

ISABEL SAMILA LIMA CASTRO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM POTENCIAIS  
PROTEÍNAS EFETORAS ENVOLVIDAS NO PATOSSISTEMA *Hemileia*  
*vastatrix*-CAFEIEIRO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016

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

T

Castro, Isabel Samila Lima, 1986-  
C355i Identificação de genes que codificam potenciais proteínas  
2016 efetoras envolvidas no patossistema *Hemileia vastatrix*-Cafeeiro  
/ Isabel Samila Lima Castro. – Viçosa, MG, 2016.  
ix, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eveline Teixeira Caixeta.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Hemileia vastratrix*. 2. Cafeeiro - Doenças e pragas.  
3. Genômica. 4. Interação planta-patógeno. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Genética e Melhoramento.  
Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento.  
II. Título.

CDD 22. ed. 633.7394

ISABEL SAMILA LIMA CASTRO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM POTENCIAIS  
PROTEÍNAS EFETORAS ENVOLVIDAS NO PATOSSISTEMA *Hemileia  
vastatrix*-CAFEIEIRO**

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

APROVADA: 16 de fevereiro de 2016.

---

Laércio Zambolim  
(Coorientador)

---

Murilo Siqueira Alves

---

Eveline Teixeira Caixeta  
(Orientadora)

*A minha mãe, Penha,  
As minhas irmãs, Paula e Bruna,  
E ao meu esposo, Daniel,  
Por todo amor, paciência e compreensão,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido tantas oportunidades e sempre ter me dado força e sabedoria. Obrigada Senhor!

À Universidade Federal de Viçosa, pela qualidade do ensino.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), pela infraestrutura disponibilizada à realização do trabalho.

A minha mãe, Penha, pelo amor, por sempre ter confiado em mim, por ser minha base e meu exemplo de mulher forte e guerreira.

As minhas irmãs, Paula e Bruna, por todo carinho e por sempre acreditarem nas minhas escolhas.

Ao Daniel, que além de esposo é meu amigo e companheiro, pelo amor e pela cumplicidade em todos os momentos, desde a minha graduação.

As minhas amigas de infância, Bia, Mayara, Fabricia, Ádna, Daiane e Gisele, pela amizade verdadeira e por sempre estarem ao meu lado torcendo pelo meu sucesso.

Aos amigos de Viçosa, pela companhia e amizade durante todos esses anos de estudos.

A minha Orientadora, Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos, pela paciência e amizade.

Ao meu coorientador Laércio Zambolim, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar em um excelente laboratório, com toda a infraestrutura necessária para a realização de pesquisas de alta qualidade.

Ao Murilo Siqueira Alves, pela disponibilidade em participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Juan e à Brenda pela valiosa ajuda em todas as etapas. A todos os amigos do Biocafé, pela agradável companhia. Agradeço em especial a Daniela (Dani), pelo cuidado com o nosso ambiente de trabalho, pelo café de todos os dias e pela ajuda imprescindível nas análises finais desse trabalho.

Muito Obrigada!

## BIOGRAFIA

ISABEL SAMILA LIMA CASTRO, filha de Cirilo de Oliveira Castro (*in memorian*) e Maria da Penha Lima Castro, nasceu no dia dezanove de fevereiro de 1986, em São Paulo, SP. Em março de 2009, ingressou no curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas em março de 2014. No mesmo mês, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, na mesma instituição, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2016.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
3.1 Importância da ferrugem do cafeeiro.....	4
3.2 Ferrugem alaranjada do cafeeiro- <i>Hemileia vastatrix</i> .....	4
3.3 Interação planta-patógeno.....	7
3.4 Proteínas efetoras de fungos causadores de ferrugem.....	9
3.5 Bioinformática.....	11
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
4.1 Análises de bioinformática.....	13
4.2 Obtenção dos isolados de <i>H. vastatrix</i> .....	15
4.3 Teste de viabilidade dos esporos.....	15
4.4 Material vegetal e experimentação.....	15
4.5 Extração de RNA de <i>H. vastatrix</i> .....	16
4.6 Análise da expressão gênica.....	16
<b>5. RESULTADOS</b> .....	17
<b>6. DISCUSSÕES</b> .....	24
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32

## RESUMO

CASTRO, Isabel Samila Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Identificação de Genes Que Codificam Potenciais Proteínas Efetoras Envolvidas no Patossistema *Hemileia vastatrix*-Cafeeiro**. Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta. Coorientadores: Laércio Zambolim e Ney Sussumu Sakiyama.

A ferrugem do cafeeiro é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Trata-se de um parasita biotrófico que infecta apenas o cafeeiro sendo responsável por grandes perdas na produção. Apesar da eficiência dos fungicidas, o emprego de cultivares resistentes é o melhor método de controle, sendo econômico, eficiente, além de não causar impactos ambientais. O grande desafio para os melhoristas é o surgimento de novas raças do patógeno capazes de suplantar a resistência das cultivares resistentes desenvolvidas. A raça XXXIII de *H. vastatrix* foi recentemente identificada no Brasil, infectando algumas cultivares resistentes à ferrugem do cafeeiro. Durante a interação com a planta hospedeira, os fungos causadores de ferrugem secretam um arsenal de proteínas efetoras que modificam a estrutura e a função da célula hospedeira, permitindo o estabelecimento (ou não) da colonização do parasita. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho, caracterizar genes que codificam proteínas secretadas pelo fungo, por meio de análises de bioinformática e de expressão temporal de genes, que podem funcionar como proteínas efetoras de *H. vastatrix* (raça XXXIII), a fim de auxiliar a compreensão do processo infeccioso do patógeno. Dentre os 615 genes candidatos a efetores, obtidos a partir de um genoma de referência do fungo, a grande maioria, 376 e 88, apresentaram similaridade com as proteínas de *Puccinia sp* e *Melampsora larici-populina*, respectivamente. Utilizando o *software* BLAST2GO, foi realizada a categorização funcional desses genes. A partir dos resultados do BLASTp, foram extraídos 310 termos GO, distribuídos em três categorias. A categoria mais representada foi “Função Molecular” com 137 termos, seguida por “Processos Biológicos”, 126 termos, e “Componente Celular”, 47 termos. De acordo com a anotação de *Enzyme Codes* (EC) obtida, as classes enzimáticas mais representadas foram as hidrolases, transferases e as oxidoreduções. Foram selecionados 13 genes para a análise de expressão temporal. A análise foi efetuada pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR), nos tempos 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai) de urediniosporos



frescos em plantas de cafeeiro resistente (CIFC 832-1) e suscetível (Caturra) à ferrugem. Foi possível obter quatro padrões diferentes de expressão. Tais padrões sugerem que os genes analisados possam estar envolvidos na tentativa de sobrevivência do fungo em resposta a resistência da planta, na fase biotrófica da infecção, além de genes relacionados com a supressão da resposta de defesa da planta durante a penetração, no reconhecimento do hospedeiro e/ou na fase inicial da colonização. Os resultados indicaram que pode ocorrer comunicação entre o fungo e o hospedeiro, logo no início da infecção, ainda na fase de germinação dos esporos. Estudos biológicos funcionais deverão ser realizados para determinar a verdadeira função desses efetores durante a interação de *H. vastatrix* com o cafeeiro. Essas informações são úteis para os estudos que visam o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na suplantação da resistência por novas raças do fungo, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável.

## ABSTRACT

CASTRO, Isabel Samila Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Identification of genes encoding potential effector proteins involved in the *Hemileia vastatrix*-coffee pathosystem.** Adviser: Eveline Teixeira Caixeta. Co-advisers: Laércio Zambolim and Ney Sussumu Sakiyama.

Coffee rust is caused by the fungus *Hemileia vastatrix*. It is a biotrophic parasite that infects coffee only, being responsible for major losses in production. Despite fungicides efficiency, the use of resistant cultivars is the best method of control, being economical, efficient, and does not cause adverse environmental impacts. The challenge for breeders is the emergence of new races of the pathogen able to overcome the resistance of developed resistant cultivars. The race XXXIII of *H. vastatrix* was recently identified in Brazil infecting some cultivars resistant to coffee rust. During the interaction with the host plant, coffee rust fungi secrete an arsenal of effector proteins which modify the structure and function of the host cell, allowing the establishment (or not) of parasite colonization. Therefore, this study aimed to characterize genes that encode proteins secreted by the fungus, by bioinformatics tools and temporal expression analysis of genes, which may function as an effector protein of *H. vastatrix* (race XXXIII), in order to understand the infection process of the pathogen. Amongst the 615 candidate effector genes, obtained from a fungal genome reference, the majority (376 and 88) has shown similarity to proteins of *Puccinia sp* and *Melampsora larici-populina*, respectively. Functional categorization of those genes was done using BLAST2GO software. Based on the results from BLASTp, 310 GO terms were found, distributed into 3 categories. The most representative category was “Molecular Function” with 137 terms, followed by “Biological Process”, 126 terms, and “Cellular Component”, 47 terms. According to the Enzyme Code (EC) annotation obtained, the most represented enzyme classes were hydrolases, transferases and oxidoreductases. 13 genes were selected for temporal gene expression analysis. The analysis was performed by Real-Time PCR technique, at 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation (hai) of fresh urediniospores into resistant (CIFC 832-1) and susceptible (Caturra) coffee plants to rust. Four different expression patterns were found. Those patterns suggest that the genes analyzed may be involved in survival attempts of the fungus in response to the

resistance of the plant, on biotrophic stage of infection, in addition to genes related to suppression of defense response of the plant during penetration, the host recognition and/or the early stages of colonization. The results indicate that communication may occur between the fungus and the host plant in early stage of infection, during the spore germination stage. Functional biological studies should be performed to determine the real function of these effectors during interaction between *H. vastatrix* and coffee plants. These information are useful for studies that aim at the understanding of molecular mechanisms involved in supplanting resistance by new races of the fungus, providing subsidies for the development of cultivars with durable resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, pertencente ao filo *Basidiomycota* e a ordem *Pucciniales*. Trata-se de um parasita biotrófico que infecta apenas o cafeeiro sendo responsável por perdas da ordem de 35 a 50% da produção se não forem implantadas medidas de controle eficiente (Zambolim *et al.*, 2016).

A ferrugem é a principal doença fúngica do cafeeiro (Zambolim *et al.*, 1999). A doença provoca a queda das folhas infectadas, levando ao abortamento de flores, má formação dos grãos e à seca dos ramos, causando danos diretos na produção (Ventura *et al.*, 2007; Zambolim, 2009, 2016). O controle químico constitui no principal método de controle da ferrugem e pode ser realizado de forma preventiva, com fungicidas de contato, sendo os cúpricos os mais efetivos, ou pelo emprego de fungicidas sistêmicos via foliar e/ou solo, formulados em associação com inseticidas sistêmicos ou separadamente. O controle pode também ser realizado por pulverização com Calda Viçosa, uma mistura de nutrientes com efeito fungicida (Zambolim, 2009, 2016).

Apesar da eficiência dos fungicidas, o emprego de cultivares resistentes é o melhor método de controle, sendo econômico, eficiente, além de não causar impactos ambientais. Nos últimos anos várias cultivares foram colocados à disposição dos produtores, entre eles, Icatu Amarelo, Icatu Vermelho, Tupi IAC 1669 - 33, Obatã IAC 1669 - 20 (Fazuoli *et al.*, 2002), IAPAR 59, IPR 97, IPR 98, IPR 99, IPR 102, IPR 103, IPR 104, IPR 105, IPR 106, IPR 107, IPR 108 (Sera *et al.*, 2005), Oeiras MG 6851, Paraíso MG H 419-1, Araponga MG1 e MG2, Sacramento MG1, Catiguá MG1 e MG2 e Pau-Brasil MG1 (Pereira *et al.*, 2005). Recentemente, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) lançou a cultivar Aranãs que, além de resistente a ferrugem, apresenta alta produtividade e qualidade de bebida (EPAMIG, 2015). Entretanto, o grande desafio para os melhoristas é o surgimento de novas raças do patógeno capazes de suplantar a resistência das cultivares resistentes desenvolvidas. Por exemplo, a resistência das cultivares Oeiras e Icatú Vermelho, foram suplantadas cerca de 9 e 15 anos, respectivamente, após seu lançamento (Capucho *et al.*, 2009). O grande risco na durabilidade dessas cultivares está na variabilidade do patógeno. Estudos

utilizando marcadores moleculares AFLP (*amplified fragment length polymorphisms*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) constataram uma alta variabilidade genética em isolados de *H. vastatrix* coletados no Brasil e mostraram que a população desse patógeno não possui uma estrutura populacional clonal, indicando o seu alto potencial evolutivo (Nunes *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2013).

Durante a interação com a planta hospedeira, os fungos causadores de ferrugem secretam um arsenal de proteínas efetoras que modificam a estrutura e a função da célula hospedeira, permitindo o estabelecimento da colonização do parasita. Algumas dessas proteínas, 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 do patógeno.

Por meio de estudos genéticos da interação ferrugem (*Melampsora lini*)-linho, Flor (1956) demonstrou que a interação planta-patógeno é determinada pelo genótipo do hospedeiro e pelo genótipo do patógeno, em uma interação gene a gene. Assim, o fenótipo de resistência só é observado quando o gene de resistência dominante (gene R) da planta hospedeira interage com seu respectivo gene de avirulência (gene *Avr*) do genótipo do patógeno. Já foram geneticamente identificados pelo menos nove genes dominantes (*SH1 a SH9*) que conferem resistência à ferrugem do cafeeiro (Rodrigues Jr *et al.*, 1975; Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988). Pela teoria de Flor foi inferido, portanto, que existem pelo menos nove genes de avirulência em *H. vastatrix*. Como já foi observado em diferentes patossistemas, mutações nos genes *Avr* permitem que os patógenos suplantem a resistência conferida por um determinado gene (Stergiopoulos & de Wit, 2009).

As ferrugens são fungos parasitas obrigatórios produtores de uma estrutura especializada chamada haustório. Tal estrutura desempenha importante papel na fase biotrófica da infecção sendo responsável pela absorção de nutrientes a partir do hospedeiro, além de induzir 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. A resposta de resistência às ferrugens normalmente é observada após a formação dos

haustórios indicando que os genes *Avr* do patógeno são expressos nessa estrutura (Dodds *et al.*, 2009). Contudo, são escassos os estudos visando identificar e caracterizar genes de proteínas efetoras em *H. vastatrix*.

Segundo Hogenhout *et al.* (2009), proteínas efetoras são “moléculas secretadas por organismos associados às plantas que modificam a função da célula hospedeira”. Uma vez no interior da célula hospedeira, os efetores podem alterar as vias de seu metabolismo e suas vias de defesa. Estratégias envolvendo bioquímica, genética e bioinformática, muitas vezes em associação, têm sido utilizadas com sucesso para a identificação de genes que codificam proteínas efetoras em fungos filamentosos (Ellis *et al.*, 2009). A disponibilidade desses genes permitiria entender os mecanismos de mutação envolvidos na suplantação da resistência do cafeeiro, assim como poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável. Além disso, o conhecimento das proteínas efetoras poderia auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controle de doenças de plantas com base no melhoramento genético.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi identificar genes de proteínas secretadas, que podem funcionar como proteínas efetoras de *H. vastatrix*, por meio de ferramentas de bioinformática e análise de expressão gênica temporal. A identificação desses genes poderá auxiliar a compreensão do processo infeccioso do patógeno.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar a anotação/categorização dos genes candidatos a efetores de *H. vastatrix*.
- Selecionar possíveis proteínas efetoras para a validação utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real.
- Ampliar o conhecimento das funções das proteínas efetoras de *H. vastatrix* durante a interação com o hospedeiro em diferentes tempos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Importância da ferrugem do cafeeiro

Há controversas a respeito da época de ingresso da cultura de café no Brasil, mas é certo que isso ocorreu no século XVIII e se tornou uma das *commodities* agrícolas mais importantes do país. Atualmente, o café é o quinto item agrícola mais exportado do país sendo o Brasil o maior produtor e exportador mundial de café (CONAB, 2015).

O café arábica corresponde a mais de 70% da produção brasileira. A grande maioria das cultivares de *C. arabica* L, é derivada da variedade Típica, introduzida no Brasil em 1727, e a Bourbon, que são suscetíveis à ferrugem, principal doença que ataca o cafeeiro (Anthony *et al.*, 2001). A ferrugem é considerada uma doença clássica de plantas, sendo uma das mais bem estudadas cientificamente pelo impacto que causou na cafeicultura antes da disponibilidade de tecnologia para seu controle (Matiello e Almeida, 2006). A doença pode atingir com gravidade grandes áreas de lavoura, causando prejuízos na produtividade, sendo que seu controle exige gastos o que aumenta os custos de produção (Carvalho *et al.*, 2002; Guzzo, 2004; Zambolim *et al.*, 2005, 2016).

A importância da ferrugem se deve ao surgimento de novas raças de *H. vastatrix*, assim como a ocorrência de diferentes raças com genes de virulência complexos que mostram um grande potencial evolutivo das populações do fungo (Várzea & Marques, 2005). Como consequência, o desenvolvimento de cultivares de cafeeiros com resistência durável à ferrugem representa um grande desafio.

Segundo a Organização Internacional do Café- IOC (2015), as regiões produtoras de café vivem hoje a maior epidemia de ferrugem desde o seu aparecimento na América Central na década de 70. Cerca de 50% das plantações foram afetadas, o que levou alguns países a declararem estado de emergência fitossanitária.

#### 3.2 Ferrugem alaranjada do cafeeiro - *Hemileia vastatrix*

O fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. é o agente etiológico da ferrugem alaranjada do cafeeiro. Pertence ao filo *Basidiomycota*, classe *Puccinioniomycetes*,

ordem *Pucciniales* e família *Incertae sedis*. Uma característica importante desse patógeno é a biotrofia, ou seja, a dependência de células vivas do hospedeiro para o desenvolvimento e a reprodução. Esse estilo de parasitismo peculiar, em que o patógeno causa o mínimo de dano, permite ao hospedeiro manter-se vivo para que o parasita possa completar o ciclo de vida. O fungo biotrófico obrigatório diferencia-se dos fungos hemibiotrófico ou necrotróficos por apresentar: estruturas de infecção altamente desenvolvidas; atividade secretora limitada, especialmente de enzimas líticas; uma zona de contato estreita entre a membrana do fungo e da planta e a formação de haustório (Mendgen & Hahn, 2002).

*H. vastatrix* foi descrito, inicialmente, por J. M. Berkeley em 1868 no Ceilão, hoje Sri Lanka, e o registro no Brasil ocorreu em 1970, no estado da Bahia. A introdução do patógeno no Brasil, possivelmente, ocorreu pelo transporte de esporos por correntes aéreas de altas altitudes que atravessam o oceano vindas da África (Matiello & Almeida, 2006; McCook, 2006). Atualmente, está presente na maioria das regiões cafeeiras do mundo (Zambolim *et al.*, 2005, 2016). O gênero *Hemileia* foi classificado desta forma devido à morfologia dos urediniósporos, que apresentam uma face lisa (côncava) e outra equinulada (convexa) coberta de espinulas (Rodrigues, 1990).

O ciclo biológico de *H. vastatrix* divide-se em uma fase dicariótica e outra monocariótica. Na primeira fase, ocorre a formação de urediniósporos dicarióticos que representam a fase assexuada do ciclo e sempre que as condições ambientais são favoráveis, são responsáveis pelo processo de infecção no cafeeiro (Agrios, 2005; Silva *et al.*, 2006). Os Teliósporos são formados ocasionalmente e ocorrem nos mesmos soros dos urediniósporos (Ward, 1882), aparecendo excepcionalmente em condições de chuva moderada e baixas temperaturas e infectando outros cafeeiros, devido a ação do vento e de outros agentes. Os basidiósporos são monocarióticos, não infectam o cafeeiro e representam a fase sexuada do ciclo (Agrios, 2005), não sendo conhecida nenhuma função para estas estruturas ou hospedeiro (Fernandes *et al.*, 2009). O ciclo de vida desta ferrugem não é totalmente conhecido, o que dificulta a compreensão da evolução deste patógeno.

O fungo desenvolve-se na superfície abaxial foliar, quando há condições de umidade e temperatura propícias para a germinação dos urediniósporos, geralmente 24 horas após a infecção (Silva *et al.*, 2002). Em seguida, ocorre



formação de tubos germinativos, apressórios e da hifa de penetração, a qual atravessa o ostíolo do estômato e continua seu desenvolvimento na câmara subestomática, colonizando as células subsidiárias e do mesófilo, formando estruturas denominadas haustórios, responsáveis pela absorção de nutrientes das células do hospedeiro pelo patógeno (Zambolim *et al.*, 2002). A formação dessas estruturas nas células epidermais do hospedeiro é uma característica única de *H. vastatrix* (Ramiro *et al.*, 2009).

Os sintomas da ferrugem podem ser observados na face inferior das folhas, onde aparecem manchas de coloração amarelo-pálida, pequenas, de 1 a 3 mm de diâmetro, que evoluem, atingindo até 2 cm de diâmetro, quando então apresentam aspecto pulverulento com produção de urediniósporos de coloração amarelo alaranjada. Na face superior das folhas, a doença causa manchas cloróticas amareladas correspondendo aos limites da pústula na face inferior. A queda precoce de folhas e a seca de ramos são danos causados pela ferrugem, reduzindo, conseqüentemente, a produção. A seca progressiva dos ramos reduz a vida útil da lavoura, tornando-a antieconômica. Em regiões onde predomina alta umidade relativa e nos cafezais sombreados, podem ser notados sinais do fungo hiperparasita *Lecanicillium lecanii*, colonizando urédias de *H. vastatrix*. Em estádios avançados de desenvolvimento, a maior parte da área afetada torna-se necrótica e a produção de esporos continua somente na extremidade da pústula (Zambolim *et al.*, 1997).

A doença é controlada principalmente por meio de aplicações de fungicidas protetores e sistêmicos que são eficientes a curto e médio prazo (Zambolim *et al.*, 1997, 2016). Entretanto, o uso de variedades resistentes é recomendado, pois além de ser efetivo, é econômico e ecologicamente correto. Porém, o contínuo surgimento de raças fisiológicas é um grande desafio para a obtenção de cultivares com resistência durável.

Raças fisiológicas ou patótipos são variantes do patógeno com diferentes combinações de genes de virulência e, conseqüentemente, diferentes capacidades para infectar distintos genótipos de uma dada espécie hospedeira (Rodrigues Jr., 1975). Mais de 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram identificadas no mundo (Várzea & Marques, 2005). No Brasil, desde 1971, já foram relatadas 16 destas raças sendo elas I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII e XXXVII (Cabral *et al.*, 2009; Zambolim, 2016). Essa

grande variabilidade genética, comum à maioria dos patógenos biotróficos, tem sido determinada pelo padrão de infecção observado em uma série de 18 variedades diferenciadoras de cafeeiros (Zambolim *et al.*, 2005). O surgimento de novas raças de *H. vastatrix* tem levado a suplantação da resistência de cultivares lançadas no mercado (Várzea *et al.*, 2002).

Apesar do estudo realizado por Carvalho *et al.* (2011), utilizando citometria de fluxo, ter comprovado a hipótese proposta por Rajendren (1967), de que ocorre cariogamia seguida de haploidização nos urediniósporos, chamada pelos autores de criptossexualidade, a fase sexual do patógeno não foi devidamente descrita. Dessa forma, ainda não foram bem elucidados os mecanismos que conduzem à criação de novas raças. A criptossexualidade poderia explicar parte da diversidade do patógeno, assim como o surgimento frequente de novas raças. Porém, a maioria dos estudos considera a mutação como o principal mecanismo responsável pela criação de variabilidade no fungo e a pressão de seleção exercida pelos genes de resistência do hospedeiro responsável pelo aumento de mutantes virulentos na população (Várzea & Marques, 2005; Diniz, 2010; Várzea *et al.*, 2002; Zambolim, 2016).

A raça II é a mais frequente no Brasil, e no mundo, apresentando o gene de virulência *v5* (Zambolim *et al.*, 2005). Entretanto, a raça XXXIII possui 2 ou 3 genes de virulência (*v5,7* ou *v5,7,9*), sendo capaz de suplantar a resistência de cultivares que foram liberadas como resistentes à ferrugem (Várzea & Marques, 2005; Capucho *et al.*, 2012) causando preocupação para os produtores. Como essa raça possui além do gene *v5*, presente na raça mais frequente, outros importantes genes de virulência que tem suplantado a resistência, esse patótipo é de grande interesse para os estudos de interação com o cafeeiro.

Dessa forma, o entendimento dos mecanismos e estratégias utilizadas no ataque de *H. vastatrix*, em especial a raça XXXIII, ao cafeeiro são fundamentais para o desenvolvimento de formas alternativas de controle da doença.

### **3.3 Interação planta – patógeno**

Durante o processo coevolutivo as plantas desenvolveram um sistema imune inato capaz de identificar padrões moleculares e atividades específicas do patógeno ativando a sua resposta de defesa (Stergiopoulos & de Will, 2009). A

ativação deste mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de uma cascata de eventos e sinais moleculares que se inicia no reconhecimento pela planta do agente agressor e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo.

O sistema imune da planta é organizado em duas linhas de defesa principais. A primeira se dá por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) por proteínas receptoras presentes na membrana plasmática do hospedeiro, sendo chamada de imunidade ativada por PAMPs (PTI, *PAMP Triggered Immunity*) (Jones & Dangl, 2006). Um dos PAMPs de fungos mais bem estudado é a quitina, um importante componente estrutural da parede celular (Miya *et al.*, 2007). Contudo, essa linha de defesa é suplantada pelo patógeno por meio do transporte de proteínas efetoras para o citoplasma do hospedeiro. Em resposta, as plantas desenvolveram uma segunda linha de defesa em que ocorre o reconhecimento, que pode ser direto ou indireto, de proteínas efetoras produzidas pelo patógeno por meio de proteínas codificadas pelos genes R da planta. Essa segunda linha de defesa é chamada de imunidade ativada por efetores (ETI, *Effector Triggered Immunity*) e os genes que codificam esses efetores são normalmente chamados de genes de avirulência ou *Avr* (Jones & Dangl, 2006).

No reconhecimento direto, também denominado como “modelo ligante-receptor” (Stergiopoulos & de Wit, 2009), as proteínas R do hospedeiro podem reconhecer os efetores do patógeno diretamente pela associação física. Quando isso ocorre, é desencadeada a resposta de hipersensibilidade e fenótipo de resistência. A reação de hipersensibilidade (HR) se dá pela ativação de vias de sinalização que culminam com a morte celular programada no sítio de infecção, o que conduz ao colapso do tecido e a inibição completa da proliferação do patógeno biotrófico (Heath, 2000). Estudos tem mostrado que a HR do cafeeiro à ferrugem está associada ao encapsulamento dos haustórios com calose e 1,4- $\beta$ -glucanas, à disposição de fenóis, à acumulação de material de decomposição heterogênea (pectinas, polissacarídeos e fenóis) nos espaços intercelulares e à lignificação das paredes e hipertrofia das células das plantas. O aumento da atividade de enzimas oxidativas, como a lipoxigenase e a peroxidase, de enzimas da via fenilpropanoide tem sido também associado à expressão de resistência do cafeeiro (Silva *et al.*, 2002).

Já o reconhecimento indireto, também conhecido como “modelo-guarda”, é feito por meio de proteínas acessórias que são alvos do efector no hospedeiro (Dodds *et al.*, 2006). Neste segundo modelo, as proteínas R monitoram a presença da proteína *Avr* indiretamente por meio da detecção de mudanças em outras proteínas da planta. Dessa forma, quando as proteínas R e *Avr* estão presentes na planta e no patógeno, respectivamente, ocorre o reconhecimento originando uma interação incompatível, não desenvolvendo a doença. Porém, quando o reconhecimento não ocorre, o patógeno é virulento e a interação é compatível, originando a doença (Flor, 1971).

A ETI, por sua vez, desencadeou uma segunda onda da corrida “armamentista” coevolutiva entre planta e patógeno. O patógeno respondeu por meio de mutações e desenvolvimento de novos efetores que poderiam reprimir a ETI, em contra partida, as plantas desenvolveram novas proteínas R mediante ao reconhecimento desses novos efetores (De Wit, 2007; Jones e Dangl, 2006).

Estudos mostraram que a maioria dos genes R codificam proteínas com domínios LRR (*leucine-rich repeats*) e NBS (*nucleotide-binding site*) que reconhecem direta ou indiretamente proteínas *Avr* produzidas no apoplasto ou transferidas para o citoplasma da célula hospedeira. Entretanto, as proteínas *Avr*, de modo geral, não apresentam características moleculares comuns (Stergiopoulos & de Wit, 2009), um dos fatores que tem dificultado a caracterização dessas proteínas.

### **3.4 Proteínas efetoras de fungos causadores de ferrugem**

Sabe-se que os fungos patogênicos secretam proteínas efetoras no tecido da planta para promover a infecção por meio da manipulação de processos no hospedeiro (Win *et al.*, 2012). Durante a colonização, os fungos causadores da ferrugem formam o haustório que medeia o transporte molecular entre o parasita e seu hospedeiro promovendo a entrega de proteínas efetoras para as células hospedeiras (Rafique *et al.*, 2012).

Até o momento, apenas seis proteínas efetoras foram identificadas em três diferentes espécies de fungos causadores de ferrugem: *AvrM*, *AvrL567*, *AvrP123*, e *AvrP4* da ferrugem do linho (*Melampsora lini*), a RTP1 da ferrugem do feijão

(*Uromyces fabae*), e PGTAUSPE-10-1 da ferrugem do caule do trigo (*Puccinia graminis f. sp. Tritici*) (Kemen *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2007; Upadhyaya *et al.*, 2014). Todas elas são proteínas expressas no haustório e sem função bioquímica claramente identificada. Ainda é desconhecido como elas promovem o crescimento do fungo no tecido hospedeiro. Em contraste, suas propriedades de avirulência (*Avr*), isto é, a sua capacidade de desencadear respostas imunitárias específicas, e/ou o seu mecanismo de transporte, de como entram nas células vegetais, são melhores compreendidas.

As quatro proteínas efetoras de *M. lini* foram identificadas como efetores devido as suas propriedades como *Avr* (Ellis *et al.*, 2007), sendo capazes de induzir a morte celular quando expressas intracelularmente. Tal fato sugere que elas são translocadas para a célula hospedeira, onde interagem com proteínas codificadas pelos genes de resistência correspondentes. O *AvrPI23* possui similaridade com inibidores de serinoproteases do tipo Kazal, sugerindo um possível papel na patogênese de *M. lini*, por meio da inibição de proteases do hospedeiro (Catanzariti *et al.*, 2006).

*AvrL567* e *AvrM* de *M. lini* são *Avr* modelo para o estudo de reconhecimento de proteínas efetoras por receptores do sistema imunológico. Ambas as proteínas são reconhecidas no interior das células de plantas por receptores imunes específicos em uma interação física direta (Dodds *et al.*, 2004, 2006; Catanzariti *et al.*, 2006, 2010). Estudos revelaram que, para ambos efetores, existem múltiplos pontos de contato envolvidos na interação com o seu receptor correspondente (Wang *et al.*, 2007; Ravensdale *et al.*, 2011; Ve *et al.*, 2013). Os resíduos de aminoácidos dentro destes pontos de contato são altamente variáveis, sugerindo que existe uma corrida “armamentista” entre esses efetores e seus receptores correspondentes. O conhecimento das interações *Avr*-receptor é útil para a engenharia genética tentar melhorar os receptores imunes para o reconhecimento de efetores expandidos (Harris *et al.*, 2013; Segretin *et al.*, 2014.), o que pode ajudar o desenvolvimento de uma resistência de amplo espectro em plantas (Dangl *et al.*, 2013).

Dodds *et al.* (2006) demonstraram a interação do tipo direta da proteína *AvrL567* com proteínas codificadas pelos genes *L5*, *L6* e *L7*. Linhagens transgênicas de *M. lini* com o gene *AvrL567* silenciado não apresentaram

crescimento reduzido em seu hospedeiro, sugerindo que este efector não é necessário para a virulência completa do patógeno. Este fato pode ser explicado pela redundância funcional elevada no repertório de efetores em *M. lini* (Lawrence *et al.*, 2010). Tais redundâncias também foram verificadas em patógenos bacterianos de planta (Kvitko *et al.*, 2009) e representam um obstáculo para a caracterização funcional de efetores.

Porém, recentes avanços têm sido feitos a respeito RTP1, um efector de ferrugem conservado que parece funcionar como um inibidor de protease (Pretsch *et al.*, 2013). Kemen *et al.* (2013) relataram que a RTP1 se acumula dentro da interface parasita-hospedeiro e forma filamentos. Os autores propuseram um papel como efector estrutural, possivelmente estabilizando estruturas fúngicas durante a infecção. Um modelo que integra as diferentes localizações RTP1 e as funções propostas continua sendo desenvolvido.

Mais recentemente, um estudo utilizando o sistema de transporte de proteína bacteriana revelou que a proteína PGTAUSPE-10-1 de *P. graminis* promove a morte celular em linhagens de hospedeiros que possuem o gene de resistência *Sr22*, dessa forma, a proteína PGTAUSPE-10-1 foi considerada um candidato a efector *AvrRs22* (Upadhyaya *et al.*, 2014).

Vários métodos para a transformação genética de *M. lini* e *U. fabae*, bem como para o silenciamento de genes induzido por hospedeiro (HIGS) de *P. triticina* têm sido relatados (Lawrence *et al.*, 2010; Djulic *et al.*, 2011; Panwar *et al.*, 2013). Tais métodos, embora estejam em diferentes estádios de desenvolvimento, representam ferramentas valiosas para investigar a contribuição de efetores individuais para a virulência do patógeno durante a infecção.

### **3.5 Bioinformática**

Os grandes avanços na área de biologia molecular e bioinformática deram origem a era da genômica. A tecnologia genômica tem gerado muitas informações e criado bancos de dados de sequências de DNA, que possibilitam a identificação dos fatores genéticos determinantes e/ou associados com características de interesse agrônomo.

Com a explosão da quantidade de dados biológicos disponíveis, o foco na informática para desenvolver novos programas e metodologias de análise está aumentando cada vez mais. Dessa forma, a bioinformática consiste na criação, desenvolvimento e operação de bancos de dados e outras ferramentas computacionais para coletar, organizar e interpretar dados biológicos.

A busca por informações importantes no contexto da genômica é chamada de mineração de dados. Um dos aspectos importantes na mineração de dados é a associação de sequências individuais com suas respectivas funções biológicas, sendo esse procedimento chamado de anotação. A anotação funcional permite a categorização de genes em classes funcionais que podem ser úteis para a compreensão do significado fisiológico de grande quantidade de genes (Conesa *et al.*, 2005). A plataforma Gene Ontology (GO), desenvolvida pelo consórcio GO (Ashburner *et al.*, 2000) é uma importante ferramenta utilizada para esse tipo de análise.

O objetivo do consórcio GO é produzir vocabulários dinâmicos controlados que podem ser utilizados para descrever o papel de genes e produtos gênicos em todos os organismos. As ontologias são divididas em função molecular, processo biológico e componente celular. Basicamente, esses termos descrevem as funções biológicas do produto de genes, os processos envolvidos na realização dessas funções e onde na célula essas funções são tipicamente realizadas (Ashburner *et al.*, 2000).

Cada vez mais os profissionais de bioinformática têm buscado o desenvolvimento de novos programas e ferramentas com interface gráfica e amigável para facilitar as análises genômicas, diminuindo a necessidade de conhecimento avançado de informática para os usuários. Com esse objetivo, o programa BLAST2GO foi desenvolvido para ser uma ferramenta web de fácil manipulação com interface Java que funciona em qualquer sistema operacional (Conesa *et al.*, 2005).

O BLAST2GO utiliza o GO como sistema de ontologia e possui uma variedade de ferramentas gráficas e analíticas para a manipulação da anotação e mineração de dados. O GO admite uma grande cobertura biológica e a sua estrutura em gráficos acíclicos dirigidos (DAG – *Directed Acyclic Graphs*), que

permite o entendimento do contexto biológico, a torna muito adequada para esse tipo de análise. Atualmente, o *Código Enzyme* (CE), *KEGG Maps* e o *InterPro motifs* também são ferramentas disponíveis no BLAST2GO (Gotz *et al.*, 2008).

Basicamente, BLAST2GO utiliza pesquisas BLAST para encontrar sequências similares para uma ou várias sequências de entrada. O programa extrai os termos GO associados a cada um dos *hits* obtidos e disponibiliza uma anotação GO para a sequência de consulta. Códigos de enzimas são obtidos por mapeamento de GOs equivalentes, enquanto que informações sobre motivos/domínios conservados podem ser obtidos pelo serviço *InterProScan web*.

A anotação automática (comparações automáticas de sequências com bancos de dados) constitui em um grande avanço para tecnologia genômica, entretanto, vale ressaltar que a verdadeira validação dos resultados de análises *in silico* deve ser biologicamente realizada. Ainda assim, os resultados da anotação se tornam muito importantes na medida em que permite a descoberta da importância biológica da sequência dentro do contexto em que ela foi obtida.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Análises de bioinformática

A caracterização dos genes candidatos a efetores foi realizada a partir de um banco de dados de um genoma de referência de *H. vastatrix* pertencente à raça XXXIII. Esse banco foi obtido a partir do sequenciamento *de novo* do genoma do fungo, em que, por meio de análises utilizando diferentes algoritmos, obteve-se a predição refinada do secretoma da espécie. Foram obtidos 615 genes que codificam para proteínas potencialmente secretadas, sendo essas consideradas candidatas a efetores (Porto *et al.*, 2015).

Utilizando esse secretoma, foi feita uma busca por similaridade contra um banco de dados de proteínas não redundantes do *Genbank/NCBI* (*National Center for Biotechnology and Information*), sendo utilizado o algoritmo BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*), com *e-value* de  $10^{-5}$ . Desse banco, foram selecionados os potenciais genes efetores que apresentaram similaridade com



proteínas de *Melampsora larici-populina* e *Puccinia sp*, fungos modelos pertencentes ao mesmo filo de *H. vastatrix*. Em seguida, foi realizada a anotação funcional dessas sequências utilizando o *software* BLAST2GO (Conesa *et al.*, 2005).

O procedimento de anotação iniciou-se com a realização de um BLASTp de todos os *contigs* pré-selecionados contra o banco de dados nr do NCBI. Dessa vez, o *e-value* máximo do melhor blast hit foi ajustado para  $10^{-10}$  e o tamanho mínimo do alinhamento (*HSP length*) para 33. Baseando-se no resultado do BLASTp, o BLAST2GO extrai termos do *Gene Ontology* (GO) para cada *contig*. As três categorias de termos designados eletronicamente foi Função Molecular, Processo Biológico e Componente Celular. Posteriormente, os *contigs* foram submetidos ao *InterProScan* do EBI (*European Bioinformatics Institute*), visando identificar domínios conservados.

O InterPro é um banco de dados que acumula informações sobre domínios, motivos e regiões conservadas nas proteínas e famílias de proteínas disponibilizadas por outros bancos de dados que incluem PROSITE, PRINTS, ProDom, Pfam, SMART, TIGRFAMs, PIRSF, UPERFAMILY e PANTHER.

A última etapa do BLAST2GO consistiu na anotação de ECs (*Enzyme Codes*) e busca de mapas metabólicos do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) para os *contigs*.

Para auxiliar a seleção de genes candidatos a serem testados por PCR em tempo real, as sequências de proteínas secretadas foram, ainda, comparadas com bibliotecas de RNASeq da interação compatível do cafeeiro e *H. vastatrix* (raça XXXIII). Com base nos resultados de um BLASTp, foram selecionados: quatro genes que apresentaram similaridade com sequências expressas às 12h após infecção (biblioteca de RNASeq de transcritos obtidos 12h após infecção); um gene que apresentou similaridade com sequências expressas às 24h após infecção; quatro genes com similaridades com sequências expressas às 12 e 24h após infecção e quatro genes que não apresentaram similaridade com sequências expressas em nenhuma das horas da biblioteca de interação.

A partir das sequências selecionadas foram desenhados *primers* utilizando o programa *Primer-BLAST* do NCBI, que foram utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real.

#### **4.2 Obtenção dos isolados de *H. vastatrix***

Para a análise de PCR em tempo real, foi utilizado o isolado da raça XXXIII (isolado Hv-02) caracterizado biologicamente por Capucho *et al.* (2012) e desde então mantido no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (Biocafé) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG.

A multiplicação do isolado foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Zambolim & Chaves (1974), em mudas de cafeeiro Caturra (CIFC 19/1). A inoculação dos urediniósporos foi feita na face abaxial de folhas jovens e completamente desenvolvidas com o auxílio de um pincel. Em seguida, as folhas foram aspergidas com água destilada, utilizando um borrifador, até a obtenção de um leve molhamento superficial. Posteriormente, as plantas foram cobertas com saco plástico e mantidas no escuro por 48 horas a 22°C. Após este período, as plantas foram levadas para câmara de crescimento com temperatura de 22°C e fotoperíodo de 12 horas até o aparecimento de urediniósporos. Os mesmos foram coletados e acondicionados em cápsulas de gelatina dentro de um dessecador com solução de ácido sulfúrico (densidade de 1,8 e concentração 32,6%) de modo a manter a umidade relativa do ambiente interno em torno de 50%. O dessecador foi mantido em refrigerador a 4°C para a preservação da viabilidade dos urediniósporos. Este procedimento foi repetido até que se obteve quantidade suficiente de esporos para a realização do trabalho.

#### **4.3 Teste de viabilidade dos esporos**

A viabilidade dos urediniósporos de *H. vastatrix* foi avaliada pelo teste de germinação em meio ágar-água 2%, utilizando o método descrito por Zambolim & Chaves (1974), antes da inoculação nas plantas. Somente os urediniósporos com viabilidade superior a 30% foram considerados adequados para iniciar o trabalho. A metodologia consistiu em obter uma suspensão de urediniósporos a uma concentração de 2mg/ml em água destilada, acrescentando-se *tween* (0,01%). Espalhou-se 300µL dessa suspensão na superfície das placas de *petri*, as quais foram incubadas por 24 horas no escuro a 22°C. Após esse período, procedeu-se a contagem dos urediniósporos com auxílio de microscópio óptico.

#### **4.4 Material vegetal e experimentação**

Foram utilizadas as variedades de cafeeiro Caturra CIFC 19/01, suscetível à ferrugem, e o Híbrido de Timor CIFC 832/1, resistente. O experimento foi conduzido em uma câmara de crescimento com temperatura e luminosidade controladas da mesma forma como para a obtenção dos esporos. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três réplicas biológicas para cada tempo de coleta após a inoculação em folhas jovens totalmente expandidas. As coletas foram realizadas em 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, sendo o tempo de 12 horas utilizado como referência para as análises de expressão temporal de genes. A inoculação foi realizada seguindo a metodologia descrita no item 3.1 para a obtenção dos esporos. Durante as coletas, as amostras (folhas) foram imediatamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido e mantidas em ultrafreezer -80 °C até a utilização.

#### **4.5 Extração de RNA de *H. vastatrix***

As folhas, previamente congeladas, foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido e aproximadamente 100mg foram destinadas a extração de RNA utilizando-se o *Rneasy Plant Mini Kit* (Qiagen) como extrator, seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado com o auxílio do Qubit RNA BR (*Life Technologies*) e espectrofotômetro NanoDrop<sup>TM</sup> (*Thermo Fisher Scientific*), e sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio. As amostras de RNA foram armazenadas em ultrafreezer -80 °C até a utilização.

#### **4.6 Análises de expressão gênica**

A síntese de cDNA foi realizada com 3 µg de RNA total, pré-tratado com 1 µL de DNase por 15 min (50 U/µL, Amplification Grade DNase I, Invitrogen<sup>TM</sup>), para retirar os possíveis contaminantes de DNA genômico. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando o kit ImProm-II<sup>TM</sup> *Reverse Transcription System Protocol RT-PCR* (Promega), segundo as orientações do fabricante. O cDNA foi armazenado a -20 °C, até a utilização.

Para a realização da técnica de PCR quantitativo em tempo real, em aparelho 7500 Real Time PCR Systems (*Applied Biosystems*), foi utilizado o

sistema de detecção de fluorescência SYBR Green I (*Applied Biosystems, California, USA*). Para cada reação utilizou-se 2µl da diluição da reação de síntese de cDNA de fita simples, 0,4µl de cada iniciador, 5µl de SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) e 2,2µl de água estéril, para um volume final de 10µl. As condições térmicas da reação foram: 95°C por 10 minutos para a desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por segundos e finalizando com 95°C por 15 segundos. O nível de expressão dos genes foi calculado pelo programa REST 2009, sendo utilizados os valores médios de Ct, resultante de três réplicas biológicas e três réplicas técnicas.

Para a normalização dos dados foram utilizados genes constitutivos selecionados de *H. vastatrix*, o *CytIII* (citocromo c oxidase subunidade III) e *βtub* (β-tubulina) que já foram validados como normalizadores para análises de expressão de genes de *H. vastatrix in planta* (Vieira *et al.*, 2011).

## 5. RESULTADOS

Do secretoma de *H. vastatrix* composto por 615 genes candidatos a proteínas efetoras (Porto *et al.*, 2015), a grande maioria, 376 e 88, apresentaram similaridade com as proteínas de *Puccinia sp* e *Melampsora larici-populina*, respectivamente.

Somente as sequências similares a *Puccinia sp* e *M. larici-populina* (464), foram submetidas a análises de categorização funcional, por meio da plataforma BLAST2GO. Na busca com BLASTp, utilizando *e-value* ajustado para  $\geq 10^{-10}$ , observou-se maior similaridade com as espécies *Puccinia sorghi* e *Puccinia striiformis*, além de *Puccinia graminis* e *M. larici-populina* (Figura 1). Nessa análise, algumas sequências (27) não apresentaram similaridade (*Hit*) com sequências depositadas no banco de dados (NCBI). Esse fato, pode ser explicado pela utilização de um *e-value* menor, restringindo a análise. *E-value* representa um valor estatístico (probabilidade) que indica se o alinhamento é real ou foi obtido meramente pelo acaso, fundamentalmente, quanto menor esse valor, menores as chances daquele resultado ser consequência do acaso. A maioria dos *e-value* obtidos ficaram entre  $10^{-15}$  e  $10^{-20}$ .

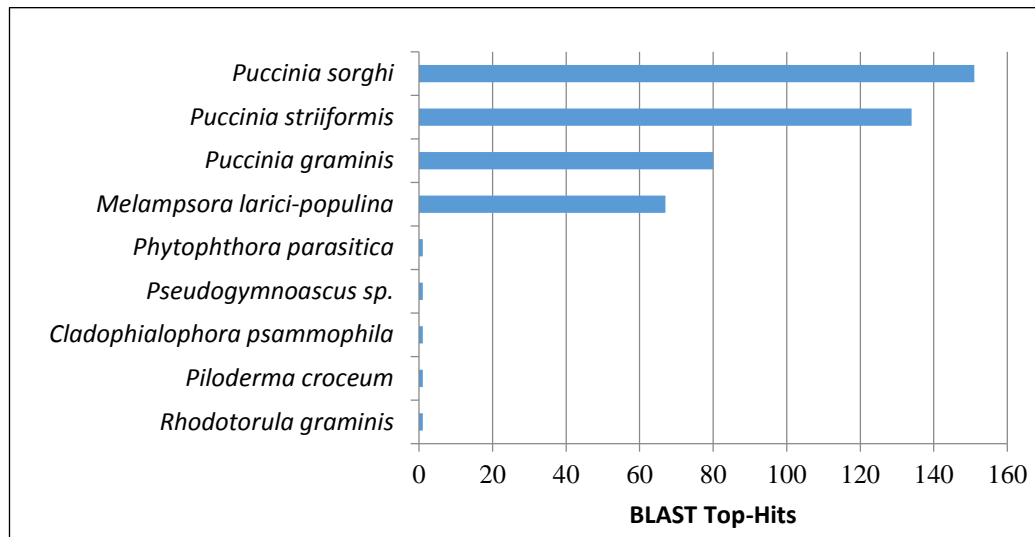


Figura 1: Distribuição de espécies encontradas com maior frequência na busca por similaridade com o BLASp.

A partir dos resultados do BLASTp, foram extraídos 310 termos GO, distribuídos em três categorias. Para a maioria dos genes (334) não foi possível obter termos GO, enquanto os demais genes (130) apresentaram um ou mais termos.

A categoria mais representada foi “Função Molecular” com 137 termos, seguida por “Processos Biológicos”, 126 termos, e “Componente Celular”, 47 termos, considerando o nível hierárquico 3. Na categoria “Função Molecular”, os termos mais representados foram “ligação a íons”, “ligação a compostos heterocíclicos” e “ligação a compostos do ciclo orgânico” (Figura 2). Esses dados foram condizentes com os *Enzyme Codes* (EC) obtidos (24), em que as classes enzimáticas mais representadas foram as hidrolases, transferases e as oxidoreduções, respectivamente (Figura 3).

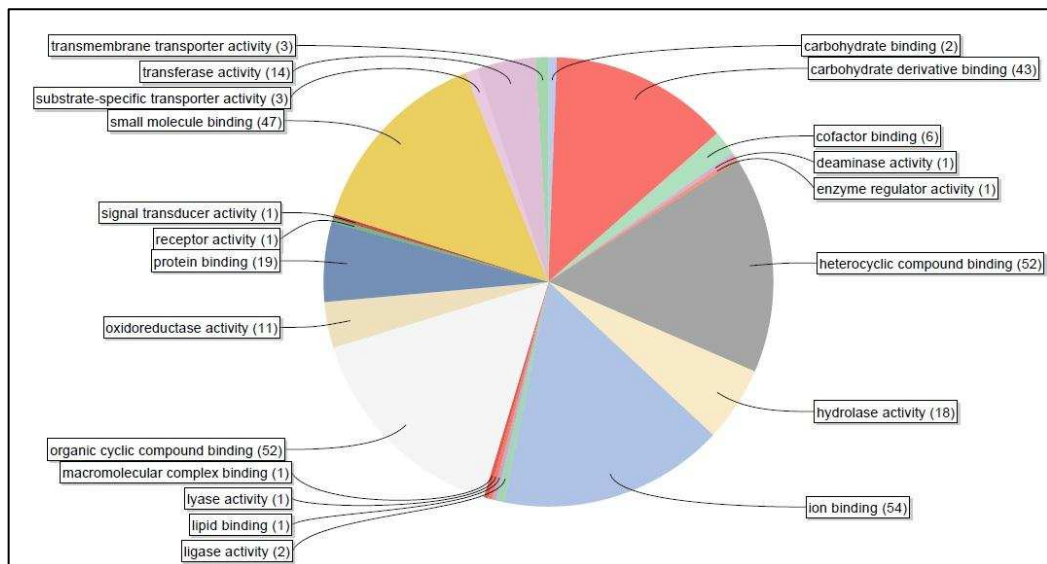


Figura 2: Distribuição dos termos GO para categoria “Função Molecular”.

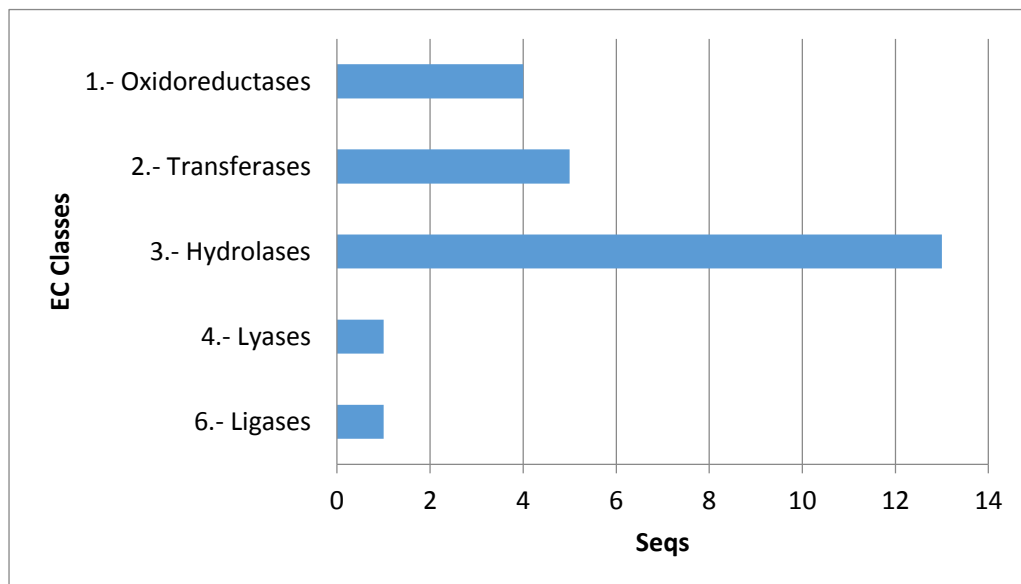


Figura 3: Distribuição da anotação das classes de enzimas (*Enzyme Codes*).

Para a categoria “Processos Biológicos”, os termos mais representados foram “processo metabólico de substâncias orgânicas”, “processo metabólico primário” e “processo metabólico celular” (Figura 4). Esses resultados foram confirmados com as análises de vias metabólicas geradas pelo KEGG, que mostrou a presença de genes codificadores de enzimas do metabolismo primário como, glicólise, metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos, metabolismo de amido, sacarose, frutose, galactose e manose.

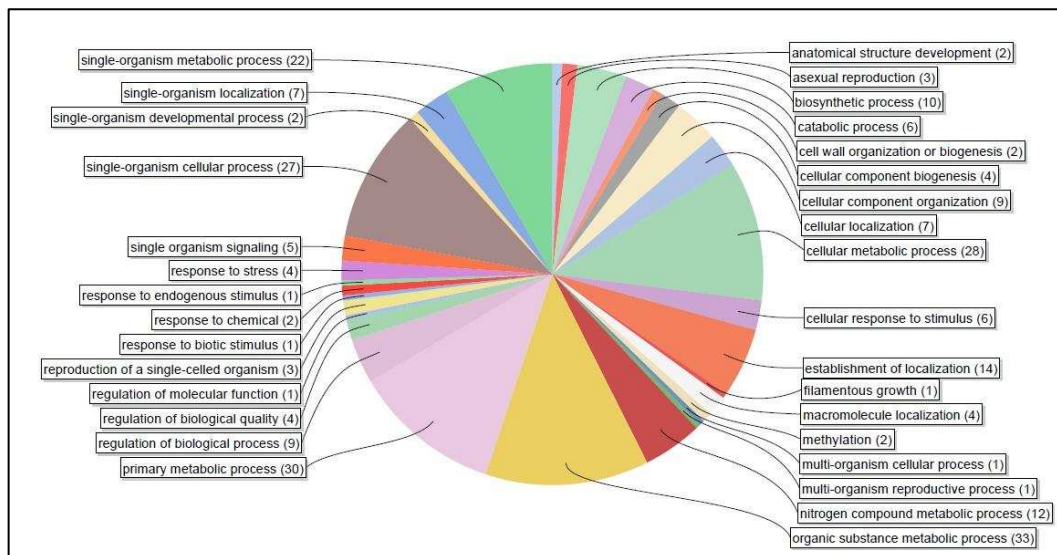


Figura 4: Distribuição dos termos GO para categoria “Processos Biológicos”.

Finalmente, na categoria “Componente Celular” os termos mais representados foram “parte celular”, seguido por “complexo de proteínas” e “organelas membranosas” (Figura 5). Essa análise corrobora com a ideia de que a atuação desses genes não está restrita a determinado compartimento celular, mas em toda a célula.

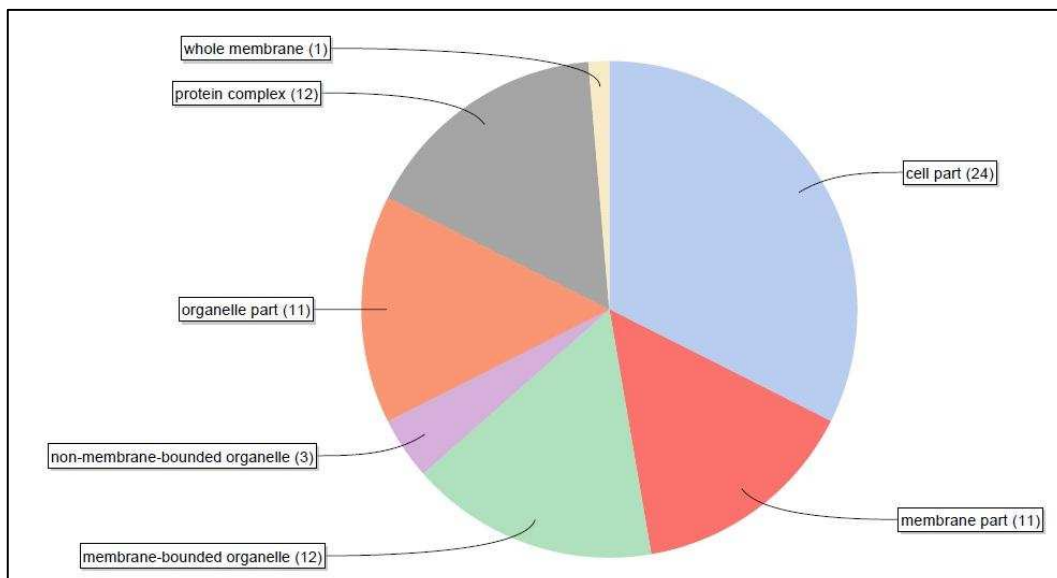


Figura 5: Distribuição dos termos GO para categoria “Componente Celular”.

A fim de ampliar o conhecimento das potenciais proteínas secretadas por *H. vastatrix*, as sequências foram submetidas ao *InterProScan* do EBI. Essa estratégia permite identificar domínios/motivos conservados nas proteínas. Apenas 18 sequências analisadas não apresentaram tais informações. Para as demais, existiram dados que melhoraram a qualidade da anotação e puderam ser aproveitados para a obtenção de informações mais aprofundadas sobre as sequências.

Baseado nos resultados de um BLASTp das sequências de proteínas secretadas, contra uma biblioteca de RNAseq da interação compatível do cafeeiro e *H. vastatrix* (raça XXXIII), foram selecionados 13 genes para a análise de expressão temporal (Tabela 1). A análise foi feita por meio da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR), nos tempos de 12 (amostra controle), 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai) de urediniósporos frescos em plantas de cafeeiro com genótipos resistentes (CIFC 832-1) e suscetíveis (Caturra) à *H. vastatrix* (raça XXXIII).

Quatro padrões diferentes de expressão foram observados. O grupo A é formado pelos genes EHv33-21, EHv33-25 e EHv33-29 (Figura 6A). Esses genes apresentaram padrões de expressão diferentes entre interações compatível e incompatível, sendo que, somente na interação incompatível houve aumento significativo de expressão do efector candidato.

O grupo B é formado pelos genes EHv33-19, EHv33-20, EHv33-23, , EHv33-24, EHv33-26 e EHv33-30 (Figura 6B). Para esses genes não foi observada diferença de expressão entre os genótipos resistentes e suscetíveis, ou seja, eles apresentaram diferença de expressão ao longo do tempo, mas o mesmo comportamento nas duas interações.

O grupo C é formado pelos genes EHv33-27 e EHv33-28 (Figura 6C) que também apresentaram diferenças de expressão entre as interações, no entanto, o aumento de expressão do efector candidato ocorreu apenas na interação compatível.



Tabela 1: Genes candidatos a efetores e seus oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises de PCR em tempo real (qRT-PCR). **Genes endógenos:** <sup>1</sup>citocromo c oxidase subunidade III, <sup>2</sup> $\beta$ -tubulina.

<b>Genes</b>	<b>Oligonucleotídeos Forward</b>	<b>Oligonucleotídeos Reverse</b>	<b>Comprimento do amplicon (pb)</b>	<b>Eficiência</b>
EHv33-18	AGAAATGGCCAAGCCACCTT	TCAGCGATTGAACTACCCCT	85	86,1
EHv33-19	GGTGTACTCCCTTTGCACAT	TGGTTGGTTTtagccctgtga	140	83,6
EHv33-20	TGGCAAACGGCACTATCACT	TTGCTGTGACCACCCCAAAA	99	98,7
EHv33-21	GCAGCGCATTCAAGAACGTA	CAATGGAGCAGCGCAAATCA	114	84,7
EHv33-22	TCGGTTGACGATGAACAGGT	TTGCCGCTCTCAATGGTACA	116	91,4
EHv33-23	TCTTTCCACAACCTTGGCTTGG	ATCAGCATCCACACCCTCATT	90	81,5
EHv33-24	TTGGCGAATCAGCTGGGTAA	ATATTCAGCGCCTGCTGGT	145	87,6
EHv33-25	AAGGAGGTTGTGGCCATTTCT	AGACTGCCATTCACTGACCA	129	90,9
EHv33-26	TCAACTTTGGGGATGCCTCTT	GGAGTTGTAGTTCAGGATCGGA	106	96,0
EHv33-27	AGCGTAATCCTGCCATCCAA	TCCAAACGTCTTACGCAGCA	82	92,9
EHv33-28	TGCCATTCAACTTGCTGTTGC	AATGGTTCCCATCATGAGCAG	105	107,3
EHv33-29	TGTCATGACTCTTCCGCCTT	TGCACCACAGAAAGCAGGTA	105	97,3
EHv33-30	TGCTGTTGCTCTATGTCGCT	GCAGCCAGGTACCATATCCTAT	95	98,6
<b><i>CytIII</i><sup>1</sup></b>	AGTAGATATGAGTCCCTGACC	CACCTTCAGCACTTACATCC	173	88,4
<b><i>Btub</i><sup>2</sup></b>	CTGGTGCCGGAAATAATTGG	TCAAGAGAATCACAGCCCTCG	95	96,5

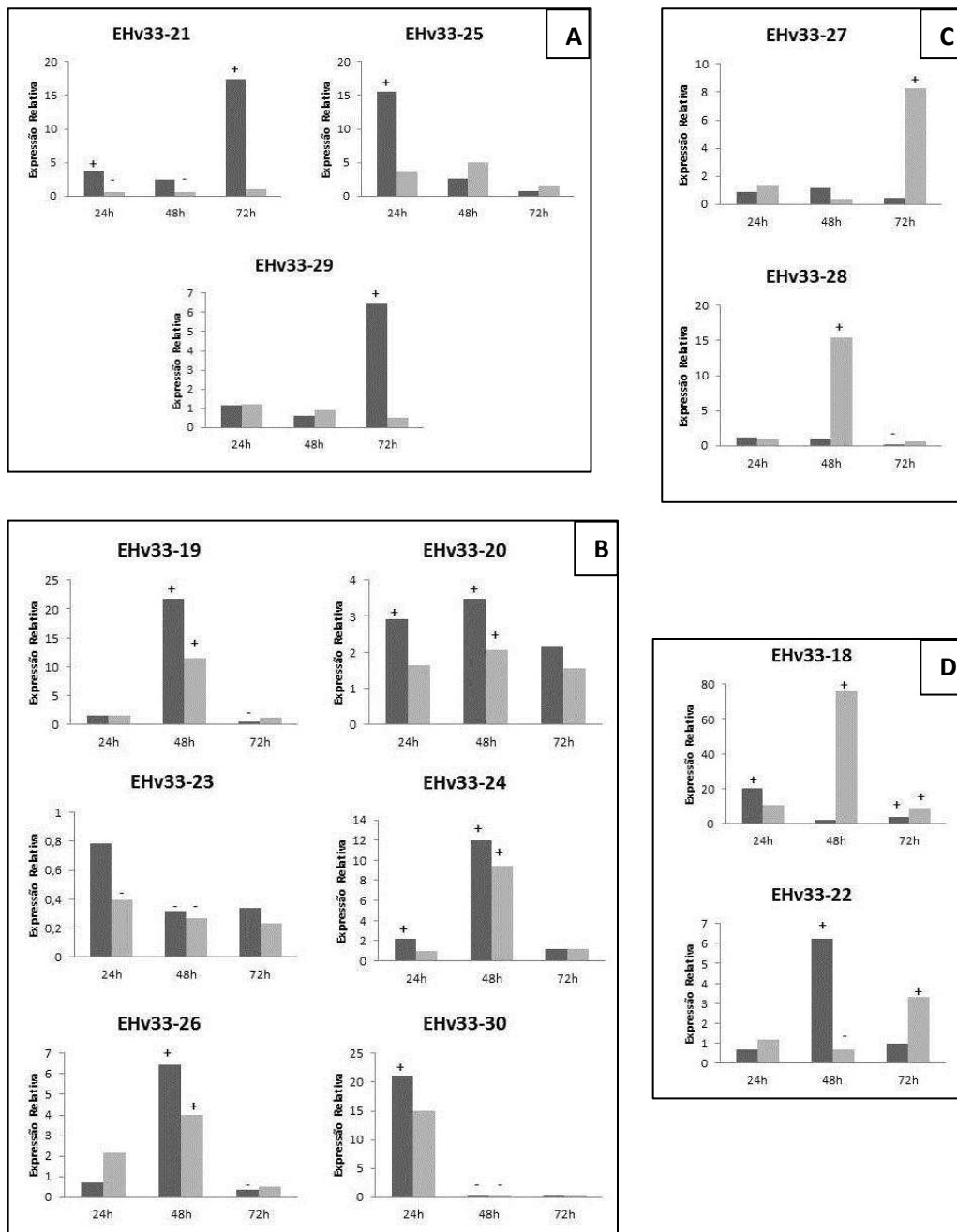


Figura 6: Análise de expressão por PCR em tempo real de 13 genes EHv33 que codificam proteínas secretadas em *H. vastatrix*. O padrão de expressão foi acessado em 24, 48 e 72 horas após a inoculação de urediniósporos frescos em plantas resistentes e suscetíveis. O nível de expressão dos genes alvos foi normalizado com dois genes endógenos de *H. vastatrix*: CytIII e  $\beta$ -tub. (A) genes que apresentaram diferença entre as interações, sendo somente a incompatível *up* regulada. (B) genes em que não foram observadas diferenças entre as interações (C) genes que apresentaram diferença entre as interações, sendo somente a compatível *up* regulada. (D) genes em que foi observada diferença temporal entre as interações. Sinais positivos (+) indicam regulação positiva (*up regulation*), sinais negativos (-) indicam regulação negativa (*down regulation*). Barras escuras representam o genótipo resistente (interação incompatível). Barras claras representam o genótipo suscetível (interação compatível).

No grupo D estão os genes EHv33-18 e EHv33-22 (Figura 6D), que apresentaram picos de expressão em tempos diferentes dependendo da interação. O gene EHv33-18, em genótipo resistente, apresentou o seu pico de expressão às 24 hai, enquanto que no genótipo suscetível o pico de expressão foi observado às 48 hai. Já para o gene EHv33-22, o maior nível de expressão foi observado às 48 hai em genótipo resistente e às 72 hai em genótipo suscetível.

## 6. DISCUSSÃO

A similaridade da maioria das proteínas candidatas a efetores com as proteínas de *Puccinia sp* e *Melampsora larici-populina* deve-se ao fato de que ambas as espécies de ferrugem possuem o mesmo estilo de vida biotrófico, pertencendo ao mesmo filo, *Basidiomycota*, e ordem, *Pucciniales*, que *H. vastatrix*. Sendo assim, é de se esperar que tenham um conjunto de proteínas similares. Além disso, *Puccinia* e *Melampsora* são organismos modelos e, portanto, apresentam uma ampla quantidade de dados de sequências disponíveis em bancos de dados, o que facilita as buscas.

O baixo número de termos GO extraído durante a categorização funcional indica que os genes analisados ainda não são bem caracterizados ou desconhecidos. A categoria mais representada, “Função Molecular”, sendo os termos “ligação a íons”, “ligação a compostos heterocíclicos” e “ligação a compostos do ciclo orgânicos” os mais frequente, foi condizente com os *Enzyme Codes* (EC) obtidos, sendo as classes enzimáticas hidrolases, transferases e as oxidurreductases, as mais representadas, respectivamente.

As enzimas hidrolases catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. Um exemplo são as proteases, enzimas que desempenham importantes funções em fitopatógenos como, nutrição, sinalização, degradação de parede celular e digestão de proteínas envolvidas na resposta de defesa da planta. Outro exemplo são as glicosídeos hidrolases (GH), responsáveis por catalisarem a hidrólise da ligação glicosídica para gerar moléculas de açúcares menores. Maia (2013), por meio da anotação de proteínas secretadas de urediniósporos germinados, constatou um reduzido número de proteínas similares a GH envolvidas com a degradação de parede celular vegetal. Segundo o autor, esse resultado pode ser

explicado pelo fato de que a penetração de *H. vastatrix* se dá de forma passiva, por meio dos estômatos, na face abaxial foliar. Por outro lado, nesse mesmo estudo foi identificado que a maioria das GH encontrados no secretoma de urediniósporos germinados possui especificidade com componentes da parede celular do fungo. Esse resultado é coerente com o fato de que, para a diferenciação do tubo germinativo, o fungo precisa romper localmente sua parede celular para que ocorra a alongação e, em seguida, a formação do apressório para penetrar o tecido vegetal (Coltinho *et al.*, 1993). Sendo assim, são enzimas fundamentais na etapa de pré-penetração do patógeno.

As transferases são enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais, como grupos amina, fosfato, acil, carboxil etc. Como exemplo, têm-se as quinases, que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para treonina, serina (quinase específica para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina (quinase específica para Tyr). As quinases são a maior família de proteínas em eucariotos e são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais da proteína até o controle transcricional (Silva *et al.*, 2009). Em patógenos oomicetos, que possuem estratégias de infecção similares a fungos (Morgan e Kamoun, 2007), Schornack *et al.* (2010) demonstraram que um efetor da classe CRN (CRN8), importantes efetores citoplasmáticos, possui um domínio com atividade quinase. A expressão transiente do efetor CRN8 *in planta* induziu a morte celular, sendo este mecanismo dependente de sua localização no núcleo da célula vegetal (Van Damme *et al.*, 2012).

As oxidoredutases catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxirredução. São as desidrogenases e as oxidases. Quando fitopatógenos atacam as plantas, fazem com que estas respondam de forma rápida com uma “explosão oxidativa”, que constituem na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Hu *et al.*, 2009). O acúmulo destas substâncias nas células vegetais pode ser tóxico para ambos os organismos (planta e agente estressor). O  $H_2O_2$  é a principal espécie reativa de oxigênio que aciona moléculas para a indução de genes de defesa e a polimerização de proteínas que compõe a parede

celular, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas ou de limpeza (Lukasik *et al.*, 2012). Existe uma variedade de enzimas oxidativas que irão decompor estas espécies reativas de oxigênio. Dentre elas tem-se superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GSH), peroxiredoxina (Prx), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO), entre outras (Mittler, 2002).

A partir dos resultados do BLASTp das potenciais proteínas efetoras de *H. vastatrix* contra uma biblioteca de RNAseq da interação compatível do cafeeiro e *H. vastatrix* (raça XXXIII), foram selecionados 13 genes para a análise de expressão temporal sendo obtidos quatro padrões diferentes de expressão.

O padrão de expressão do grupo A, em que ficaram os genes que apresentaram padrões de expressão diferentes entre interações compatível e incompatível, sendo que, somente na interação incompatível houve aumento significativo de expressão do efetor candidato, sugere que os genes estejam relacionados com a tentativa de sobrevivência do fungo ao mecanismo de resistência da planta. O gene EHv33-25, foi *up* regulado na etapa inicial da infecção, às 24 hai, enquanto que os genes EHv33-21 e EHv33-29, foram *up* regulados às 72 hai. Somente o último gene apresentou similaridade com sequência da biblioteca de RNAseq de 12 hai, indicando ser realmente um gene expresso, também em interação compatível. Esse dado sugere que esse efetor é importante para a infecção do patógeno e, portanto, é expresso nas duas interações, no entanto, na interação incompatível ele atua de forma a tentar suplantar a resistência, aumentando significativamente sua expressão às 72 hai.

Guimarães *et al.* (2015), analisando o fluido apoplástico de folhas de cafeeiro resistente e suscetível, observaram que ao longo do processo de infecção de *H. vastatrix* ocorrem duas fases distintas de resposta de defesa da planta. Uma fase inicial/basal (24 e 48 hai) e outra tardia/específica (72 e 96 hai). Comparado com o genótipo suscetível, o resistente foi associado a um maior número de proteínas na fase tardia/específica. A resposta de resistência envolveu vários tipos de proteínas como as glicosídeos hidrolases (GH) da parede celular, proteases de serina (subtilases e carboxipeptidases) e proteínas relacionadas à patogênese (PR). Tal resposta pode ser responsável por ativar genes no patógeno, como os dois efetores candidatos analisados nesse trabalho, EHv33-21 e EHv33-29, que apresentaram aumento significativo de expressão às 72 hai, com o intuito de

“combater” essas proteínas envolvidas na resistência do cafeeiro. Para o gene EHv33-21 foram obtidos dois termos GO na categoria “Componente Celular” durante a anotação funcional, sendo eles, membrana interna mitocondrial (GO:0005743) e componente integral de membrana mitocondrial (GO:0032592). A membrana interna mitocondrial é altamente especializada e contém proteínas importantes, como aquelas que conduzem as reações de oxidação da cadeia respiratória e a ATP sintase, que produz ATP, molécula fonte de energia. Tais resultados são coerentes, partindo do pressuposto de que o fungo necessita de mais energia na tentativa de suplantação da resistência da planta.

Seguindo esse raciocínio, de que o fungo responde ao mecanismo de resistência da planta, ao contrário da resistência pós-haustorial que é geralmente descrita para interações cafeeiro-*H. vastatrix* (Silva *et al.*, 2002, Ramiro *et al.*, 2009), nesse estudo pode-se observar que a análise de expressão do gene candidato a efector EHv33- 25, indica uma resposta de resistência pré-haustorial, assim como o observado por Lopes (2015) em sua análise citológica da infecção de *H. vastatrix* (raça XXXIII) no cafeeiro. Esse resultado mostra que a comunicação entre o fungo e a resposta de defesa do hospedeiro pode ocorrer também logo no início do processo infeccioso, ainda durante a fase de germinação dos esporos.

No grupo B não foi observada diferença de expressão dos genes entre os genótipos resistentes e suscetíveis, ou seja, eles apresentaram diferença de expressão ao longo do tempo, mas o mesmo comportamento nas duas interações. Foi observado um aumento da expressão dos genes nas horas iniciais de infecção (24 e 48 hai), exceto o gene EHv33-23, que foi regulado negativamente às 48 hai. No estágio mais avançado, às 72 hai, os níveis de expressão foram reduzidos drasticamente, o que demonstra o papel importante desses genes, provavelmente com a supressão da resposta de defesa da planta durante a penetração por meio do estômato, no reconhecimento do hospedeiro e/ou na fase inicial da colonização.

O gene EHv33-19 apresentou três termos GO, dois na categoria “função molecular”, como proteína com atividade quinase (GO:0004672) e ligação de ATP (GO:0005524), e um na categoria “Processos Biológicos”, como proteína de fosforilação (GO: 0006468). Esse resultado foi confirmado com o *InterProScan*, em que foi observado um domínio quinase para esse gene. O gene EHv33-20 apresentou dois termos GO na categoria “Função Molecular” como ligação a

dinucleotídio adenina flavina (GO:0050660) e atividade de oxirredutase (GO:0016614), e um termo na categoria “Processos Biológicos”, como processos de oxirredução (GO:0055114). Para o gene EHv33-23 foi obtido um termo GO na categoria “Função Molecular”, como atividade de transferase de proteína ubiquitina (GO:0004852). O resultado foi confirmado com o *InterProscan* que mostrou motivo conservado pertencente às famílias de ubiquitina ligase. As ubiquitinas desempenham função importante na regulação de proteínas, elas “marcam” proteínas indesejadas para que sejam degradadas. Para o gene EHv33-24 foram obtidos dois termos GO na categoria “Componente Celular”, como proteína de membrana (GO:0016020), e “Função Molecular” como ligação de íons cálcio (GO:0005509). Tais termos contribuem com a ideia de que esses genes estão envolvidos nos eventos iniciais da infecção, em que ocorre intensa atividade de oxirredução, para “combater” as espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas durante a “explosão oxidativa”, além dos processos envolvidos no metabolismo primário. Tais resultados confirmam a expressão desses genes durante as horas iniciais da infecção, visto que, somente dois desses genes (EHv33-20 e EHv33-26) não apresentaram similaridade com sequências da biblioteca de RNAseq, para os demais houve similaridades com a biblioteca de 12 e/ou 24 hai.

Estudos citológicos do processo infeccioso de *H. vastatrix*, utilizando o mesmo patossistema (*H. vastatrix* raça XXXIII e cafeeiro Caturra e CIFC 832/1, suscetível e resistente, respectivamente), mostraram que nas horas iniciais de infecção, os esporos (quando frescos) apresentam alta taxa de germinação (75%), sendo que 24 hai, grande parte dos esporos (50%) já diferenciou apressório sobre o estômato. Comparações entre plantas resistentes e suscetíveis indicaram não haver diferença nesses valores, uma vez que estes eventos iniciais dependem do reconhecimento da superfície do hospedeiro (Lopes, 2015). Tal fato é condizente com as análises de expressão dos genes do grupo B, em que foram observados poucos padrões diferentes de níveis de expressão entre as interações nas horas iniciais de infecção, às 24 e 48 hai. De acordo com Lopes (2015), o estágio de hifa de penetração é o que ocorre com a mais alta frequência, tanto nas folhas resistentes quanto nas suscetíveis, às 24 hai. Entretanto, em estádios mais avançados da infecção, o crescimento do fungo é significativamente maior na folha suscetível, sendo encontradas várias células mãe do haustório (CMH) com

haustórios e hifas intercelulares. Ao contrário, na planta resistente, a maioria dos sítios de infecção permanece como hifa de penetração. Sendo assim, é razoável inferir que nas etapas iniciais de infecção pode ocorrer um aumento da expressão (*up regulation*) de genes relacionados à modulação da parede celular fúngica. Estas mudanças morfológicas durante o processo de infecção também podem estar correlacionadas com as variações do perfil de expressão dos genes candidatos a efetores analisados nesse estudo.

A importância dos eventos iniciais da interação planta-patógeno observada nesse estudo, também foi demonstrada em outros trabalhos. Nos urediniósporos e no tubo germinativo de *Uromyces vicia-fabae*, agente causal da ferrugem da fava, foi observado que a matriz extracelular contém enzimas hidrolíticas como esterases, lipases e hidrolases, que podem desempenhar papel importante na diferenciação e no desenvolvimento do fungo na etapa de pré-penetração (Deising *et al.*, 1992; Braun & Howard, 1994). O gene de avirulência *AvrM* de *M. lini* é induzido durante a germinação dos urediniósporos *in vitro* (Catanzariti *et al.*, 2006). Já 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).

Proteínas glicosídeo hidrolases (GH) foram identificadas por Maia (2013) em seu estudo de efetores durante as horas iniciais da germinação de esporos de *H. vastatrix*. Tais proteínas tem especificidade por componentes da parede celular do fungo, podendo estar envolvidas com a modelagem das estruturas da parede celular do patógeno durante as horas iniciais de infecção, em que ocorre a diferenciação e alongação do tubo germinativo. Hidrolases como quitina deacetilases, proteases, lipases, superóxido dismutase (SOD) e dissulfeto isomerase, também foram identificadas nas horas iniciais de germinação de esporos. Essas proteínas desempenham papel importante na patogenicidade do fungo e podem estar sendo representadas pelos genes do grupo B, que apresentaram maior nível de expressão nas horas iniciais da infecção em ambos os genótipos. Padrões de expressão similares ao mencionado, durante as etapas iniciais de infecção, foram observados em genes efetores de *Colletotrichum higginsianum*, fungo que infecta *Arabidopsis*. Nessa etapa, a regulação é mais



refinada, sendo os genes regulados positivamente para a preparação do ingresso na célula hospedeira (Kleemann *et al.*, 2012).

No grupo C, formado pelos genes que também apresentaram diferenças de expressão entre as interações, no entanto, o aumento de expressão do efetor candidato ocorreu apenas na interação compatível, o gene EHv33-28 foi *up* regulado às 48 hai e o gene EHv33-27 foi *up* regulado às 72 hai. Ambos os genes foram identificados na biblioteca de RNAseq, sendo que o gene EHv33-27 foi observado nas duas bibliotecas, 12 e 24 hai, e o gene EHv33-28 apenas na de 12 hai.

Após a formação do apressório sobre o estômato, o fungo se diferencia em uma hifa de penetração que forma a CMH, a partir da qual os haustórios primários são formados dentro das células subsidiárias e adjacentes dos estômatos. Quando a hifa de penetração chega ao mesófilo, ocorre o desenvolvimento de uma vesícula típica em forma de âncora na câmara subestomática. De cada ponta dos ramos da ancora, novas CMH são formadas, a partir das quais haustórios secundários são produzidos nas células do mesófilo (Ramiro *et al.*, 2009). Nos tempos de 48 e 72 hai, em genótipos suscetíveis, todas essas estruturas já são observadas na maioria dos sítios de infecção. Por outro lado, em genótipos resistentes, o crescimento do fungo cessa em diferentes etapas, com maior frequência no estágio de CMH com formação de poucos haustórios (Silva *et al.*, 2002).

Não foram obtidos termos GO para os genes pertencentes a esse grupo, porém, é possível inferir que esses genes estejam envolvidos na fase biotrófica da infecção, que é caracterizada pelo aumento da expressão de efetores e de enzimas do metabolismo secundário (O'Connell *et al.*, 2012). Candidatos a efetores expressos durante a fase biotrófica da infecção de *H. vastatrix* em cafeeiro foram identificados por Maia (2013), por meio da análise de expressão temporal de genes, utilizando a técnica de RT-PCR. Entre os candidatos, estão genes homólogos à RTP1 (*Rust Transferred Protein*) de *Uromyces fabae*, proteínas que são expressas nos haustórios e translocadas para o citoplasma da célula vegetal (Kemen *et al.*, 2005). 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).

No grupo D estão os genes que apresentaram picos de expressão em tempos diferentes dependendo da interação. Pode-se observar que para ambos os genes, EHv33-18 e EHv33-22, a expressão é mais tardia na interação compatível. A resistência de plantas a patógenos pode depender da velocidade e da extensão da síntese de uma ou mais enzimas induzidas no hospedeiro pelo patógeno (Agrios, 2005).

Em interações incompatíveis, as respostas de defesa devem ser rapidamente ativadas para prevenir o crescimento do fungo no interior dos tecidos do hospedeiro. Tem sido frequentemente observado, que certos compostos fenólicos, que são tóxicos aos patógenos, são produzidos e acumulados a uma velocidade mais rápida, após a infecção, em variedades resistentes de plantas do que em variedades suscetíveis. Uma enzima que geralmente exhibe aumento da atividade ou maior número de novas sínteses em tecidos doentes é a FAL (fenilalanina-amônia-liase). Essa é a enzima chave na produção da molécula base usada para a biossíntese da maioria dos compostos fenólicos, incluindo fitoalexinas e ligninas. A FAL já foi isolada de algas, fungos e principalmente de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células bacterianas ou tecidos animais (Schwan-Estrada *et al.*, 2008).

O estudo citológico da infecção de *H. vastatrix* (raça XXXIII) em cafeeiro mostrou que as primeiras respostas citológicas induzidas pelo fungo são observadas nas células estomáticas de ambos os genótipos, resistentes e suscetíveis, às 17 hai e correspondem à morte celular e ao acúmulo de compostos fenólicos. No genótipo resistente, estas respostas foram observadas em 18% dos sítios de infecção às 17 hai, alcançando 65, 73 e 83% às 24, 48 e 72 hai, respectivamente. No genótipo suscetível, tais respostas foram observadas em cerca de 30% dos sítios de infecção, desde as 17 até às 72 hai (Lopes, 2015). Dessa forma, as observações citológicas sugerem que a resistência de CIFC 832/1 à raça XXXIII de *H. vastatrix* é pré-haustorial. No presente trabalho, dois genes candidatos a efetores, EHv33-25 e EHv33-18, confirmam os dados citológicos. Diniz *et al.* (2012), sugerem que a rápida resposta de resistência, impede a formação do haustório, e isso pode ser a base para a durabilidade da resistência.

Para o gene EHv33-22 foram obtidos dois termos GO na categoria “Componente Celular”, como componente integral de membrana (GO:0016021) e transporte mediado por vesícula (GO:0016192). Tais termos poderiam indicar ser

gene relacionado ao transporte de proteínas efetoras, entretanto, pouco ainda se sabe sobre o tráfego de efetores para fungos. Sabe-se que alguns efetores apresentam motivos especiais em sua cadeia que utilizam a própria maquinaria da planta para penetrarem no interior da célula. No entanto, estes processos ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo necessários novos métodos que permitam a detecção e a visualização do tráfego destes efetores até a célula hospedeira (Petre & Kamoun, 2014).

As análises de expressão gênica temporal mostraram um perfil de expressão dinâmico e coerente com outros trabalhos realizados, apresentando novas informações sobre proteínas do fungo envolvidas na interação *H. vastatrix* e cafeeiro. Essas informações foram úteis para ampliar o conhecimento e inferir possíveis funções desempenhadas por essas proteínas nos diferentes tempos de interação. Contudo, torna-se um grande desafio demonstrar a verdadeira função biológica de genes candidatos a proteínas efetoras. O conhecimento das proteínas efetoras fornecem dados que auxiliarão o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controle de doenças em plantas. As informações obtidas nesse trabalho são inéditas e um grande passo inicial para vencer esse desafio.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. “Plant Pathology”, 5ª edição, Elsevier, pp 922. 2005.

ANTHONY, F., BERTRAND, B., QUIROS O., WILCHES, A., LASHERMES, P., BERTHAUD, J., CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica*. 118: 53-65. 2001.

ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN G. M., SHERLOCK, G. Gene Ontology: tool for unification of biology. *Nature*. 25: 25-29. 2000.

BETTENCOURT, A. J., RODRIGUES, JR. C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: (Clarke, R. J., Macrae, R. Eds) London and New York: Coffee Agronomy, 199-234, 4v. Elsevier Applied Scienci. 1988.

BRAUN, E. J., HOWARD, R. J. Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. *Protoplasm* 181: 202-212. 1994.

CABRAL, P. G. C., ZAMBOLIM, E.M., ZAMBOLIM, L., LELIS, T. P., CAPUCHO, A. S., CAIXETA, E. T. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*. 4: 129-130. 2009.

CARDOSO, R. M. L., ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G. M. Novas raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* identificadas em cafeeiros com genótipos complexos, no Estado de Minas Gerais. *Anais, 12º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu MG, IBC/ GERCA*. 126-127. 1981.

CAPUCHO, A. S., CAIXETA, E. T., ZAMBOLIM, E. M. & ZAMBOLIM, L. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à ferrugem do cafeeiro. *Pesq. Agrop. Bras., Brasília*. 44: 276-282. 2009.

CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, E. M.; FREITAS, R. L.; HADDAD, F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, L. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Note*. 7:189-191. 2012.

CATANZARITI, A. M., DODDS, P. N., LAWRENCE, G. J., AYLIFFE, M. A., ELLIS, J. G. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell*. 18: 243–256. 2006.

CATANZARITI, A. M., DODDS, P. N., VE, T., KOBE, B., ELLIS, J. G., STASKAWICZ, B. J. The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. *Mol. Plant Microbe Interact*. 23: 49–57. 2010.

CARVALHO V. L., CUNHA R. L., CHALFOUN S. M. Manejo ecológico das principais doenças do cafeeiro. *Informe Agropecuário*. 23: 101-114. 2002.

CARVALHO, C. R., FERNANDES, R. C., CARVALHO, G. M. A., BARRETO, R. W., & EVANS, H. C. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS One*, 6(11), e26387.2011.

COUTINHO, T. A., RIJKENBERG, F. H. J., & VAN ASCH, M. A. J. Appressorium formation by *Hemileia vastatrix*. *Mycological Research*, 97(8), 951-956. 1993.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 21: 3674-3676, 2005.

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

DEISING, H., NICHOLSON, R. L., HAUG, M., HOWARD, R. J., MENDGEN, K. 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. 1992.

DINIZ, I., TALHINHAS, P., AZINHEIRA, H. G., VÁRZEA, V., MEDEIRA, C., MAIA, I., PETITOT, A. S., NICOLE, M., FERNANDEZ, D., SILVA, M. C. 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*, v. 133, n. 1, p. 141-157, 2012.

DINIZ, I. I. P., DOS, S. Respostas celulares e moleculares em interações hospedeiras e não hospedeiras cafeeiro-ferrugem (*Hemileia vastatrix* e *Uromyces vignae*). 75 f. dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) – Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. 2010.

DJULIC, A., SCHMID, A., LENZ, H., SHARMA, P., KOCH, C., WIRSEL, S. G., & VOEGELE, R. T. Transient transformation of the obligate biotrophic rust fungus *Uromyces fabae* using biolistics. *Fungal biology*, 115(7), 633-642. 2011.

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

DODDS, P. N., LAWRENCE, G. J., CATANZARITI, A. M., TEH, T., WANG, C. I., AYLIFFE, M. A., & ELLIS, J. G. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8888-8893. 2006.

DODDS, P. N., RAFIQI, M., GAN, P. H. P., HARDHAM, A. R., JONES, D. A., ELLIS, E. G. Effectores of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist*. 183: 993-1000. 2009.

DE WIT, P. J. G. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2726–2732. 2007.

ELLIS, J. G., RAFIQI, M., GAN, P., CHAKRABARTI, A., DODDS, P. N. 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. 2009.

ELLIS, J. G., DODDS, P. N., LAWRENCE, G. J. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 289–306. 2007.

EPAMIG 2015. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. In: <http://www.epamig.br/>. Acesso em: 07 de julho de 2015.

FAZUOLI, L.C., MEDINA FILHO, H.P., GONÇALVES, W., GUERREIRO, FILHO, O., SILVAROLLA, M.B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas. pp.163-215 In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) *O estado da arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2002.

FERNANDES, R.C., EVANS, H.C., BARRETO, R.W. “Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination”, *Tropical Plant Pathology*, 34, 108-113. 2009.

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advanced Genetics*, 8: 29-54. 1956.

GUIMARÃES, L. G., TENENTE, R., PINHEIRO, C., CHAVES, I., SILVA, M. C., CARDOSO, F. N. H., PLANCHON, S., BARROS, D. R., RENAUT, J., RICARDO, C. P. Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Frontiers in Plant Science*. Volume 6. 2015.

GOTZ, S., GARCIA-GOMEZ, J. M., TEROL, J., WILLIAMS, T. D., NAGARAJ, S. H., NUEDA, M. J., ROBLES, M., TALON, M., DOPAZO, J., and CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the BLAST2GO suite. *Nucl. Acids Res.* 36: 3420-3435. 2008.

GUZZO S. D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. 236f. Tese (Doutorado em Ciências/ Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

HARRIS, C. J., SLOOTWEG, E. J., GOVERSE, A., BAULCOMBE, D. C. Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 21189–21194. 2013.

HEATH, M. C. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*. 44(3): 321-334. 2000.

HOGENHOUT, S. A., VAN DER HOORN, R. A., TERAUCHI, R., KAMOUN, S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe interactions* 22(2): 115-122. 2009.

HU, Z.; SHEN, Y.; SHEN, F.; SU, X. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* ‘Opera 8277’ leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 31, p. 995-1002, 2009.

IOC 2013. International Coffee Organization. In: <http://www.ico.org>. Acessado em: 25 de abril de 2015.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. 2006.

KEMEN, E., KEMEN, A. C., RAFIQI, M., HEMPEL, U., MENDGEN, K., HAHN, M., & VOEGELE, R. T. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(11), 1130-1139. 2005.

KEMEN, E., KEMEN, A., EHLERS, A., VOEGELE, R., MENDGEN, K. A novel structural effector from rust fungi is capable of fibril formation. *Plant J.* 75: 767–780. 2013.

KVITKO, B. H., PARK, D. H., VELÁSQUEZ, A. C., WEI, C. F., RUSSELL, A. B., MARTIN, G. B., SCHNEIDER, D. J., COLLMER, A. Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog*, 5(4), e1000388. 2009.

LAWRENCE, G. J., DODDS, P. N., ELLIS, J. G. Transformation of the flax rust fungus, *Melampsora lini*: selection via silencing of an avirulence gene. *Plant J.* 61, 364–369. 2010.

LOPES, R. L. F. Análise Citológica e Perfil de Expressão Gênica de *Hemileia vastatrix* (RaçaXXXIII) na Interação Com o Cafeeiro. Tese de doutorado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa. 2015.

LUKASIK, I., GOLAWSKA, S., WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 21, p. 1937-1941, 2012.

MAIA, T.A., ZAMBOLIM, E.M., CAIXETA, E.T., MIZUBUTI, E.S.G., ZAMBOLIM, L. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology* 42, 533–42. 2013.

MAIA, T.A. Identificação e Análise Funcional de Efetores de *Hemileia vastatrix*, Agente Causal da Ferrugem do Cafeeiro. Tese de doutorado em Fitopatologia. Universidade federal de Viçosa. 2013.

MATIELLO, J. B. & ALMEIDA, S. R. Variedades de café: como escolher, como plantar. Rio de Janeiro: MMA, SDR, PROCAFÉ & PNFC. 64p. 1997.



MATIELLO, J. B., ALMEIDA, S. R. A ferrugem do cafeeiro no Brasil e seu controle. MAPA/PROCAFÉ. 98p. 2006.

MENDGEN, K., HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. Trends in plant Science 7(8): 352-356. 2002.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in PlantScience, v. 7, p. 405-410, 2002.

MIYA, A., ALBERT, P., SHINYA, T., DESAKI, Y., ICHIMURA, K., SHIRASU, K., NARUSAKA, Y., KAWAKAMI, N., KAKU, H. & SHIBUYA, N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 19613–19618. 2007.

MORGAN, W., KAMOUN, S. RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. Curr Opin Microbiol 10: 332–338. 2007.

NIRMALA, J., DRADER, T., CHEN, X., STEFFENSON, B., KLEINHOF, A. Stem rust spores elicit rapid RPG1 phosphorylation. Molecular Plant-Microbe Interactions 23(12): 1635-1642. 2010.

NIRMALA, J., DRADER, T., LAWRENCE, P. K., YIN, C. T., HULBERT, S., STEBER, C. M, STEFFENSON, B. J., SZABO, L. J., VON WETTSTEIN, D., KLEINHOF, A. 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. 2011.

NUNES, C.C., MAFFIA, L.A., MIZUBUTI, E.S.G., BROMMONSCHENKEL, S.H., SILVA, J.C. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. Australasian Plant Pathology 38, 445–52. 2009.

O'CONNELL, R.J., THON, M.R., HACQUARD, S., AMYOTTE, S.G., KLEEMANN, J., TORRES, M.F., DAMM, U., BUIATE, E.A., EPSTEIN, L., ALKAN, N., ALTMULLER, J., ALVARADO-BALDERRAMA, L., BAUSER, C.A., BECKER, C., BIRREN, B.W., CHEN, Z., CHOI, J., CROUCH, J.A., DUVICK, J.P., FARMAN, M.A., GAN, P., HEIMAN, D., HENRISSA, T. B., HOWARD, R.J., KABBAGE, M., KOCH, C., KRACHER, B., KUBO, Y., LAW, A.D., LEBRUN, M.H., LEE, Y.H., MIYARA, I., MOORE, N., NEUMANN, U.,

NORDSTROM, K., PANACCIONE, D.G., PANSTRUGA, R., PLACE, M., PROCTOR, R.H., PRUSKY, D., RECH, G., REINHARDT, R., ROLLINS, J.A., ROUNSLEY, S., SCHARDL, C.L., SCHWARTZ, D.C., SHENOY, N., SHIRASU, K., SIKHAKOLLI, U.R., STUBER, K., SUKNO, S.A., SWEIGARD, J.A., TAKANO, Y., TAKAHARA, H., TRAIL, F., VAN DER DOES, H.C., VOLL, L.M., WILL, I., YOUNG, S., ZENG, Q., ZHANG, J., ZHOU, S., DICKMAN, M.B., SCHULZE-LEFERT, P., VER LOREN VAN THEMAAT, E., MA, L.J., VAILLANCOURT, L.J. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* 44(9): 1060-1065. 2012.

PANWAR, V., MCCALLUM, B., BAKKEREN, G. Endogenous silencing of *Puccinia triticina* pathogenicity genes through in planta-expressed sequences leads to the suppression of rust diseases on wheat. *Plant J.* 73: 521–532. 2013.

PETRE, B. & KAMOUN, S. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells. *PLoS Biology* 12 (2): e100180. 2014.

PEREIRA, A.A., SAKIYAMA, N.S., ZAMBOLIM, L., MOURA, W.M., ZAMBOLIM, E.M. & CAIXETA, E.T. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust in the UFV/EPAMIG breeding program. pp.215- 232 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M. & VARZEA, V.M.P. (Eds.) Durable resistance to coffee leaf rust. ViçosaMG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.

PORTO, N. B., CAIXETA, E. T., VIDIGAL, P. M. P., LELIS, D. T., ZAMBOLIM, E. M., ZAMBOLIM, L., RESENDE, M. L. V. Predição do Secretoma de *Hemileia vastatrix* Raça XXXIII. IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Curitiba - PR 2015.

PRETSCH, K., KEMEN, A., KEMEN, E., GEIGER, M., MENDGEN, K., VOEGELE, R. The rust transferred proteins-a new family of effector proteins exhibiting protease inhibitor function. *Mol. Plant Pathol.* 14: 96–107. 2013.

RAFIQI, M., ELLIS, J. G., LUDOWICI, V. A., HARDHAM, A. R., DODDS, P. N. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 477–82. 2012.

RAJENDREN, R. B. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. *Nature* 213: 105-106. 1967.

RAMIRO, D. A., ESCOUBE, J., PETITOT A. S., NICOLE, M., MALUF M. P., FERNANDEZ, D. 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. 2009.

RAVENSDALE, M., BERNOUX, M., VE, T., KOBE, B., THRALL, P. H., ELLIS, J. G. DODDS, P. N. Intramolecular interaction influences binding of the Flax L5 and L6 resistance proteins to their AvrL567 ligands. *PLoS Pathog.* 8:e1003004. 2012.

RODRIGUES, C. J., BETTENCOURT, A. J., RIJO, L.. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual Review of Phytopathology.* 13: 49-70. 1975.

RODRIGUES, C. J. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and 4 host resistance. *Fitopatologia Brasileira.* 15: 5-9. 1990.

SEGRETIN, M. E., PAIS, M., FRANCESCETTI, M., CHAPARRO-GARCIA, A., BOS, J. I., BANFIELD, M. J. et al. Single amino acid mutations in the potato immune receptor R3a expand response to *Phytophthora* effectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27: 624–637. 2014.

SERA, T.; SERA, G.H.; ITO, D.S.; DOI, D.S. Coffee breeding for durable resistance to leaf rust disease at Instituto Agronômico do Paraná. pp.187-214 In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M., VARZEA, V.M.P. (Eds.) Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F., LEITE, B., STANGARLIN, J.R., CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.* Piracicaba: FEALQ. p.227-248. 2008.

SCHORNACK, S., VAN DAMME, M., BOZKURT, T.O., CANO, L.M., SMOKER, M., THINES, M., GAULIN, E., KAMOUN, S., HUITEMA, E. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(40): 17421-17426. 2010.

SILVA, M.C., VÁRZEA, V., GUIMARÃES, L.G., AZINHEIRA, H.G., FERNANDEZ, D., PETITOT, A., BERTRAND, B., LASHERMES, P., NICOLE,

M. "Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 119-147. 2006.

SILVA, B. V., HORTA, B. A. C., ALENCASTRO, R. B., PINTO, A. C.. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química nova*. Vol. 32, N° 2, 453-462, 2009.

SILVA, M. B., JUNIOR, W. C. J. Monitoramento espaço-temporal: uma ferramenta no manejo Integrado de doenças. In: ZAMBOLIM, L. (Ed). *Manejo integrado. Doenças pragas e plantas daninhas*. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema Gráfica e Editora LTDA. P. 127- 168. 2000.

SILVA, M. C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES JÚNIOR, C. J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London. 60: 169-183, 2002.

STERGIOPOULOS, I., De WIT, P. J. G. M. Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 233-63. 2009.

UPADHYAYA, N. M., MAGO, R., STASKAWICZ, B. J., AYLIFFE, M. A., ELLIS, J. G., DODDS, P. N. A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. *Mol. Plant Microbe Interact*. 27: 255–264. 2014.

VÁRZEA, V. M. P., RODRIGUES, JR. C. J., SILVA, M. C., GOUVEIA, M., MARQUES, D. V., GUERRA-GUIMARÃES, L., RIBEIRO, A. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: *O estado da arte da tecnologia na produção de café*. ZAMBOLIM, L., (Ed.). Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 270-320. 2002.

VÁRZEA, V. M. P.; MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M.; VÁRZEA, V.M.P. (Ed.). *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa: UFV. 53-74. 2005.

VAN DAMME, M., BOZKURT, T.O., CAKIR, C., SCHORNACK, S., SKLENAR, J., JONES, A.M.E., KAMOUN, S. The irish potato famine pathogen translocates the CRN8 kinase into host plant cells. *PLoS Pathogens* 8(8): e1002875. 2012.

VE, T., WILLIAMS, S. J., CATANZARITI, A. M., RAFIQI, M., RAHMAN, M., ELLIS, J. G., HARDHAM, A. R., JONES, D. A., ANDERSON, P. A., DODDS, P. N., KOBE, B. Structures of the flax-rust effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), 17594-17599. 2013.

VENTURA, J. A., COSTA, H., SANTANA, E. N., MARTINS, M. V. V. Diagnóstico e manejo das doenças do cafeeiro conilon. In: FERRÃO, R. G., FONSECA, A. F. A., BRAGANÇA, S. M., FERRÃO, M. A. G. & MUNER, L. H. (Eds.) *Café conilon*. Vitória –ES. INCAPER. 451-497. 2007.

VIEIRA, A., TALHINHAS, P., LOUREIRO, A., DUPLESSIS, S., FERNANDEZ, D., SILVA, M. C., PAULO, O. S., AZINHEIRA, H. G. 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. 2011.

WANG, C. I. A., GUNČAR, G., FORWOOD, J. K., TEH, T., CATANZARITI, A. M., LAWRENCE, G. J., LOUGHLIN, F. E., MACKAY, J. P., SCHIRRA, H. J., ANDERSON, P. A., ELLIS, J. G., DODDS, P. N., KOBE, B. Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and-D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity. *The Plant Cell*, 19(9), 2898-2912. 2007.

WARD, M. "On the morphology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (the fungus of the coffee disease of Ceylon)". *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 22, 1-11. 1882.

WIN, J., CHAPARRO-GARCIA, A., BELHAJ, K., SAUNDERS, D. G. O., YOSHIDA, K., DONG, S., SCHORNACK, S., ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., HOGENHOUT, S. A., KAMOUN, S. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 77, pp. 235-247). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012.

ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredósporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseolityca* Arth. *Experientiae*. 17: 151-184. 1974.

ZAMBOLIM, L. (Ed.) Tecnologia para produção do café conilon. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 360 p. 2009.

ZAMBOLIM, L., ZAMOBOLIM, E. M., DO VALE, F. X. R., PEREIRA, A. A., CHAVES, G. M. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: Produção de café com qualidade (Zambolim, L. Ed.). Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 134-215. 1999.

ZAMBOLIM, L., VALE, F. X. R. do, COSTA, H., PEREIRA, A. A., CHAVES, G. M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa, MG: UFV, 369-450. 2002.

ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., VALE, F. X. R., PEREIRA, A. A., SAKYAMA, N. S., CAIXETA, E. T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. In Brazil-Physiological variability, current situation and future prospect. In: Zambolim, L., M. ZE, Vársea M. P. V. eds. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa-UFV. 75-98. 2005.

ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., PEREIRA, A.A. & CHAVES, G.M. Café (*C. arabica* L.). Controle de doenças. In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.) Controle de doenças de plantas. Grandes culturas. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. Volume 1. 1997.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1-8. 2016.

ZHAO, S., FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Comput Biol*. 12: 1047-1064, 2005.