gene-alvo foi normalizado com base na média dos valores de Ct obtidos pela expressão dos genes endógenos *CytIII*, *GADPH* e *βtub*. (A) Perfil de expressão dos três genes similares ao gene RTP1 de *Uromyces fabae* (Kemen et al., 2005); (B) HvECs com maior nível de expressão às 24 hai; (C) HvECs com maior nível de expressão às 72 hai; (D) HvECs com maior nível de expressão aos 9 dai; (E) HvECs com maior nível de expressão aos 15 dai; (F) HvECs com maior nível de expressão aos 9 e 15 dai; (G) HvEC-084 com maior nível de expressão em U e G; (H) HvEC-105 com maior nível de expressão em 72 hai e 15 dai.

Dos três genes similares à RTP1 analisados, os genes HvRTP-01A e HvRTP-01B apresentaram maior nível de expressão aos 15 dai (Fig. 4A). O perfil de expressão encontrado para esses genes está de acordo com o padrão de expressão demonstrado para um gene homólogo de RTP1 em *H. vastatrix*, descrito por Fernandez et al. (2012). Porém, para o gene HvRTP-01C o nível de expressão foi relativamente constante a partir de 48 hai (Fig. 4A).

Dos candidatos a efetores de *H. vastatrix* analisados, os genes HvEC-054, HvEC-059, HvEC-071 e HvEC-084 mostraram maiores níveis de expressão em 24 hai (Fig. 4B). Desses, o gene HvEC-059 apresentou maior acúmulo de transcritos em 24 hai, com um nível de expressão 250 vezes maior do que os controles endógenos (Fig. 4B).

Às 72 hai houve o maior nível de expressão dos genes HvEC-021 e HvEC-065 (Fig. 4C). O gene HvEC-065 apresentou maior nível de expressão às 72 hai, apresentando um acúmulo de transcritos 400 vezes maior que os controles endógenos (Fig. 4C). Os genes HvEC-016, HvEC-053 e HvEC-087 apresentaram maiores níveis de expressão aos 9 dai (Fig. 4D). O gene HvEC-053 teve maior nível de expressão entre todos os genes analisados, apresentando um acúmulo de transcritos 500 vezes maior que os controles endógenos aos 9 dai (Fig. 4D).

Sete candidatos a efetores apresentaram maiores níveis de expressão aos 15 dai (HvEC-006, HvEC-062, HvEC-074, HvEC-081, HvEC-086, HvEC-094 e HvEC-104) (Fig. 4E). Também foram identificados padrões de expressão com maiores níveis de transcritos nos tempos 9 e 15 dai (HvEC-050, HvEC-056, HvEC-057, HvEC-101 e HvEC-110) (Fig. 4F). Apenas um candidato HvEC-064 apresentou regulação positiva em urediniósporos dormentes e germinados (Fig. 4G). Finalmente, o gene HvEC-105 apresentou maior expressão às 72 hai e aos 15 dai (Fig. 4H). No geral, os genes selecionados não apresentaram acúmulo de transcritos em urediniósporos dormentes e germinados, exceto o gene HvEC-064.

Para superar as dificuldades de estudos funcionais em *H. vastatrix*, foi verificado se o sistema pEDV transloca efetores putativos do fungo via a maquinaria do SST3 de *P. s. garcae* (Psg). As bactérias transformadas com as construções pEDV-HvECs foram infiltradas na série de diferenciadores de raças de *H. vastatrix*, e como controle negativo utilizou-se a bactéria transformada com o sistema vazio, construção pEDV-vazio. Dentre os clones avaliados o efector candidato HvEC-016 mostrou ser bastante promissor nos ensaios de infiltração, pois, com base na

expressão fenotípica da interação Psg-cafeeiro, constatou-se reação diferencial entre os genótipos de cafeeiros infiltrados com a bactéria expressando a construção pEDV-HvEC16 (Tabela 5).

Tabela 5: Reação diferencial de genótipos de cafeeiros à inoculação com isolado de *H. vastatrix* HV-01 e também à infiltração de *P. syringae* pv. *garcae* transformada com as construções pEDV-vazio e pEDV-HvEC16. O experimento foi repetido três vezes, com resultados similares.

Genótipos ^a de cafeeiros	Genes de resistência	HV-01 ^b	<i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i>	
			pEDV-vazio	pEDV-HvEC16
128/2 - Dilla & Algue	S _H 1	R	S	R
Bourbon - "Catuaí"	S _H 5	S	S	S
1343/269 - H. Timor	S _H 6	R	S	S
134/4 - S 12 Kaffa	S _H 1,4	R	S	R
87/1 - Geisha	S _H 1,5	R	S	R
32/1 - DK 1/5	S _H 2,5	R	S	S
33/1 - S 288-23	S _H 3,5	R	S	S
110/5 - S 4 Agaro	S _H 4,5	R	S	S
1006/10 - KP 532	S _H 1,2,5	R	S	R
H153/2	S _H 1,3,5	R	S	R
H152/3	S _H 2,4,5	R	S	S
H419/20	S _H 5,6,9	R	S	S
HW 17/12	S _H 1,2,4,5	R	S	R
H147/1	S _H 2,3,4,5	R	S	S
H420/10	S _H 5,6,7,9	R	S	S
644/18 - H. Kawisari	S _H ?	R	S	S

^a Coleção de genótipos de cafeeiros diferenciadores de raças de *H. vastatrix* do Departamento de Fitopatologia da UFV.

^b Isolado de *H. vastatrix* (raça II)

Sintomas observados nas plantas infiltradas com bactéria:

S – presença de anasarca (48 hai) e necrose (72 hai).

R – ausência de anasarca e necrose.

Quando os genótipos “Catuaí”, H147/1 e H420/10 foram desafiados com a bactéria contendo a construção pEDV-HvEC16, foram observados sintomas de necrose, que iniciaram três dias após as infiltrações (Fig 5C, I, J). Porém, a bactéria expressando a mesma construção foi incapaz de causar sintomas da doença em genótipos de cafeeiros contendo o gene S_H1 , sozinho ou associado com outros genes S_H (Fig 5B, D, E, F, G, H).

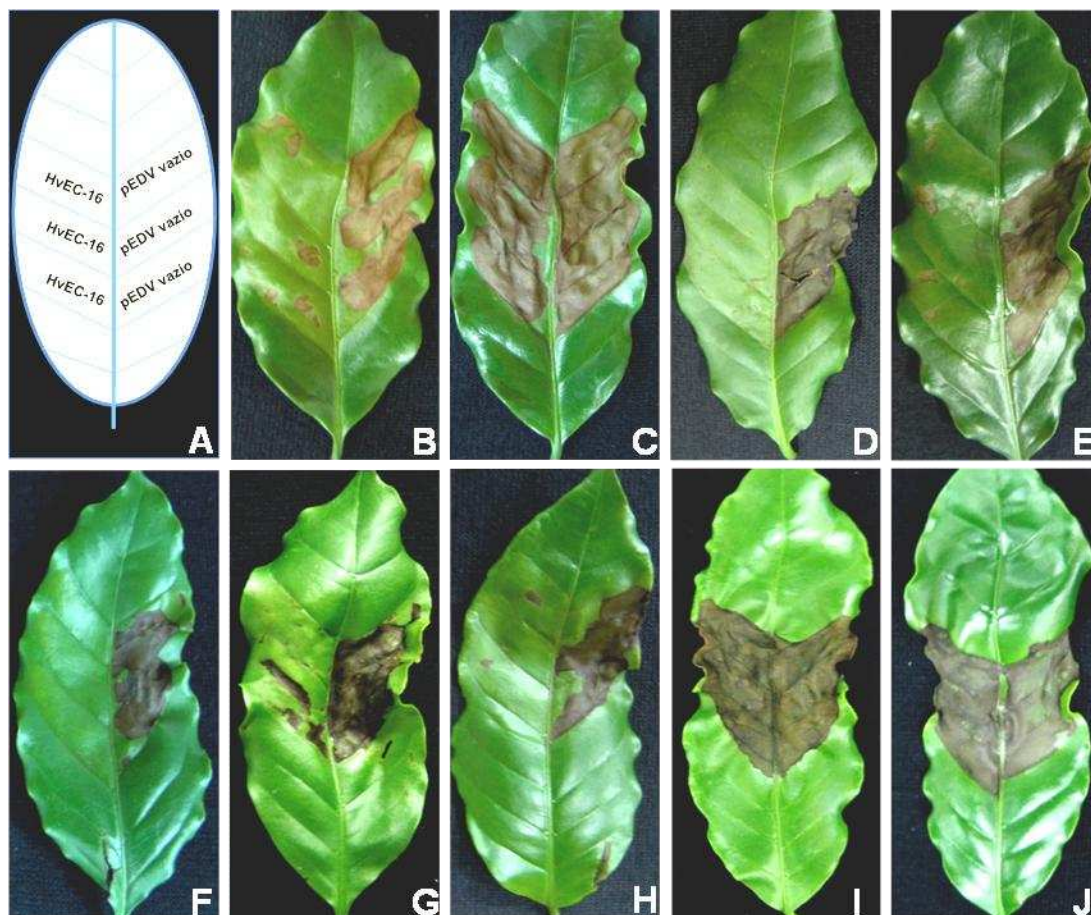


Figura 5: Sintomas observados em folhas de cafeeiros da coleção de diferenciadores de raças de *H. vastatrix* infiltrados com uma suspensão contendo 2×10^8 ufc/ml de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* aos seis dias após a infiltração. (A) Esquema representativo da folha de café mostrando os limbos, entre as nervuras laterais, que foram infiltrados com *Psg* transformada com a construção pEDV-HvEC16 (à esquerda), e com *Psg* transformada com a construção pEDV-vazio (à direita); (B) genótipo 128/2 Dilla & Algue, gene de resistência S_H1 ; (C) ‘Catuaí Vermelho IAC 44’, gene de resistência S_H5 ; (D) genótipo 134/4 S.12 Kaffa, genes de resistência $S_H1,4$; (E) genótipo 87/1 Geisha, genes de resistência $S_H1,5$; (F) genótipo KP 532, genes de resistência $S_H1,2,5$; (G) genótipo H153/2, gene de resistência $S_H1,3,5$; (H) genótipo HW 17/12, genes de resistência $S_H1,2,4,5$; (I) genótipo H147/1, genes de resistências $S_H2,3,4,5$ e (J) genótipo H420/10, genes de resistência, $S_H5,6,7,9$.

O próximo passo foi verificar se a ausência de sintomas em genótipo de cafeeiro contendo o gene S_H1 está relacionada com a restrição do crescimento bacteriano. A expressão transiente do efector putativo HvEC-016 restringiu a proliferação da Psg no limbo foliar no genótipo de cafeeiro Dilla & Algue, que contém apenas o gene de resistência S_H1 (Fig. 6). Nas folhas infiltradas com Psg expressando a construção pEDV-vazio, o crescimento da bactéria foi maior que o crescimento da bactéria expressando a construção pEDV-HvEC16, a partir de 48 hai (Fig. 6), o que indica ter ocorrido resposta de resistência desencadeada por meio do reconhecimento da proteína efetora HvEC-016 pela proteína R codificada pelo gene S_H1 . Esses resultados também demonstram que o sinal de secreção AvrRps4N é capaz de ser reconhecido pela maquinaria de secreção Tipo III de *P. syringae* pv. *garcae*, permitindo a transferência da proteína quimérica AvrRps4N-HvEC-016 para o citoplasma das células de cafeeiro, o que demonstra a exequibilidade desse sistema para a identificação de candidatos a efetores de *H. vastatrix* reconhecidos pelas proteínas codificadas pelos genes S_H .

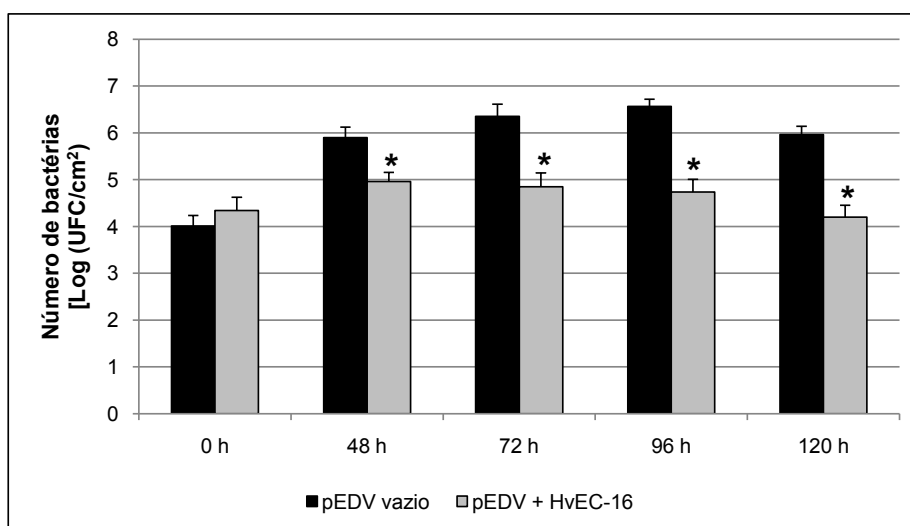


Figura 6: A proteína HvEC-016 restringe o crescimento de *P. syringae* pv. *garcae* em folhas do cafeeiro Dilla & Algue, portador do gene S_H1 . As folhas foram infiltradas com uma suspensão com 5×10^6 ufc/mL de Psg transformadas com as construções pEDV-vazio e pEDV-HvEC16. A população bacteriana foi mensurada nos tempos 0, 48, 72, 96 e 120 horas após a infiltração. Cada barra representa a média do número de colônias de bactérias recuperadas em meio King B contendo os antibióticos adequados, a partir de quatro réplicas biológicas. Os asteriscos representam a existência de diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

A validação funcional do peptídeo sinal predito para o efetor candidato HvEC-016 foi realizado pelo sistema armadilha de secreção em levedura YST (Lee et al., 2006). Esse sistema de secreção baseia-se em um vetor de expressão que carrega um gene da invertase (SUC2) onde o códon de iniciação (ATG) e a região do peptídeo sinal foram removidos. A ORF do gene HvEC-016 foi clonada no vetor de expressão pYST-1 de forma a manter a fase aberta de leitura com o gene que codifica a invertase. A confirmação que o gene HvEC-016 codifica um peptídeo sinal funcional foi observada pelo crescimento de colônias de levedura mutantes para o gene da invertase em meio de seleção contendo sacarose como única fonte de carbono.

O amplicon referente à sequência genômica do gene HvEC-016 apresenta 1.014 pb, enquanto seu cDNA correspondente possui 678 pb. A análise resultante do alinhamento entre as sequências determinou que a região codificadora do gene HvEC-016 é composta por 5 éxons (Anexo 6). Esta estrutura genômica está de acordo com a média do número de éxons preditos para os genes identificados nos genomas de *M. larici-populina* e *P. graminis* f.sp. *tritici* (Duplessis et al., 2011).

4-DISCUSSÃO

A maioria das proteínas efetoras de fungos fitopatogênicos caracterizados até o momento é secretada pela rota clássica de secreção (de Wit et al., 2009). Desta forma, a utilização de ferramentas de predição de proteínas secretadas a partir de sequências completas de genomas e de cDNAs é uma estratégia que pode ser utilizada para caracterizar o secretoma de fungos. Como a maioria dos genomas de fungos ainda não foi caracterizada, o método alternativo que tem sido utilizado com bastante sucesso na caracterização do secretoma de fungos biotróficos é o sequenciamento de cDNAs sintetizados a partir de mRNA purificado de tecidos infectados ou de haustórios, seguido da mineração dos ESTs para identificação de ORFs que codificam proteínas com peptídeo sinal de secreção. Entretanto, a mistura de tecido da planta e estruturas do fungo impõe limitações, devido à abundância diferencial de transcritos da planta em relação ao do fungo. A utilização de bibliotecas normalizadas aumenta a chance de descoberta de transcritos raros ou pouco abundantes, o que é importante para a identificação de efetores expressos especificamente em um determinado estágio de infecção e que, conseqüentemente, podem estar representados em baixa quantidade nas amostras de cDNAs. Além disso, é importante destacar que, nesse estudo, quatro tempos diferentes [48 hai, 72 hai, 9 dai (biblioteca CaHv-454) e 12 dai (biblioteca CaHv-Sanger)] foram amostrados e utilizados para construção da biblioteca de cDNAs com o objetivo de maximizar a identificação de genes expressos em diferentes estágios da patogênese de *H. vastatrix*.

Por meio dessa abordagem foi possível identificar 457 proteínas não redundantes entre as duas bibliotecas (CaHv-454 e CaHv-Sanger), pressupostamente de *H. vastatrix* secretadas durante a fase biotrófica da interação com o cafeeiro. Desse conjunto, 125 proteínas (29,3%) apresentam similaridade com sequências protéicas de fungos depositadas em banco de dados. Dentre elas se destacam proteínas com similaridade a RTP1, que é secretada pelo haustório e acumula no citoplasma da planta hospedeira (Kemen et al. 2005). A identificação de proteínas com similaridade à proteína expressa no haustório demonstra que a abrangência do sequenciamento efetuado foi suficiente para detectar genes que codificam proteínas secretadas pelos haustórios de *H. vastatrix*.

Uma característica importante dos efetores é que suas sequências não apresentam homologia com sequências de espécies relacionadas, ou seja, são espécie-específicas (Ellis et al., 2009). Por essa razão, neste estudo focou-se na análise de proteínas secretadas sem similaridade com sequências protéicas depositadas em banco de dados. Adicionalmente, essas proteínas foram reanalisadas usando o algoritmo WolfPSORT, visando à obtenção de uma seleção mais estridente, pois esse algoritmo é considerado o de maior acurácia para predição de proteínas extracelulares em fungos (Min, 2010) e tem sido utilizado com bastante sucesso na caracterização do secretoma de fungos fitopatogênicos (Brown et al., 2012).

Das sequências que tiveram predição positiva para localização extracelular e nuclear, 62 genes HvECs foram confirmados como sendo de origem fúngica. A anotação no banco de dados de domínio Pfam mostrou que nenhuma função pode ser atribuída para os HvECs caracterizados, exceto o HvEC-68, que apresentou similaridade significativa com o domínio CFEM (PF05730). Saunders et al. (2012) mapearam a presença de domínio Pfam em 19 proteínas Avr e constataram que apenas as proteínas Avr4 e Ecp6, de *Cladosporium fuvum*, possuem significativa similaridade com os domínios Chitin Binding Module (PF14776) e LysM (PF01476), respectivamente. Eles também verificaram que o secretoma de fungos causadores de ferrugens é caracterizado pela ausência de domínios Pfam. Dessa forma, a ausência de domínio Pfam para os HvECs aqui relatados está de acordo com as características de proteínas efetoras que, de modo geral, são proteínas novas de função desconhecida.

Das 62 HvECs proteínas identificadas, 53% (33 proteínas) apresentaram 5% de resíduos de cisteína na composição de aminoácidos do peptídeo maduro. Dessas, onze HvECs apresentaram padrões de espaçamento de resíduos de cisteína conservados. Efetores de fungos são normalmente ricos em cisteínas (Stergiopoulos & de Wit, 2009). Os resíduos de cisteínas podem auxiliar na estabilidade da proteína efetora no meio extracelular, pela formação de pontes dissulfetos intramoleculares (Templeton et al., 1994; Rep, 2005). Além disso, as ligações dissulfídicas em proteínas secretadas podem ser importantes para sua estrutura e função (Kamoun, 2006; Stergiopoulos & de Wit, 2009). Membros de várias famílias de candidatos a efetores de *M. larici-populina* apresentam padrões de espaçamento de resíduos de cisteína conservados, apesar da baixa identidade entre as sequências analisadas

(Hacquard et al., 2012). A hipótese levantada para explicar esses resultados é que as ligações dissulfídicas são importantes para manutenção da estrutura da proteína, enquanto as regiões variáveis poderiam promover as sequências requeridas para as funções específicas da proteína (Hacquard et al., 2012). Neste caso, significantes mudanças nas sequências de aminoácidos, exceto nos resíduos de cisteínas, podem ocorrer sem alterar a topologia do enovelamento, fazendo com que essas proteínas ricas em cisteínas sejam ideais para as funções de reconhecimento e especificidade (Templeton et al., 1994; Povolotskaya & Kondrashov, 2010). Assim, o alto número de resíduos de cisteínas poderia desempenhar um papel importante na evolução de efetores, permitindo sua rápida diversificação, o que contribuiria para a emergência de novas raças de fungos filamentosos.

É importante ressaltar, entretanto, que nem todas proteínas efetoras de fungos contém resíduos de cisteína. Por exemplo, o efector *Vice6* de *Venturia inaequalis* não possui resíduos de cisteína (Bowen et al., 2009), assim como as proteínas efetoras com atividade de avirulência *AvrL567* e *AvrM* de *M. lini* (Dodds et al., 2004; Catanzariti et al., 2006) e *AvrLm1* de *Leptosphaeria maculans* (Gout et al., 2006). Dessa maneira, também foram selecionados cinco candidatos a efetores sem resíduos de cisteínas no peptídeo maduro (*HvEC-002*, *006*, *053*, *054*, *074*), os quais são representados por contíguos constituídos por no mínimo 14 reads (Tabela 4), indicando que esses genes são substancialmente expressos durante a fase biotrófica de *H. vastatrix*.

Dos 62 genes *HvECs*, 21 não estavam representados no banco de cDNA de folhas infectadas por *H. vastatrix* (raça XIV), 21 dias após a inoculação, obtido por Fernandez et al. (2012). Isto indica que a expressão desses 21 *HvECs* são regulados negativamente nos estágios adiantados do parasitismo de *H. vastatrix* e/ou que há possibilidade de esses genes estarem ausentes no genoma do isolado 178A (raça XIV), utilizado na inoculação do cafeeiro CIFC H147/1 para construção da biblioteca. Adicionalmente, constatou-se que 26 genes *HvECs* apresentaram identidade com sequências incompletas relatadas por esses pesquisadores. Este fato demonstra que a estratégia de amonstragem de ESTs em tempos diferenciados, associada à construção de uma biblioteca normalizada, permitiu maximizar a diversidade de transcritos, o que contribuiu para obtenção de grande número de contíguos de comprimento completo. O agrupamento das reads geradas no estudo de Fernandez et al. (2012) formou 22.774 contíguos com o comprimento médio de 542

pb. Neste estudo foram analisados 43.774 contíguos, com o comprimento médio de 867 pb.

A predição do secretoma associado à análise de expressão temporal permite a identificação de genes candidatos a efetores, especificamente os expressos durante a colonização dos tecidos vegetais (Kamper et al., 2006; Mosquera et al., 2009; Spanu et al., 2010). Demonstrou-se por qRT-PCR que 22 genes HvECs são regulados positivamente durante a interação com o cafeeiro. Observações histológicas da interação Hemileia-cafeeiro revelaram que nas 24 hai os estágios de desenvolvimento do fungo mais frequentes nos sítios de infecção são hifa primária e o haustório primário (Ramiro et al. 2009; Vieira et al., 2012). Assim, é possível que os genes HvEC-054, HvEC-059, HvEC-071 e HvEC-084 (Fig. 4B) estejam envolvidos com os estágios iniciais da infecção, provalvemente com a supressão da resposta de defesa do cafeeiro durante a penetração através dos estômatos. Depois de 48 hai as estruturas do fungo identificadas em maior quantidade nos sítios de infecção são célula-mãe do haustório e haustório (Ganesh et al., 2006; Ramiro et al., 2009; Vieira et al., 2012). Desta forma, a maioria dos genes HvECs analisados neste trabalho é expressa em maior intensidade após a diferenciação dos haustórios secundários no mesofilo do cafeeiro. Os genes diferencilmente expressos durante a fase biotrófica de *H. vastatrix* serão priorizados para ensaios funcionais, para confirmar seus papéis durante a interação com o cafeeiro.

As proteínas efetoras de fungos causadores de ferrugem podem atuar na matriz extra-haustorial, no espaço extracelular ou no citoplasma da célula hospedeira. As proteínas efetoras citoplasmáticas podem ser reconhecidas pelas proteínas R da célula hospedeira, induzindo ETI, sendo, nesse caso, denominadas proteínas de avirulência (Rafiqi et al., 2009). A maioria dos genes R caracterizados codifica proteínas citoplasmáticas com domínio NB-LRR (Takken & Tameling, 2009). No cafeeiro, até o momento, foram geneticamente identificados pelo menos nove genes dominantes (S_H1 - S_H9) que conferem, sozinhos ou associados, resistência à ferrugem (Rodrigues & Bettencourt, 1975; Bettencourt & Rodrigues, 1988). Recentemente, várias sequências que codificam proteínas da família NB-LRR foram identificadas na região genômica de *C. arabica* que contém o loco S_H3 (Ribas et al., 2011). Assim, é possível que os genes S_H de cafeeiro codifiquem proteínas R citoplasmáticas capazes de reconhecer efetores citoplasmáticos de *H. vastatrix*. Desta forma, a indução de respostas de defesa por efetores putativos de *H. vastatrix*

translocados para o citoplasma de genótipos de cafeeiro portadores de genes S_H pode ser utilizada como ferramenta para identificar proteínas efetoras citoplasmáticas.

Com essa perspectiva em mente, estabeleceu-se um protocolo de translocação de putativos efetores do isolado HV-01 de *H. vastatrix* para o citoplasma de acessos de cafeeiros portadores de genes S_H mediado pelo SST3 de *P. s. garcae*. Com base na expressão fenotípica da interação *P. s. garcae*-cafeeiro, houve reação de resistência em genótipos de cafeeiro portadores do gene S_{H1} quando esses foram desafiados pela bactéria expressando a proteína do fungo HvEC-016, o que demonstra que o gene HvEC-016 codifica uma proteína com atividade de avirulência. Embora a translocação da proteína HvEC-016 pelo sistema pEDV tenha resultado em fenótipo de resistência (ausência de sintomas) nos genótipos portadores do gene S_{H1} , nenhuma morte celular macroscópica, típica de reação de hipersensibilidade, foi observada. É possível que a translocação de efetores Tipo III de *P. s. garcae* possa ter atenuado a plena expressão da ETI específica para *H. vastatrix*. Alternativamente, o efector HvEC-016 pode ter afetado a colonização da bactéria, interferindo com os mecanismos de defesa induzidos por PAMPs.

A restrição do crescimento de *P. s. garcae* expressando a construção pEDV-HvEC16 em cafeeiros com o gene S_{H1} demonstra o potencial do sistema pEDV para estudos funcionais de efetores de *H. vastatrix*. Neste particular, é extremamente relevante o fato de terem sido caracterizados efetores de um isolado de *H. vastatrix* pertencente à raça II. Esse isolado é virulento somente em genótipos de cafeeiros resistentes contendo apenas o gene S_{H5} . Sendo assim, análises de expressão transiente dos demais candidatos a efetores identificados nos genótipos da série diferenciadora de raças poderão resultar na identificação de outros genes Avr de *H. vastatrix*.

É importante destacar que a aplicação do sistema pEDV pode auxiliar as análises da atividade de avirulência dos HvECs em acessos/linhagens de cafeeiros disponíveis nos bancos de germoplasma dos principais programas de melhoramento que visam resistência à ferrugem do Brasil. Além disso, essa abordagem poderá acelerar a identificação de novos genes de resistência em genótipos de cafeeiros, bem como diminuir o tempo de realização dos ensaios de fenotipagem em populações de plantas segregantes, pela praticidade e rapidez de trabalhar com fitobactérias em relação a *H. vastatrix*.

5. REFERÊNCIAS

- Bettencourt AJ, Rodrigues CJ 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: Clarke RJ, Macrae R eds. *Coffee: Agronomy*. London: Elsevier Applied Sciencepp 285-292.
- Bilgin DD, DeLucia EH, Clough SJ. 2009. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. **Nature Protocols** 4(3): 333-340.
- Bowen JK, Mesarich CH, Rees-George J, Cui W, Fitzgerald A, Win J, Plummer KM, Templeton MD. 2009. Candidate effector gene identification in the ascomycete fungal phytopathogen *Venturia inaequalis* by expressed sequence tag analysis. **Molecular Plant Pathology** 10(3): 431-448.
- Brown NA, Antoniw J, Hammond-Kosack KE. 2012. The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis. **PloS One** 7(4): e33731.
- Cabral PGC, Zambolim EM, Zambolim L, Lelis TP, Capucho AS, Caixeta E. 2009. Identification of new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Note** 4: 129-130.
- Capucho AS, Zambolim EM, Freitas RL, Haddad F, Caixeta ET, Zambolim L. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease Note** 7: 189-191.
- Carvalho CR, Fernandes RC, Carvalho GMA, Barreto WB, Evans HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. **Plos One** 6(11): e26387.
- Catanzariti AM, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **Plant Cell** 18(1): 243-256.
- de Wit PJ, Mehrabi R, Van den Burg HA, Stergiopoulos I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. **Molecular Plant Pathology** 10(6): 735-747.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA, Ellis JG. 2004. The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **Plant Cell** 16(3): 755-768.
- Dodds PN, Rafiqi M, Gan PHP, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG. 2009. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. **New Phytologist** 183(4): 993-999.
- Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics** 11(8): 539-548.

- Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel BL, Chiu R, Coutinho PM, Feau N, Field M, Frey P, Gelhaye E, Goldberg J, Grabherr MG, Kodira CD, Kohler A, Kues U, Lindquist EA, Lucas SM, Mago R, Mauceli E, Morin E, Murat C, Pangilinan JL, Park R, Pearson M, Quesneville H, Rouhier N, Sakthikumar S, Salamov AA, Schmutz J, Selles B, Shapiro H, Tanguay P, Tuskan GA, Henrissat B, Van de Peer Y, Rouze P, Ellis JG, Dodds PN, Schein JE, Zhong SB, Hamelin RC, Grigoriev IV, Szabo LJ, Martin F. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108(22): 9166-9171.
- Ellis JG, Rafiqi M, Gan P, Chakrabarti A, Dodds PN. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. **Current Opinion in Plant Biology** 12(4): 399-405.
- Fabro G, Steinbrenner J, Coates M, Ishaque N, Baxter L, Studholme DJ, Korner E, Allen RL, Piquerez SJ, Rougon-Cardoso A, Greenshields D, Lei R, Badel JL, Caillaud MC, Sohn KH, Van den Ackerveken G, Parker JE, Beynon J, Jones JD. 2011. Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity. **PLoS Pathogens** 7(11): e1002348.
- Fernandez D, Tisserant E, Talhinhos P, Azinheira H, Vieira A, Petitot AS, Loureiro A, Poulain J, Da Silva C, Silva MDC, Duplessis S. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology** 13(1): 17-37.
- Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9: 275-296.
- Ganesh D, Petitot AS, Silva MC, Alary R, Lecouls AC, Fernandes D. 2006. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science** 170: 1045-1051.
- Gietz RD, Woods RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods Enzymology** 350: 87-96.
- Gout L, Fudal I, Kuhn ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, Rouxel T. 2006. Lost in the middle of nowhere: the AvrLm1 avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. **Molecular Microbiology** 60(1): 67-80.

- Hacquard S, Joly DL, Lin YC, Tisserant E, Feau N, Delaruelle C, Legue V, Kohler A, Tanguay P, Petre B, Frey P, Van de Peer Y, Rouze P, Martin F, Hamelin RC, Duplessis S. 2012. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). **Molecular Plant-Microbe Interactions** 25(3): 279-293.
- Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. **Nature** 444(7117): 323-329.
- Kamoun S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology** 44: 41-60.
- Kamper J, Kahmann R, Bolker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Muller O, Perlin MH, Wosten HA, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Snetselaar K, McCann M, Perez-Martin J, Feldbrugge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, Gonzalez-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho EC, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Hauser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Guldener U, Munsterkotter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature** 444(7115): 97-101.
- Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 18(11): 1130-1139.
- Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, Ver Loren van Themaat E, van der Does HC, Hacquard S, Stuber K, Will I, Schmalenbach W, Schmelzer E, O'Connell RJ. 2012. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. **PLoS Pathog** 8(4): e1002643.
- Kulkarni RD, Kelkar HS, Dean RA. 2003. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. **Trends in Biochemical Sciences** 28(3): 118-121.
- Lee SJ, Kelley BS, Damasceno CMB, John BS, Kim BS, Kim BD, Rose JKC. 2006. A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 19(12): 1368-1377.
- Livak KJ, Thomas DS. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods** 25: 402-408.

- Maia TA, Zambolim EM, Caixeta ET, Mizubuti ESG, Zambolim L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathology** no prelo.
- Matsuoka K, Vanetti CA. 1993. Mudanças histopatológicas causadas por *Hemileia vastatrix* em cafeeiros apresentando diferentes níveis de resistência. **Fitopatologia Brasileira** 18: 484-493.
- McDonald BA, Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology** 40: 349-379.
- Min XJ. 2010. Evaluation of computational methods for secreted protein prediction in different eukaryotes. **Journal of Proteomics & Bioinformatics** 3: 143-147.
- Mosquera G, Giraldo MC, Khang CH, Coughlan S, Valent B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. **Plant Cell** 21(4): 1273-1290.
- Noronha-Wagner M, Bettencourt A. 1967. Genetic study of the resistance of *coffea* spp. to leaf rust: i. identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany** 45: 2021-2131.
- Nunes CC, Maffia LA, Mizubuti ESG, Brommonschenkel SH, Silva JC. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology** 38: 445-452.
- Oliveira JR, Romeiro RS, Muchovej JJ. 1991. Population tendencies of *Pseudomonas cichorii* and *P. syringae* pv. *garcae* in young and mature coffee leaves. **Journal Phytopathology** 131: 210-214.
- Panstruga R, Dodds PN. 2009. Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. **Science** 324(5928): 748-750.
- Povolotskaya IS, Kondrashov FA. 2010. Sequence space and the ongoing expansion of the protein universe. **Nature** 465(7300): 922-926.
- Rafiqi M, Bernoux M, Ellis JG, Dodds PN. 2009. In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. **Seminars in Cell and Development Biology** 20(9): 1017-1024.
- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, Hardham AR, Dodds PN. 2012. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 15(4): 477-482.
- Ramiro DA, Escoube J, Petitot AS, Nicole M, Maluf MP, Fernandez D. 2009. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II)

- associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology** 58: 944-955.
- Rep M. 2005. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. **FEMS Microbiol Letters** 253(1): 19-27.
- Ribas AF, Cenci A, Combes MC, Etienne H, Lashermes P. 2011. Organization and molecular evolution of a disease-resistance gene cluster in coffee trees. **BMC Genomics** 12: 240.
- Rodrigues CJ. 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. **Fitopatologia Brasileira** 15: 5-9.
- Rodrigues CJ, Bettencourt AJ. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology** 13: 49-70.
- Saunders DG, Win J, Cano LM, Szabo LJ, Kamoun S, Raffaele S. 2012. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. **PloS One** 7(1): e29847.
- Silva MC, Guerra-Guimarães L, Loureiro A, Nicole MR. 2008. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology** 72: 29-38.
- Silva MC, Nicole M, Guerra-Guimarães L, Rodrigues Jr CJ. 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistance coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60: 169-183.
- Sohn KH, Lei R, Nemri A, Jones JDG. 2007. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 19: 4077-4090
- Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, Burgis TA, Soanes DM, Stuber K, Ver Loren van Themaat E, Brown JK, Butcher SA, Gurr SJ, Lebrun MH, Ridout CJ, Schulze-Lefert P, Talbot NJ, Ahmadinejad N, Ametz C, Barton GR, Benjdia M, Bidzinski P, Bindschedler LV, Both M, Brewer MT, Cadle-Davidson L, Cadle-Davidson MM, Collemare J, Cramer R, Frenkel O, Godfrey D, Harriman J, Hoede C, King BC, Klages S, Kleemann J, Knoll D, Koti PS, Kreplak J, Lopez-Ruiz FJ, Lu X, Maekawa T, Mahanil S, Micali C, Milgroom MG, Montana G, Noir S, O'Connell RJ, Oberhaensli S, Parlange F, Pedersen C, Quesneville H, Reinhardt R, Rott M, Sacristan S, Schmidt SM, Schon M, Skamnioti P, Sommer H, Stephens A, Takahara H, Thordal-Christensen H, Vigouroux M, Wessling R, Wicker T, Panstruga R. 2010. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. **Science** 330(6010): 1543-1546.
- Stergiopoulos I, de Wit PJ. 2009. Fungal effector proteins. **Annual Review of Phytopathology** 47: 233-263.

- Takken FL, Tameling WI. 2009. To nibble at plant resistance proteins. **Science** 324(5928): 744-746.
- Templeton MD, Rikkerink EHA, Beever R. 1994. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 7: 320-325.
- van Boxtel J, Berthouly M, Carasco C, Dufour M, Eskes A. 1995. Transient expression of β -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. **Plant Cell Reports** 14: 748-752.
- Várzea MPV, Marques DV 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea MPV eds. Durable Resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 53-74.
- Vieira A, Talhinhos P, Loureiro A, Duplessis S, Fernandez D, Silva M. C, Paulo O. S, Azinheira H. G. 2011. Validation of RT-qPCR reference genes for in planta expression studies in *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust. **Fungal Biology** 115:891-901.
- Vieira A, Talhinhos P, Loureiro A, Thürich J, Duplessis S, Fernandez D, Silva MC, Paulo OS, Azinheira HG. 2012. Expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. **European Journal of Plant Pathology** 133: 261-277.
- Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, Saunders DG, Yoshida K, Dong S, Schornack S, Zipfel C, Robatzek S, Hogenhout SA, Kamoun S. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**.
- Zambolim L, Zambolim EM, Vale FXR, Pereira AA, Sakyama NS, Caixeta ET 2005. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. in Brazil - Physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim L, M. ZE, Várzea MPV eds. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa - UFVpp. 75-98.

CONCLUSÕES GERAIS

CAPÍTULO 1: Neste estudo caracterizou-se o secretoma de urediniósporos germinados de *H. vastatrix* por meio das análises de transcritômica e de bioinformática. A anotação de ESTs dos esporos germinados revelou que o secretoma é constituído por enzimas hidrolíticas e por um grande número de proteínas secretadas de função desconhecida. Foram identificados 35 genes que codificam proteínas secretadas com características recentemente descritas para efetores fúngicos. Desses, 22 HvECs tiveram suas regiões genômicas caracterizadas, confirmando as ORFs preditas por bioinformática. A secreção das proteínas de oito genes HvECs selecionados foi confirmada em levedura, e suas análises de expressão revelaram uma expressão dinâmica, possivelmente associada com as transições morfológicas do patógeno que ocorrem durante os estágios iniciais de infecção.

CAPÍTULO 2: A abordagem de sequenciamento massivo de cDNAs sintetizados a partir de RNAs isolados de folhas de cafeeiros infectadas por *H. vastatrix*, em diferentes tempos, durante o processo de infecção, e as predições de bioinformáticas permitiram identificar 62 genes candidatos a efetores de *H. vastatrix*. A análise por qRT-PCR demonstrou que 22 genes HvECs são regulados positivamente durante a interação com o cafeeiro e serão priorizados para estudos funcionais. O protocolo de análise de expressão transiente de genes HvECs em folhas de cafeeiros mediado pelo SST3 de *Psg* foi estabelecido e possibilitou a caracterização do primeiro efector de *H. vastatrix* com atividade de avirulência. A secreção do HvEC-016 foi confirmada pelo sistema YST, fornecendo indícios adicionais da sua secreção por *H. vastatrix* e fortalecendo o seu papel como efector.

Em síntese, este estudo disponibiliza um novo catálogo de genes candidatos a efetores de *H. vastatrix*. Das 97 ORFs completas identificadas que codificam proteínas com características de efetores de fungos filamentosos, 75 (77,3%) são descritas pela primeira vez. As análises por qRT-PCR de 31 HvECs confirmaram que a expressão desses genes, como demonstrado em outros patossistemas, ocorre em ondas sucessivas que pode estar associadas com as mudanças morfológicas do desenvolvimento do fungo durante a interação com o cafeeiro.

ANEXOS

Anexo 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da região genômica dos 22 HvECs expressos em urediniosporos germinados. Esses oligonucleotídeos também foram utilizados para amplificar as ORFs a partir dos clones originais gerados na biblioteca para ensaio de secreção em levedura. Para isso, os oligonucleotídeos Forward foram desenhados manualmente com inserção de sítio para EcoRI imediatamente upstream do códon de iniciação (ATG), acrescidos de três dinucleotídeos GC upstream do sítio de EcoRI. Para os oligonucleotídeos Reverse foi inserido um sítio de NotI na extremidade 3' da ORF, sem o códon de parada, acrescidos de três dinucleotídeos GC downstream ao sítio NotI.

Genes	Oligonucleotídeos Forward	Oligonucleotídeos Reverse	Temperatura de anelamento
HvEC-024	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> GCTTTGGTCGTATTGGCC	GCGCGCGCGGCCGCTTTTCCCCAGGGGATGT	56°C
HvEC-025	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> ATTTTTTCAATGGTTTC	GCGCGCGCGGCCGCAAGTACGGCCACCCCAGC	56°C
HvEC-026	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AATTTTTCAATTGTTTC	GCGCGCGCGGCCGCAAGTACGGCCACCCCAGC	60°C
HvEC-027	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> ATTTCCGAAAAGGCTTTT	GCGCGCGCGGCCGCAATAGCAGGCCAAGAGCC	54°C
HvEC-029	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AGATCTTCTCTGGTATTT	GCGCGCGCGGCCGCATGTGCAATAGGAAGGAC	56°C
HvEC-030	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AAATTCCTCACTCAAGTG	GCGCGCGCGGCCGCAACATAAAATGGGCTGGC	50°C
HvEC-031	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AAGTTATTCTATTACT	GCGCGCGCGGCCGCATAGCATGAGTTTACATT	60°C
HvEC-032	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> TCGGTCTCTTCCCCACA	GCGCGCGCGGCCGCATTTCGATGCCGGGGGAAG	50°C
HvEC-033	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AGATATTTTAGTTGTGG	GCGCGCGCGGCCGCACCCTGAGGAAGGAAGG	60°C
HvEC-034	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AAATTTCTATTACT	GCGCGCGCGGCCGCATAGCACGAATTTACATT	56°C
HvEC-035	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> TTTTGCGGTCTATAAAT	GCGCGCGCGGCCGCAGATTTGCTTAAACTTG	60°C
HvEC-036	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AGATTTTCATTATATTCT	GCGCGCGCGGCCGCAGTTTGTGATCCAGTATG	62°C
HvEC-037	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AAGTTGCTCTTATCGTTT	GCGCGCGCGGCCGCATGATCTTTTGGCAA	56°C
HvEC-038	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AGGATGCATTTAATAGTC	GCGCGCGCGGCCGCTATACATGTTATCACATA	55°C
HvEC-039	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> CGGTTTACCTTGTGTC	GCGCGCGCGGCCGCAAATTTTTTCGTGGGT	55°C
HvEC-040	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AATTTTGATCTTCTTCTT	GCGCGCGCGGCCGCTTTAGCGAGTGTGAAA	56°C
HvEC-041	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> CAGTTGCTTCTTTGGTC	GCGCGCGCGGCCGCATTTCTACAGAACTCG	56°C
HvEC-042	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> CTTTCTTTCAATTGAAT	GCGCGCGCGGCCGCATTGCCAAAAGCTTCTT	56°C
HvEC-043	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> AACTTCATCGTACTTTGT	GCGCGCGCGGCCGCACCAAATTCGACGCCGAG	61°C
HvEC-045	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> TTACaGGTTACTGCGTTT	GCGCGCGCGGCCGCTCTGTCCACGTCTCTTG	60°C
HvEC-046	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> CATTTTCACTTGCTTCC	GCGCGCGCGGCCGCAACTGATAAACCAGATT	56°C
HvEC-047	GCGCGCGAATTC <u>ATG</u> TTGGCTTCGGACTTTATC	GCGCGCGCGGCCGCTAAAAAGCCATACAACGA	56°C

Anexo 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises de PCR em tempo real (qRT-PCR) dos oito genes HvECs que codificam proteínas cujas secreções foram confirmadas em levedura.

Genes	Oligonucleotídeos Forward	Oligonucleotídeos Reverse	Comprimento do amplicon (pb)	Temperatura de anelamento
GADPH ^a	ACTTGGACAGCTACGAC	CCATACCAGTGAGCTTCC	280	67°C
Cyt III ^b	AGTAGATATGAGTCCCTGACC	CACCTTCAGCACTTACATCC	173	60°C
β -tub ^c	CTGGTGCCGGAAATAATTGG	TCAAGAGAATCACAGCCCTCG	95	60°C
HvEC-025	TCTGCCGCTCCAATCATTG	GATATCCATAAAGAAACGTTGACG	76	60°C
HvEC-027	CACCAAAATATTCTCCTAATCCTTACC	CATCCACCTTGACTTCCAC	140	60°C
HvEC-030	AGCGGACCTTATAAACTCAGG	GCTGCACCAGGACAATAGAT	140	60°C
HvEC-034	CTTTTATCGCTCGTGTGGC	CAATACCACAATTTGCTCCCG	142	60°C
HvEC-035	TTTTCCCATGCTGCTCTACAAC	GAATAGGCCCCCAAATTGGT	149	60°C
HvEC-041	CGGTCCAGGAAAATCGATAAGG	TGAGGGCTGGGTAATCTTTG	107	60°C
HvEC-042	TCTAGATGAAGAGCGAAATAAAGGG	CCTTCTCACGGCTGGTAAATG	113	60°C
HvEC-043	TTGGCGACGGAAATAAAGTTTC	AGCTTTTGACTCATAGGATCTGG	88	65°C

Genes endógenos:

^a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;

^b citocromo c oxidase subunidade III; e

^c β -tubulina.

Anexo 3: Proteínas secretadas preditas a partir de ESTs obtidos de urediniósporos germinados de *H. vastatrix* exibindo similaridade (BLASTP, $E_{\text{value}} < 10^{-3}$) com sequências protéicas depositadas no banco de dados de proteínas não redundantes do Genbank. As proteínas foram listadas de acordo com a classificação: proteínas secretadas, proteínas hipotéticas, hidrolases e outros.

Contíguos/Singletos	N° ESTs	Acesso	Descrição	Espécie	E-value
Proteínas secretadas					
Contig5F3-1_283*	86	EGG01681	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	6,00E-19
Contig32F1-1_179	4	EGG01164	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	5,00E-24
Contig110F1-1_162	4	EGG03708	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	4,00E-24
Contig134F1-1_175	19	EGG07491	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	4,00E-31
Contig187F2-1_167	8	EGG01221	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	2,00E-24
Contig219F3-2_187	48	EGF97723	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	1,00E-48
Contig232F2-1_472	112	EGG10455	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	1,00E-158
Contig306F3-1_139	5	EGG10628	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	6,00E-18
Contig423F3-1_177*	2	EGG10628	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	2,00E-17
Contig441F1-1_123*	2	EGF99535	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	1,00E-07
Contig510F2-1_174	3	EGG12953	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	3,00E-09
Contig534F2-1_357*	38	EGG06054	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	2,00E-28
Contig577F3-1_155*	9	EGG12953	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	9,00E-14
Contig603F2-1_163*	3	EGG07858	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	3,00E-43
Contig652F3-1_144	16	EGG05302	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	3,00E-20
Contig653F2-1_143	8	EGG10455	proteína secretada	<i>M. larici-populina</i>	5,00E-18
Proteínas hipotéticas					
Contig24F1-1_162	2	EGU81556	proteína hipotética	<i>Fusarium oxysporum</i>	7,00E-15
Contig81F3-1_131*	3	XP_003307688	proteína hipotética	<i>P. graminis f. sp. tritici</i>	2,00E-48
Contig82F3-1_374*	119	EGF97652	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	1,00E-126
Contig106F1-1_190	3	EGG00196	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	5,00E-15
Contig126F3-1_192*	12	EGG05479	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	5,00E-65
Contig142F2-1_147*	2	EGG00478	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	1,00E-06
Contig174F3-1_329*	54	XP_444847	proteína hipotética	<i>Candida glabrata</i>	4,00E-08
Contig221F2-1_94*	4	EGG00493	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	3,00E-11
Contig252F3-1_192	4	XP_003336129	proteína hipotética	<i>P. graminis f. sp. tritici</i>	5,00E-38
Contig256F3-1_240	9	EGG08013	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	3,00E-33
Contig286F1-2_154*	11	EGG07102	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	2,00E-46
Contig334F2-1_169*	14	EGG04421	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	1,00E-37
Contig346F1-2_129*	2	EGG01916	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	4,00E-07
Contig388F1-1_165*	9	EGG08337	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	2,00E-28
Contig419F3-1_291	10	EFP80510	proteína hipotética	<i>P. graminis f. sp. tritici</i>	8,00E-55
Contig460F3-2_154	32	EFP91780	proteína hipotética	<i>P. graminis f. sp. tritici</i>	7,00E-45
Contig515F2-1_133	10	AEM55579	proteína hipotética	<i>P. striiformis f. sp. tritici</i>	7,00E-12
Contig546F1-1_325*	14	XP_003327682	proteína hipotética	<i>P. graminis f. sp. tritici</i>	6,00E-10
Contig573F2-1_174	13	XP_003326776	proteína hipotética	<i>P. graminis f. sp. tritici</i>	3,00E-40
Contig586F3-1_162	11	EGG04905	proteína hipotética	<i>M. larici-populina</i>	8,00E-28

Anexo 3: Continuação

Contíguos/Singletos	Nº ESTs	Acesso	Descrição	Espécie	E-value
Contig612F3-1_133*	4	EGG04933	proteína hipotética	M. larici-populina	2,00E-31
Contig625F3-1_160	2	EGG06204	proteína hipotética	M. larici-populina	1,00E-48
HEVA_03_002_A06*	1	EFP86109	proteína hipotética	P. graminis f. sp. tritici	5,00E-18
HEVA_01_014_C11*	1	XP_003319715	proteína hipotética	P. graminis f. sp. tritici	1,00E-25
HEVA_01_002_H09*	1	XP_003322054	proteína hipotética	P. graminis f. sp. tritici	3,00E-07
HEVA_02_039_G06	1	EGF97652	proteína hipotética	M. larici-populina	3,00E-40
HEVA_02_039_B08	1	EGG05929	proteína hipotética	M. larici-populina	3,00E-38
HEVA_02_016_C03	1	EGG00938	proteína hipotética	M. larici-populina	2,00E-28
HEVA_02_015_H03	1	EGG02794	proteína hipotética	M. larici-populina	2,00E-36
HEVA_02_040_C12*	1	XP_003325269	proteína hipotética	P. graminis f. sp. tritici	6,00E-43
HEVA_01_004_B02	1	XP_003338240	proteína hipotética	P. graminis f. sp. tritici	3,00E-15
HEVA_01_014_A05	1	EGG00493	proteína hipotética	M. larici-populina	5,00E-28
Hidrolases					
Contig27F1-1_139	8	XP_003329836	quitina deacetilase	P. graminis f. sp. tritici	2,00E-19
Contig149F3-1_187*	23	EGG09306	glicosídeo hidrolase família 16	M. larici-populina	2,00E-26
Contig165F3-1_200	12	EGG03572	lipase	M. larici-populina	5,00E-31
Contig173F1-8_117*	55	EGG05341	glicosídeo hidrolase família 26	M. larici-populina	2,00E-09
Contig175F1-1_196	4	EGG08669	glicosídeo hidrolase família 71	M. larici-populina	2,00E-47
Contig218F3-1_184	24	XP_003320537	vacuolar protease A	P. graminis f. sp. tritici	1,00E-56
Contig228F3-1_161	2	EGG02629	glicosídeo hidrolase família 63	M. larici-populina	5,00E-44
Contig297F1-2_169	10	EGG05796	carboidrato esterase família 4	M. larici-populina	2,00E-34
Contig310F3-1_105*	3	EGG11607	glicosídeo hidrolase família 5	M. larici-populina	2,00E-22
Contig324F1-1_139	4	EGG11838	glicosídeo hidrolase família 5	M. larici-populina	3,00E-34
Contig335F3-2_165*	5	EGG07771	carboxipeptidase S1	M. larici-populina	4,00E-38
Contig446F2-1_165	6	EGG03026	carboidrato esterase família 4	M. larici-populina	9,00E-41
Contig465F2-1_287	21	EGG05863	glicosídeo hidrolase família 76	M. larici-populina	1,00E-104
Contig480F2-1_87*	15	EGG04425	subtilisina protease	M. larici-populina	2,00E-07
Contig484F1-1_126	2	EGG12999	glicosídeo hidrolase família 27	M. larici-populina	8,00E-21
Contig506F2-1_158	86	EGG12275	glicosídeo hidrolase família 16	M. larici-populina	1,00E-08
Contig514F2-1_385*	27	EGG07014	glicosídeo hidrolase família 17	M. larici-populina	1,00E-136
Contig568F3-1_138	4	XP_003329836	quitina deacetilase	P. graminis f. sp. tritici	2,00E-21
Contig582F3-1_161	9	EGG07183	glicosídeo hidrolase família 16	M. larici-populina	1,00E-22
Contig588F3-1_154	6	EGO03548	glicosídeo hidrolase família 16	Serpula lacrymans	3,00E-07
Contig599F1-1_130	12	EGG00134	glicosídeo hidrolase família 23	M. larici-populina	6,00E-11
Contig607F1-1_168	26	EGG08525	glicosídeo hidrolase família 61	M. larici-populina	5,00E-33
Contig629F3-2_114*	2	EGG05960	carboidrato esterase família 4	M. larici-populina	1,00E-21
HEVA_02_044_B05	1	EGG09040	glicosídeo hidrolase família 18	M. larici-populina	6,00E-12
HEVA_03_010_B03	1	XP_003329473	fosfolipase	P. graminis f. sp. tritici	3,00E-12
HEVA_02_043_F10	1	EGG03572	lipase	M. larici-populina	4,00E-33
HEVA_01_019_D05	1	EGG12175	esterase/lipase	M. larici-populina	3,00E-17
HEVA_03_006_F05	1	XP_003036647	glicosídeo hidrolase família 9	Schizophyllum commune	2,00E-47
HEVA_02_040_F01*	1	EGG02960	α -amilase	M. larici-populina	4,00E-31

Anexo 3: Continuação

Contíguos/Singletos	N ^o ESTs	Acesso	Descrição	Espécie	E-value
Outros					
Contig78F3-3_78	2	XP_003322721	transportador de ornitina mitocondrial	<i>P. graminis</i> f. sp. tritici	1,00E-24
Contig85F1-1_165	2	XP_003332752	glioxal oxidase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-39
Contig294F3-1_219*	97	XP_002373861	proteína extracelular rica em serina	<i>Aspergillus flavus</i>	2,00E-17
Contig368F3-2_259*	40	EGG05480	Mn-superoxido dismutase	<i>M. larici-populina</i>	3,00E-38
Contig398F1-1_152	8	EGF98975	Cu/Zn-superoxido dismutase	<i>M. larici-populina</i>	3,00E-33
Contig415F3-1_181*	6	EGG10955	proteína vacuolar	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-53
Contig440F1-1_157	2	CBQ71561	proteína SAR1	<i>Sporisorium reilianum</i>	5,00E-70
Contig544F3-1_324*	17	XP_003328465	glioxal oxidase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-111
Contig624F3-1_130	3	XP_003321138	GPI-anchor transamidase	<i>P. graminis</i> f. sp. tritici	9,00E-51
HEVA_03_007_B03	1	XP_002144203	GPI anchored serine threonine rich protein	<i>Penicillium marneffeii</i>	8,00E-21
HEVA_03_001_F10	1	XP_001214787	proteína dissulfeto isomerase	<i>Aspergillus terreus</i>	2,00E-22
HEVA_02_041_F04*	1	XP_003327699	endoplasmic oxidoreductin-1	<i>P. graminis</i> f. sp. tritici	6,00E-18
HEVA_02_042_H05	1	XP_001214787	proteína dissulfeto isomerase	<i>Aspergillus terreus</i>	1,00E-27
HEVA_02_015_H10*	1	XP_003323665	DnaJ and TPR domain-containing protein	<i>P. graminis</i> f. sp. tritici	9,00E-07
HEVA_02_009_A06	1	CCD49235	Glicosacarídeo oxidase	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	1,00E-04
HEVA_02_031_B06*	1	EFP80232	Large subunit ribossomal protein LPO	<i>P. graminis</i> f. sp. tritici	6,00E-19
HEVA_01_019_H03	1	XP_003322522	proteína dissulfeto isomerase	<i>P. graminis</i> f. sp. tritici	2,00E-42
HEVA_02_033_A04	1	XP_003328496	Síntese de biotina	<i>P. graminis</i> f. sp. tritici	1,00E-17
HEVA_01_013_C12	1	XP_003320108	50S ribossomal protein L3	<i>P. graminis</i> f. sp. tritici	5,00E-28

*Sequências que apresentam ORFs completas.

Anexo 4: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no ensaio de expressão dos 62 genes HvECs e na clonagem do gene HvEC-016 para os ensaios do sistema pEDV, YST e análise da estrutura genômica.

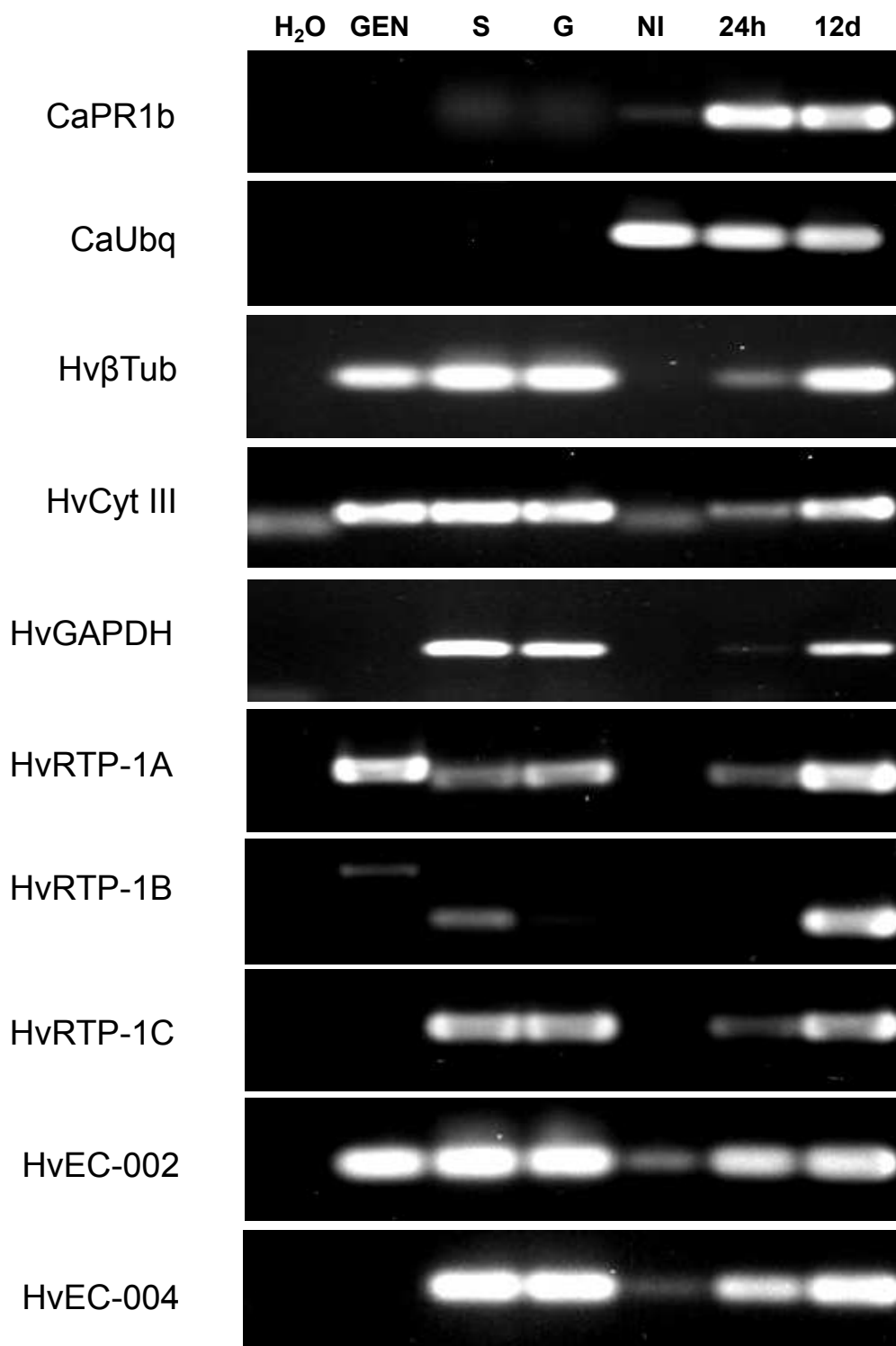
Genes	Oligonucleotídeos Forward	Oligonucleotídeos Reverse	Amplicon (pb)	TM*
PCR em temp real				
HvRTP-01A	CAGGAAGAGGACTTGGGAATC	GTTTTACAAGGCGCTGTTGG	142	60°C
HvRTP-01B	AAAGCGAGAAATGTGATAAAGACG	AGGAGATTGAAATGTACCTGGC	125	60°C
HvRTP-01C	ACCCAATGTTATCCAGGTGG	AGCGCATTTGTTATACGTCAAG	170	60°C
HvEC-002	AAGGCGCCGATAAAAAATGG	CCACCAAATAGGCCAGTATCGA	100	60°C
HvEC-004AB	GCTGGCTCTGTTGCTTTC	GATGGTTGCTTTGGATGACG	116	60°C
HvEC-005	TGCGACACCATTACTTCCAG	TTCATTCCCGACTCCACATAC	120	60°C
HvEC-006	TCGTCCAAATTTCTCTAGCCG	GAAGTTAATGAAGCCCAAACACC	100	60°C
HvEC-007	TGCATGCTCATATTCTCGAG	TTTTACCTAGATCGTGCTCCAC	78	60°C
HvEC-008	AAAAGCCAACCACTAATCTTGC	GGCGTTAACCCTTCAAATGAT	149	60°C
HvEC-009	CCAGTACAATTAGCCGTCGAAG	CTCCCCTCGTTACCAAATCG	88	60°C
HvEC-016	CCATTAATTTGTAGCGGCC	GTCGAGATCTGAGTCTGAATGC	88	60°C
HvEC-020	TGGAGCACCGTCTTGATTAAG	TTCTTCTGGTGGTTTGGGTAG	145	60°C
HvEC-021	CAACCAAAAAGAAATGTGTTAACGC	GCTGCGAAACCATTTCAC	118	60°C
HvEC-022	CTTTTGGCATTCTCTAGCGTTG	CATGTGTTGCAAGCAGGTTG	137	60°C
HvEC-048	CTTTTGGCATTCTCTAGCGTTG	CATGTGTTGCAAGCAGGTTG	129	60°C
HvEC-049	CACGCTAGACTACAGGACAATG	CGGCGTTGCATTTGACATTC	100	60°C
HvEC-050	CAATTTGCAACTACGCCAC	AGATATTTGCGACCGTCACAG	134	60°C
HvEC-051	CCCACAATCAGGATCTCAAGG	CAGGAGTGACAGAGGTAGTTG	146	60°C
HvEC-052	AGAGGCAGTTGGATCATGTG	GTGATGGATTGAAGTTGGCG	96	60°C
HvEC-053	GTCTTTGCCTTTTACAACC	GACGGTCGCATTTGTTCAC	120	60°C
HvEC-054	TGACAAACATCACTGGTACGG	GTTTGAGGCTGGAGAGGTG	146	60°C
HvEC-055	TGATAATCGTTGTGGTAGCCG	CAGTTGAGATGTCGTTTGGC	80	60°C
HvEC-056	CTAATGAAGCGGAGGTCTTAGAC	TGGATGTGGTATTGTACTGGG	132	60°C
HvEC-057	CGTGAGCTTAGCATGTTTATGG	GTTGTGTTTGGCTGTCCTTC	83	60°C
HvEC-058	GGCAGACAATTTCCACTCAAC	CAAAACCAGTACAAACGCCG	121	60°C
HvEC-059	TGTCTTCTTTGTGATAGGCC	ATCAGAGGCATCGGTGTAAC	145	60°C
HvEC-060	CTTTTGGCATTCTCTAGCGTTG	CATGTGTTGCAAGCAGGTTG	143	60°C
HvEC-061	TTCCCAACATACGCTCTGC	TCGGGATAAAAGCATCGGTAC	133	60°C
HvEC-062	GCGCAACTCCAAATGAAGG	CCGAATCCTTTTCTCTCCTG	84	60°C
HvEC-063	GACAGTAAAGGCGATAAACAAGC	CCCAAGGAACGACACATCTAG	139	60°C
HvEC-064	CAAATGTGATGCTCGAACTGC	TTCCATCGCTACACATACCC	132	60°C
HvEC-065	AGGCTTCTGGTCATTCTGTTG	GGGCTTGTGTTGAGATTATTGTAC	129	60°C
HvEC-066	CTCTCCCTTCAAGGTTTCGATG	GTTGAAAACCTTTCACATGGTG	146	60°C
HvEC-067	CAATCCTCTTCTGGACCTGG	AGAAAAGAGCGTACAACCTGAGG	138	60°C
HvEC-068	GTTAATGTGAGGCGTTTGACC	TGACCTTGATGTGTCGGTTAAG	148	60°C
HvEC-069	CGATCTGGAAACAATGTCAGC	CGCAAGTCCCCTTCTTAAATG	120	60°C
HvEC-070	TGGTGTGGTACTGGTGTG	TCAGAGAACCCCAATGTGC	144	60°C
HvEC-071	AAACTATAACGAATCTCCCCAGG	CGATCAGGCAACATGACAAC	87	60°C

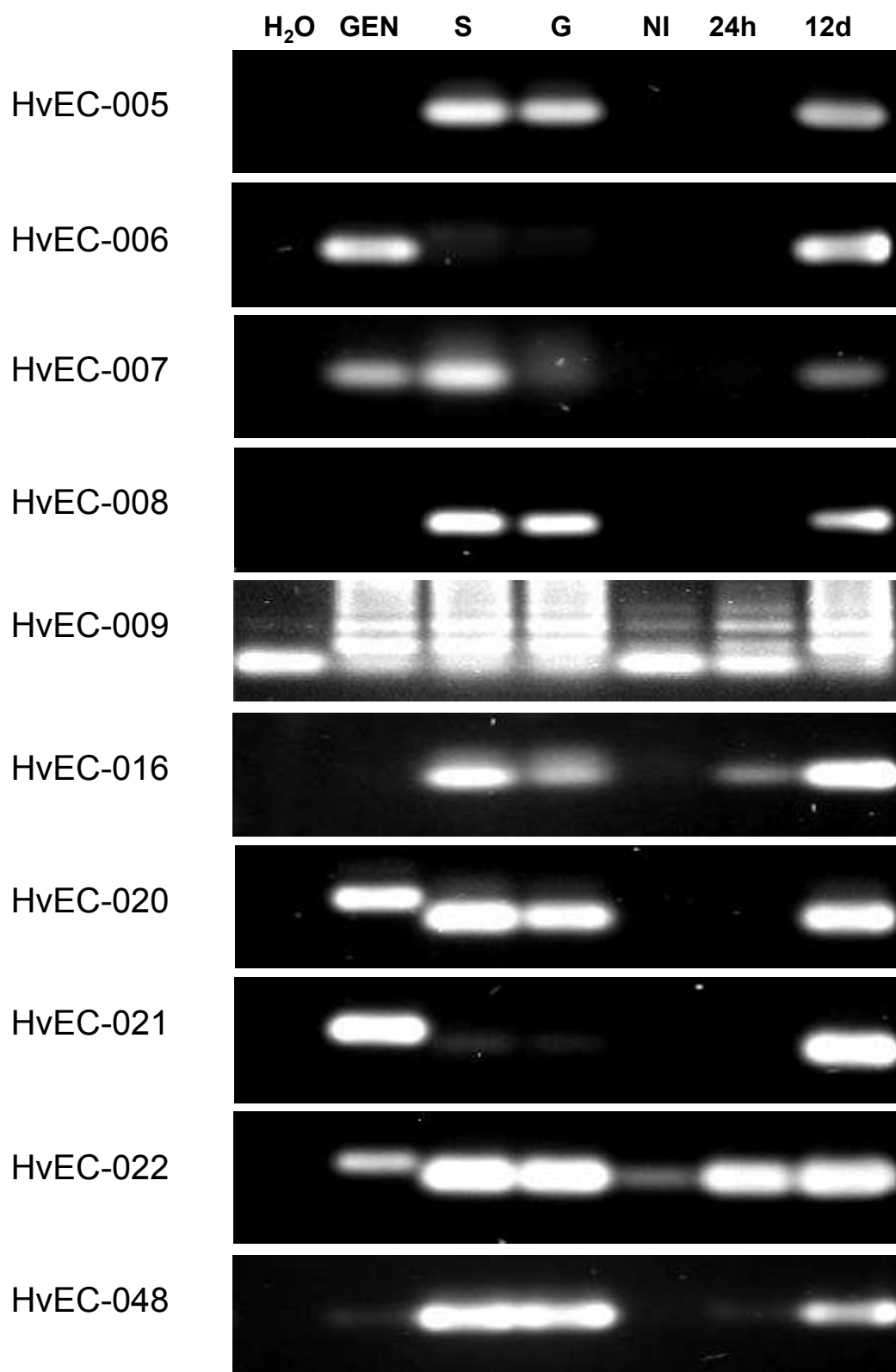
Anexo 4: Continuação

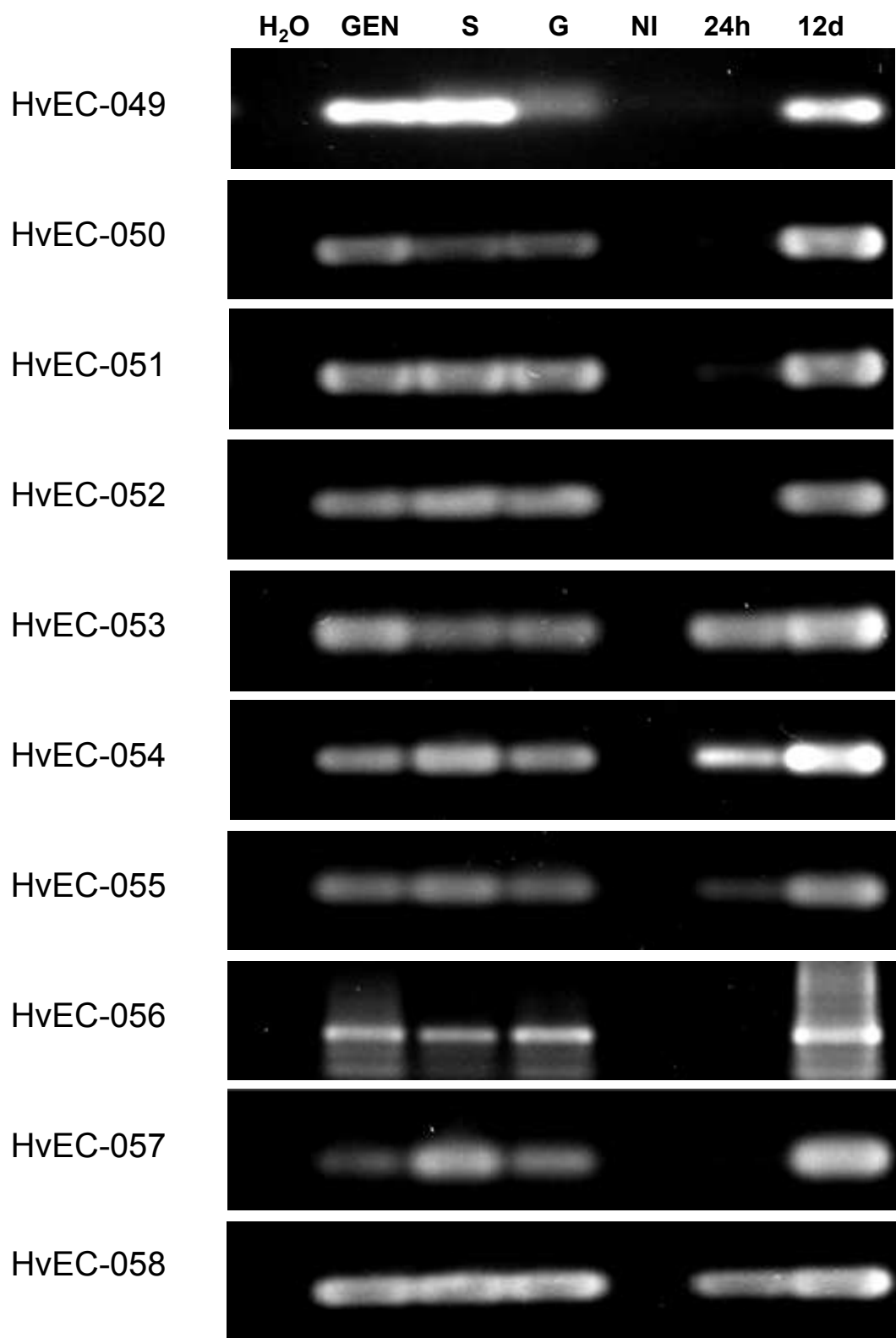
HvEC-072	CATTAATACATGCCAGCCCAG	TTTGAGGTCATGTCAGTCCAG	129	60°C
HvEC-074	TGAACATACACATAATAAGCCTTCTAAC	CGGACTTTGATCATTAGTCGTTG	130	60°C
HvEC-075	TGATAGCTTGCCTTGTCTG	CCGTGAAATCCATCAAATCCG	129	60°C
HvEC-077	ACCTCTTGCCATAATCTTACC	GGAAGTAAAGCCGAGAGTGG	150	60°C
HvEC-078	CTCGTGGATCTCATTGTCAGG	ACTTTGGCACTCTCGACTTG	80	60°C
HvEC-079	AGTGGAGTCCTTCAAAGTCTTG	CAGGAATGAGGGCGGTG	80	60°C
HvEC-080	CTTTTGGCATTCTCTAGCGTTG	CATGTGTTGCAAGCAGGTTG	143	60°C
HvEC-081	GAAGATTTCCACCGTGTATGTG	CTTTCGTGCAAAAAGTCATCGG	113	60°C
HvEC-083	CTCTCCCTTCAAGGTTTCGATG	GTTGAAAACCTTTCACATGGTG	146	60°C
HvEC-084	AAGTGCATTCCAGAAAGTTGC	ACCTTCATCCCTTTGCCAC	103	60°C
HvEC-085	CTTCACAATTTTGGCGGATGG	GGGAAGGGATTTGAGGATAGG	79	60°C
HvEC-086	GTCTCGTCTTTGTTCCAATGC	GTTGTGATAAGGTTTGCAGCC	114	60°C
HvEC-087	ATCTTGGGCGCAGATCTTAG	CTGATGCGTCTATTCTCCAC	118	60°C
HvEC-089	TCTTTCCCGAAACGACTG	AATGCGATGGACCAGTCTG	135	60°C
HvEC-090	GATTTTGTAGCCGTCATCGTG	TTGTAGCAACCACTGTGTCC	72	60°C
HvEC-092	TCCACCTTCATGTAAACCG	GGCAGGAAGTGTGCGTAAATAC	110	60°C
HvEC-094	TTCTGCTCCCTTACACGATTG	ATTCCCATTTCCAGGAGACG	109	60°C
HvEC-095	TCCGATTGTATGTTGAGGACG	AGTGTCTCCTTAAATGCCGTG	97	60°C
HvEC-096	GGATATGTTTCAGCTCTCAGGG	CGACATATAATCTGATTGAGTTACCG	136	60°C
HvEC-099	ATCAGTTGCTCCCATCAAGG	ACCTGAACCGAATTACCAGC	131	60°C
HvEC-101	CATCTTTCTATAGGCCACCCG	GATTTCCCTTTTGTTCATTCCCC	147	60°C
HvEC-102	CTCAGTGTTCAGACTCAACCC	CCTCCAGTTAGACTAATACATGCTG	122	60°C
HvEC-104	GTTCCGGTCCAAATTTACGCTG	ACGGATGGTCTTGGCTAAATG	72	60°C
HvEC-105	GAGCATTGCAACTCATGTGAG	AAGGGTAGTCTGACGAGTAGG	72	60°C
HvEC-109	GGCAGACAATTTCCACTCAAC	CAAAACCAGTACAAACGCCG	121	60°C
HvEC-110	CGCCCTTAATGCTCTTTTCTG	GGAATTAGCTAGGTGATCCGTG	109	60°C
Sistema EDV				
HvEV-EDV-016	CACCCAAGACGCAACGGTGATCGC	CTAAATATTTATACCAATACCAAT	606	56°C
Sistema YST e genômico				
HvEV-YST-016F	GCGCGGAATTCATGTTGGCCTTACATTCTTC		1.014	60°C
HvEV-YST-016R	GCGCGCGCGCCGCGAATTTATACCAATACC			

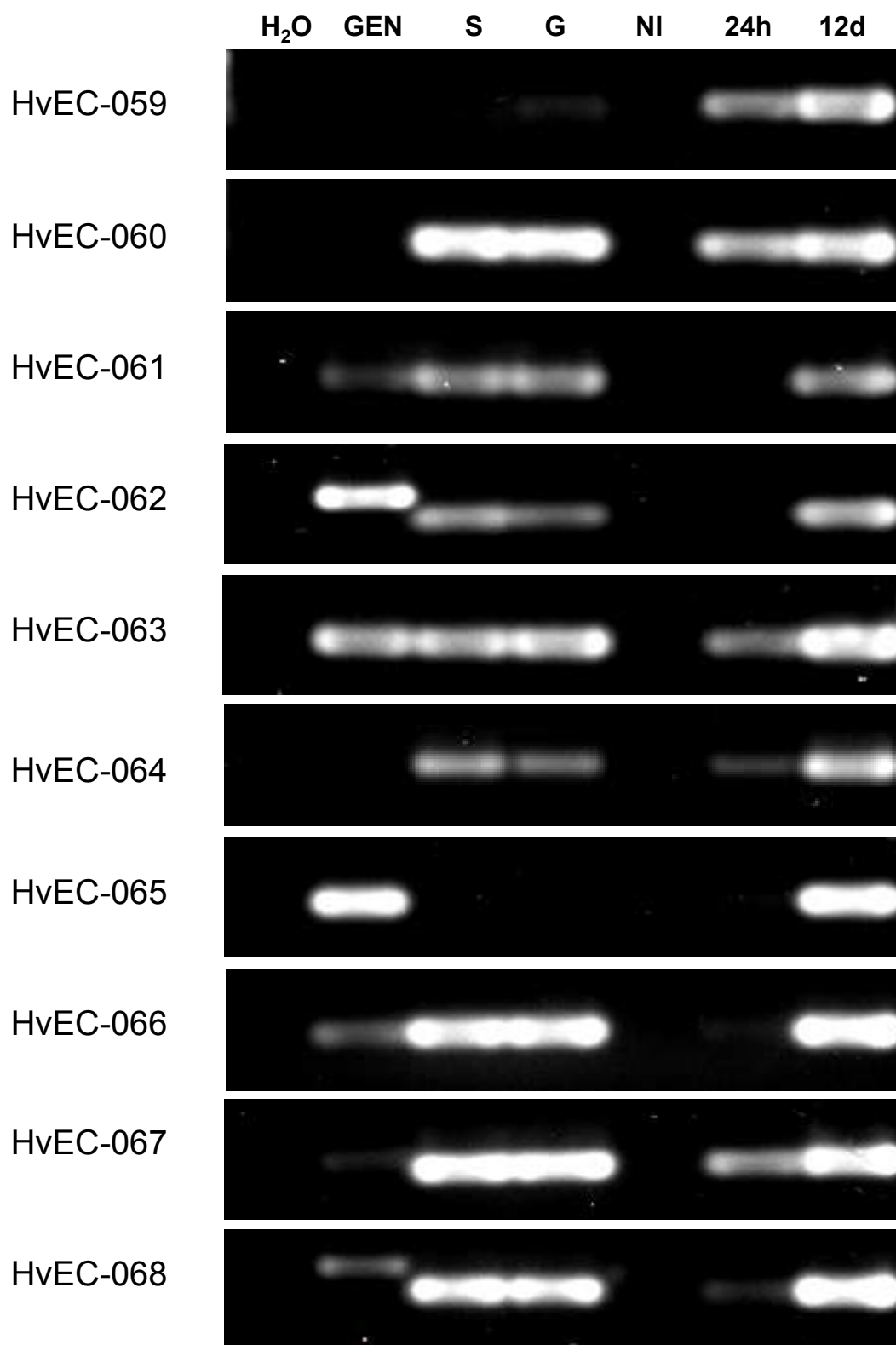
* Temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

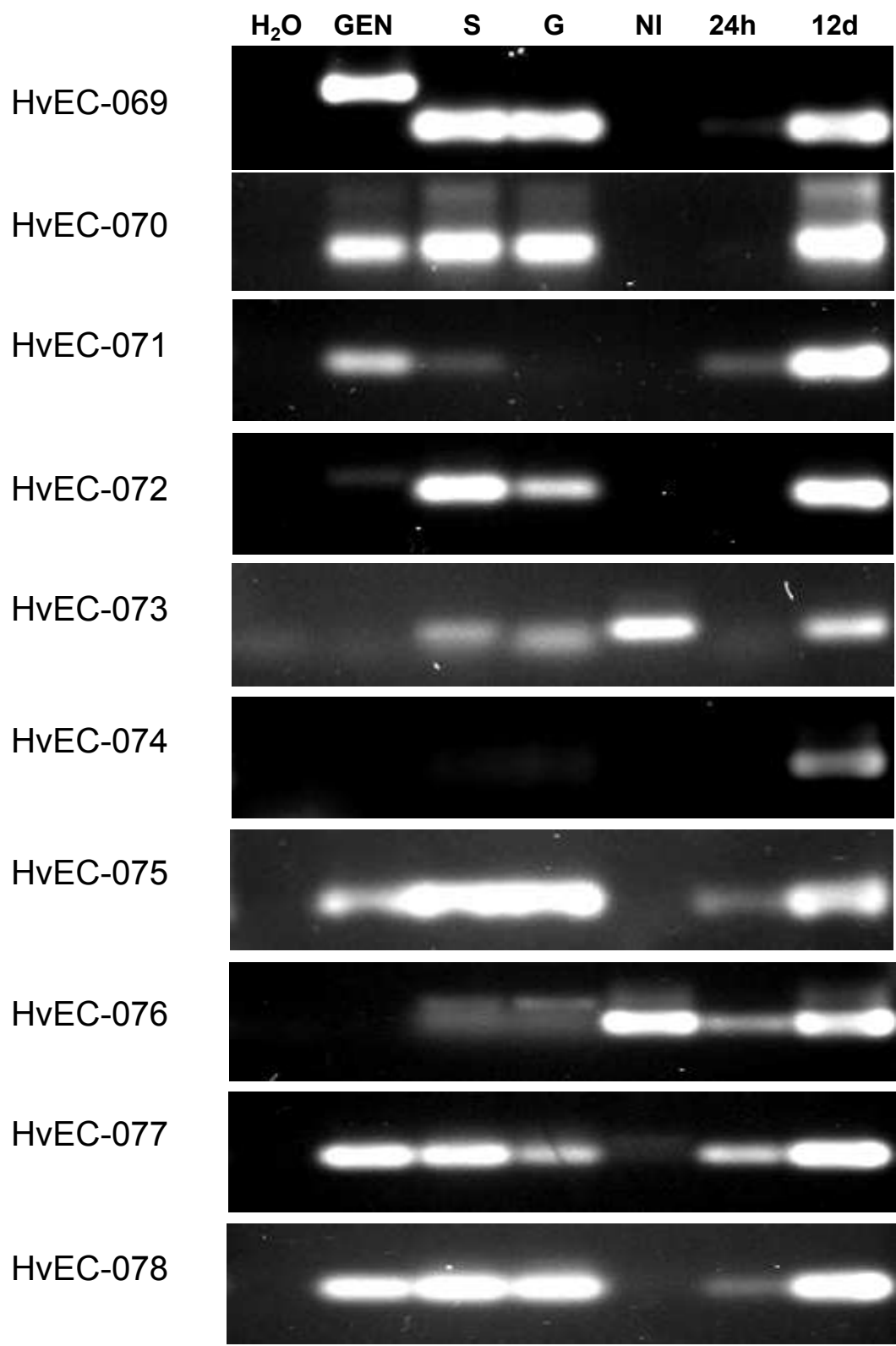
Anexo 5: A origem fúngica dos genes selecionados no Secretoma No hit foi confirmada por PCR, usando como template DNA genômico de *H. vastatrix* (GEN), e por RT-PCR, usando como template cDNA de urediniósporos dormentes (S), urediniósporos germinados (G), planta não inoculada (NI), planta inoculada 24 horas após a inoculação (24h) e planta inoculada 12 dias após a inoculação (12d). Como controle nas reações de PCR foi utilizada água MilliQ estéril (H₂O). Dos 75 genes selecionados como putativos efetores de *H. vastatrix* (HvECs), 13 apresentaram amplicons em plantas não inoculadas e foram considerados como genes de café não anotados (HvEC-73, HvEC-76, HvEC-82, HvEC-88, HvEC-91, HvEC-93, HvEC-97, HvEC-98, HvEC-100, HvEC-103, HvEC-106, HvEC-107 e HvEC-108). Com base no padrão de expressão foram selecionados 23 genes expressos exclusivamente, ou que apresentaram maior intensidade do amplicon, nos estágios de infecção in planta (HvEC-006, HvEC-016, HvEC-021, HvEC-050, HvEC-053, HvEC-054, HvEC-056, HvEC-057, HvEC-059, HvEC-062, HvEC-064, HvEC-065, HvEC-071, HvEC-074, HvEC-081, HvEC-084, HvEC-086, HvEC-087, HvEC-094, HvEC-101, HvEC-104, HvEC-105, HvEC-110). Em café verificou-se o padrão de expressão do gene relacionado com patogênese (CaPR1b) e da ubiquitina (CaUbq). Em *H. vastatrix* verificou-se a especificidade dos genes endógenos da β -tubulina (*Hv β Tub*), citocromo c oxidase subunidade III (HvCytIII) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (HvGAPDH).

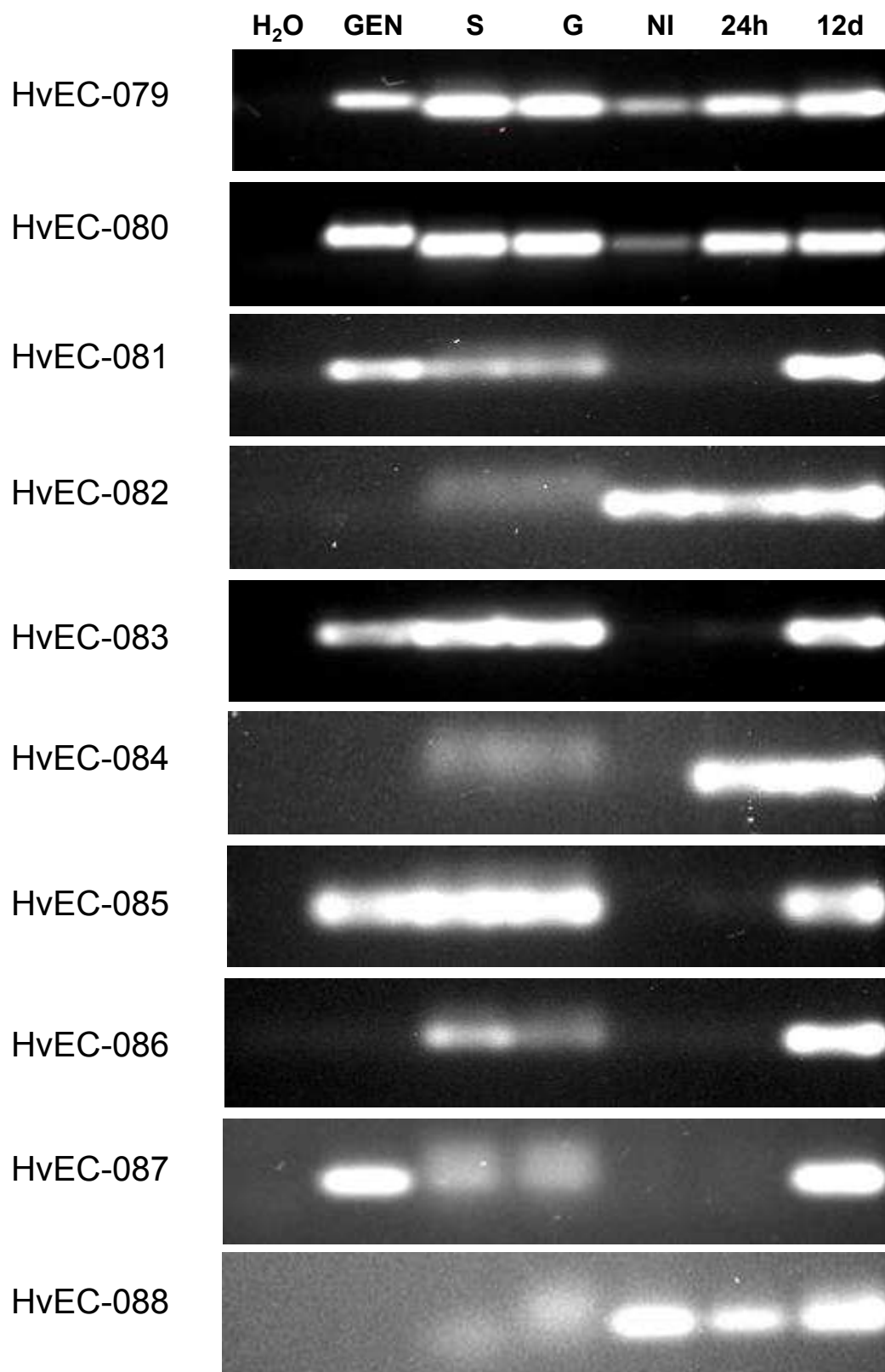


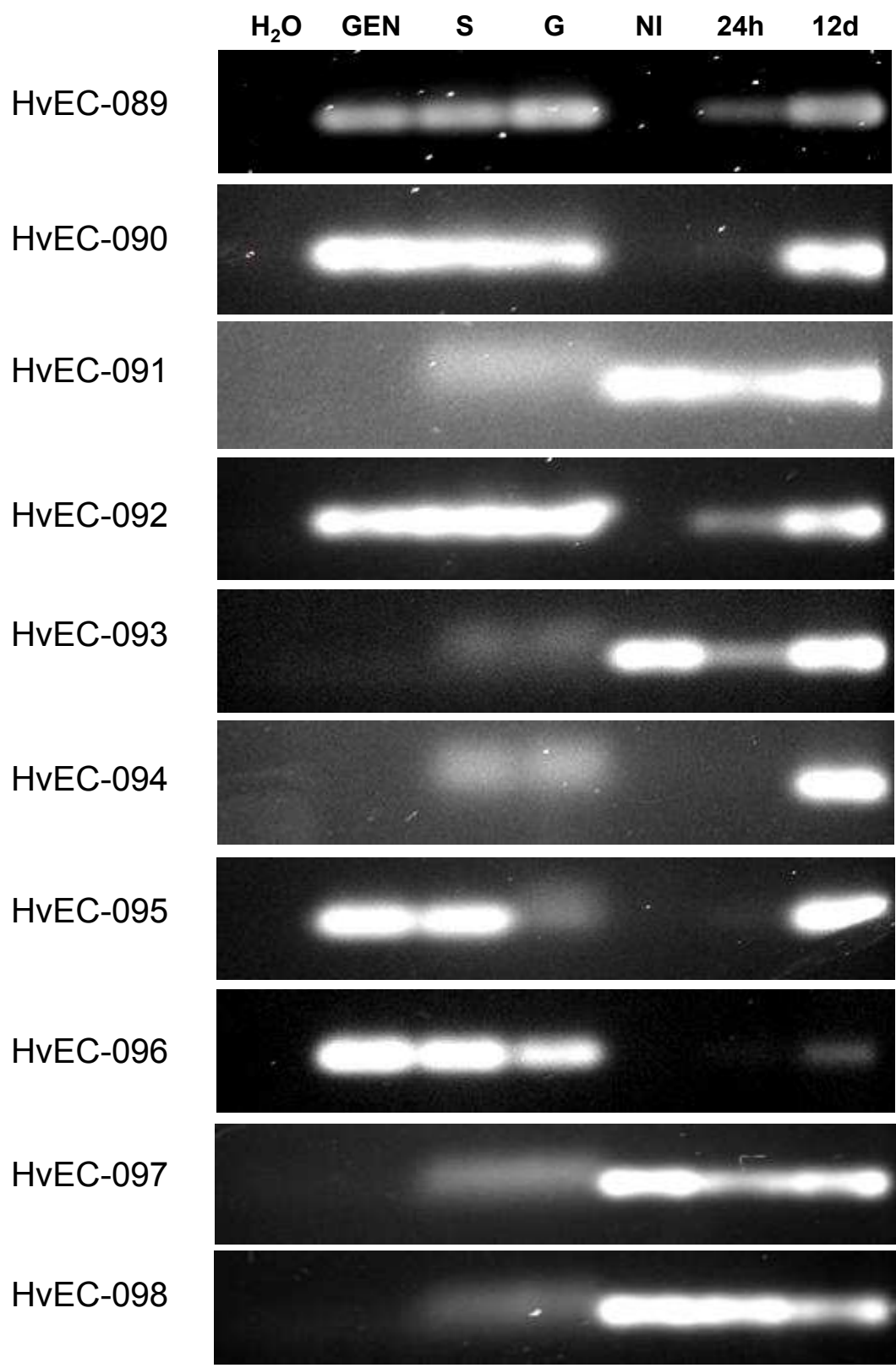


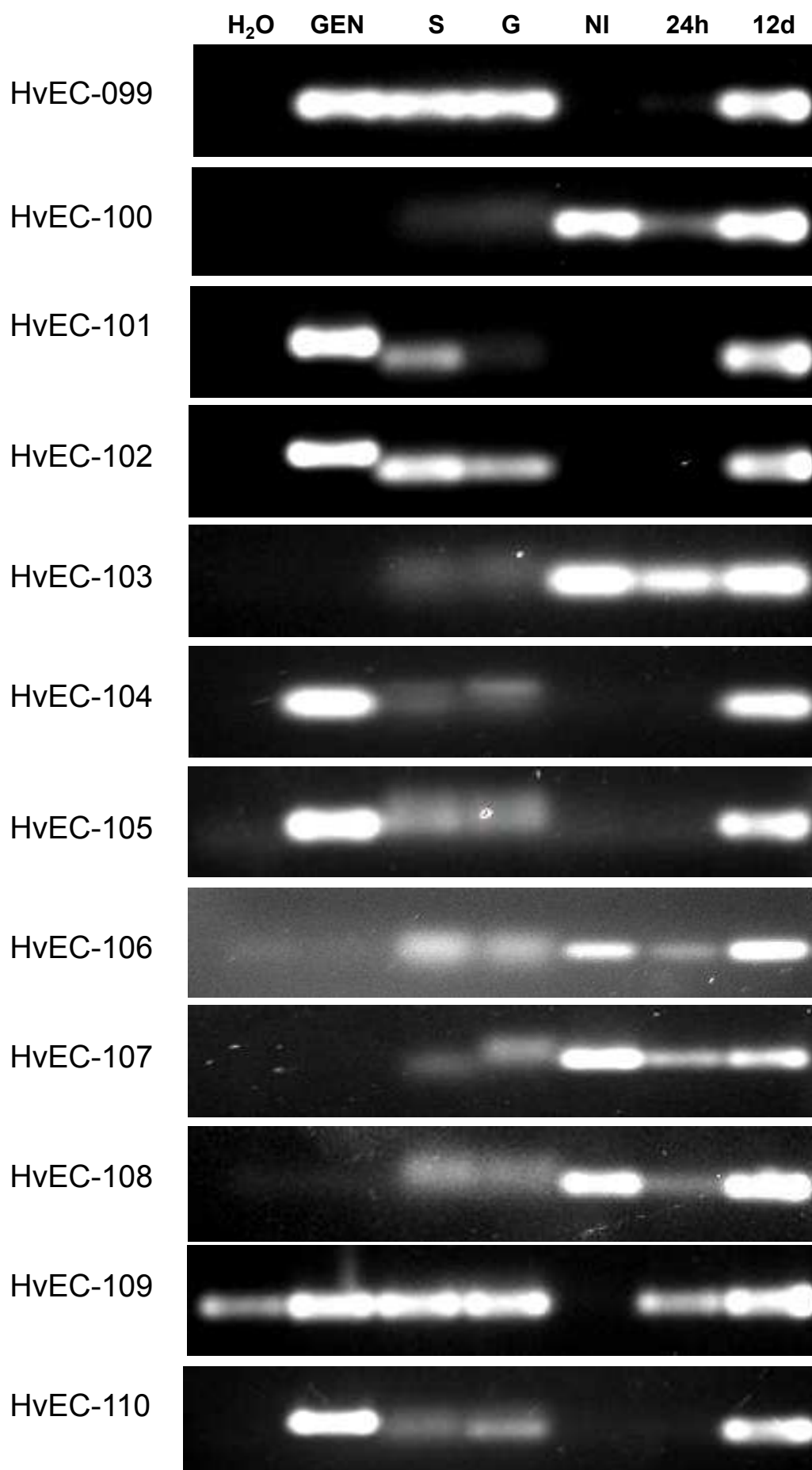












Anexo 6: Alinhamento das sequências de nucleotídeos entre a região codificadora (cDNA) e o DNA genômico do gene HvEC-016 por meio do programa SIM4.

```

seq1 = cDNA-HvEC-016, 678 bp
seq2 = GEN-HvEC-016 (GEN-HvEC-016), 1014 bp

>cDNA-HvEC-016      (678 nucleotides)
>GEN-HvEC-016      (1014 nucleotides)

1-43  (1-43)   100% ->
44-68 (105-129) 100% ->
69-279 (194-404) 100% ->
280-376 (510-606) 96% ->
377-678 (700-1000) 97%

      0      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      1 ATGTTGGCCTCTACATTCCTTCTTCATTTCTTTGCTCTATGTA
      |||
      1 ATGTTGGCCTCTACATTCCTTCTTCATTTCTTTGCTCTATGTA...C

      50      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      44 GTTGGAACTCCATTAATTTGTAGC      GGCCCAAGACGCAA
>>|||
      103 AGGTTGGAACCTCCATTAATTTGTAGCGTA...TAGGGCCCAAGACGCAA

      100      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      83 CGGTGATCGCTCAAGAATACATTGAGTCACTAATAGCATTGAGTCACTG
      |||
      208 CGGTGATCGCTCAAGAATACATTGAGTCACTAATAGCATTGAGTCACTG

      150      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      133 ATCTCGACATGCAAGCAACTCGTCGCCAGTAGCAGTGGCGGCCACAAGT
      |||
      258 ATCTCGACATGCAAGCAACTCGTCGCCAGTAGCAGTGGCGGCCACAAGT

      200      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      183 CATCACCAATTTTACCAGGTCATTCAATCGTTCCAAATAAAAAATAAGGA
      |||
      308 CATCACCAATTTTACCAGGTCATTCAATCGTTCCAAATAAAAAATAAGGA

      250      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      233 GTAATGTAAGGTTGTGGTAGTGAATCACTGCAGCGTGCCACCAG
      |||
      358 GTAATGTAAGGTTGTGGTAGTGAATCACTGCAGCGTGCCACCAGCGG

      300      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      280 AACCGAGTTGATGTTTCAATAAAGGAAGTTATTGATACATTCCA
      ...>>>|||
      408 ...CAGAACCAGTTGATGTTTCAATAAAGGAAGTTATTGGTACATTCCCT

      350      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      324 ATCCCTCGTTATAACTATGTATGACACCCAGGACTTCTTCAAGCTTGTA
      |||
      554 ATCCCTCGTTATAACTATGTATGACACCCAGGACTTCTTCAAGCTTGTA

      400      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      374 TCA      GTTACGTCACAGTTGAGAAAATAACGGCTTCATACACT
|||>>>...>>>|||
      604 TCAGTG...CAGGTTACGTCACAGTTGAGTAAATAACGGCTTCATACACT

      450      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      415 TTATTGATGAAAAATTGTCGGATTATTACTGGCTACCAAGTTACACAATA
      |||
      738 TTATTGATGAAAAATTGTTGGATTATTACTGGCTACCAAGTTACACAATA

      500      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      465 TGTTACGCAACTATTTACTACTATGCAAAATTTGGAGTGTCTATTA
      |||
      788 TGTTACGCAACTATTTACTACTATGCAAAATTTGGAGTGTCTATTA

      550      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      515 GTGCAGTGATAAGTGGAGTTGATAGCATCAGCATTAAATACGATTATTGGT
      |||
      838 GTGCAGTGATAAGTGGAGTTGATAGCATCAGCATTAAATACGATTATTGGT

      600      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      565 GGTTTAGGGATTGATTTGAATATTGGCTTTGGGATTAATATTGGTGAAG
      |||
      888 GGTTTAGGGATTGATTTGAATATTGGCTTTGGGATTAATATTGGTGAAG

      650      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
      615 TGGAGGCGGGGGGGGGTATTCTGTTGGAGGCAATATTGGTATTG
      |||
      938 TGGAGTCCGGGGTCGGGGTGGTATTCTGTTGGAGGCAATATTGGTATTG

      700      .      :
      665 GTATAAATATTAG
      |||
      988 GTATAAATATTC G

EXONS

> 1 1000 cDNA-HvEC-016
1 43
105 129
194 404
510 606
700 1000

```