

DANIELLE REZENDE

**IDENTIFICAÇÃO DE EFETORES DE *Hemileia vastatrix* QUE SUPRIMEM A
IMUNIDADE ATIVADA POR PADRÕES MOLECULARES CONSERVADOS DE
PATÓGENOS EM *Nicotiana benthamiana***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

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

T

R467i
2016 Rezende, Danielle, 1988-
Identificação de efetores de *Hemileia vastatrix* que suprimem a
imunidade ativada por padrões moleculares conservados de patógenos
em *Nicotiana benthamiana* / Danielle Rezende. - Viçosa, MG, 2016.
vii, 38 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 31-38.

1. *Hemileia vastatrix*. 2. Ferrugem-do-cafeeiro. 3. Efetores
semelhantes a ativadores de transição. 4. Padrões moleculares
associados a patógenos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.7394

DANIELLE REZENDE

**IDENTIFICAÇÃO DE EFETORES DE *Hemileia vastatrix* QUE SUPRIMEM A
IMUNIDADE ATIVADA POR PADRÕES MOLECULARES CONSERVADOS DE
PATÓGENOS EM *Nicotiana benthamiana*.**

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

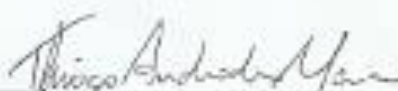
APROVADA: 23 de setembro de 2016.



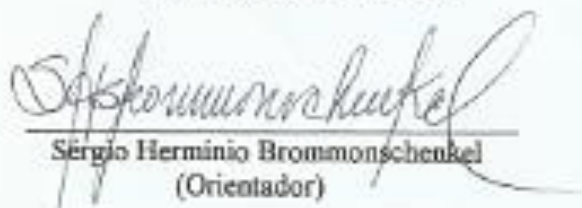
Jorge Luis Badel Pacheco



Marisa Vieira de Queiroz



Thiago Andrade Maia



Sérgio Herminio Brommonschenkel
(Orientador)

Ao criador do mundo, por me emprestar todos os dias o coração que em mim pulsa, o oxigênio que respiro, o solo em que caminho e milhões de itens para que eu simplesmente exista e realize uma grande história.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força que me faz sempre seguir com a oportunidade de recomeçar a cada manhã.

À minha irmã Natale, pelo simples fato de existir e ser minha irmã.

Ao Flávio, pelo amor, companheirismo, paciência e por tornar essa caminhada mais leve.

À minha querida Nívia, pela amizade e pela disposição em me ajudar sem medir esforços.

Ao meu orientador, professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela paciência, orientação, exemplo e por ser infinitamente humano.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa. Aos colegas de laboratório pela convivência e amizade.

Ao Luciano, Gustavo e Thiago pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos funcionários do Bioagro e do setor da casa de vegetação, pela amizade, carinho e disposição cedidos a mim na realização deste trabalho.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela atenção e ajuda.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, deixo aqui meu MUITO OBRIGADO.

BIOGRAFIA

DANIELLE REZENDE, filha de Laércio da Silva Rezende e Denise Maria Pinto Rezende, nasceu em 11 de outubro de 1988 em Viçosa, estado de Minas Gerais.

Em março de 2008, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Agronomia, obtendo o título em janeiro de 2014.

De novembro de 2008 a janeiro de 2011, foi integrante da Empresa Júnior de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (AgroPlan-UFV) pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. Assumiu o cargo de gerente na área de Gestão de Pessoas em julho de 2009 permanecendo até julho de 2010. Até o fim da sua participação dentro da empresa encontrava-se com a responsabilidade da Direção da área de Desenvolvimento. Em março de 2011, ingressou no Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL) encerrando em julho de 2011. Foi bolsista de iniciação científica no período de 01/01/2012 a 31/12/2012, acompanhando as atividades de pesquisa referente ao projeto "Capacidade Fotossintética e Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos da Resistência do Sorgo à Antracnose Mediada pelo Silício". Continuou os trabalhos como estagiária acompanhando trabalhos com *Cercospora sojina* no laboratório de Interação Planta Patógeno do Departamento de Fitopatologia com a concessão de bolsa pelo convênio Cooperação/Vale/UFV/OMA até 28/02/2014, tendo publicada uma nota científica no American Phytopathological Society (APS).

Em agosto de 2014, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa-UFV, submetendo-se a defesa de dissertação em setembro de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O cafeeiro e sua importância econômica.....	3
2.2 Patossistema cafeeiro-ferrugem, o sistema imune vegetal e o papel dos efetores nas interações planta – patógeno.....	5
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Clonagem dos genes <i>HvEC</i> no vetor de expressão pEDV6 e obtenção de clones de <i>Pseudomonas fluorescens</i> EtHan transformadas com as construções pEDV6:: <i>HvEC</i>	11
3.2 Cultivo de <i>Nicotiana benthamiana</i>	11
3.3 Ensaio de coinfiltração de <i>Pseudomonas fluorescens</i> EtHan e <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 em folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> e avaliação da atividade supressora de PTI de genes candidatos a efetores de <i>Hemileia vastatrix</i>	12
3.4 Análise do crescimento populacional de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 nas áreas de interseção foliares de <i>Nicotiana benthamiana</i> coinfiltradas com os clones de <i>P. fluorescens</i> EtHan (pEDV6:: <i>HvEC</i> -064) e <i>Pf</i> EtHan não transformada.....	13
3.5 Teste de viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano	14
4 RESULTADOS	15
4.1 Avaliação da atividade supressora de PTI dos candidatos efetores de <i>Hemileia vastatrix</i> em <i>Nicotiana benthamiana</i>	15
4.2 Teste de viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano nas áreas foliares de <i>Nicotiana benthamiana</i> coinfiltradas com as bactérias <i>Pseudomonas fluorescens</i> EtHan, transformada ou não, e <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	22
4.3 Determinação da curva de crescimento populacional de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 no ensaio de coinfiltração com o clone de <i>P. fluorescens</i> EtHan (pEDV6:: <i>HvEC</i> -064).....	24
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÕES.....	30
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

REZENDE, Danielle, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2016. **Identificação de efetores de *Hemileia vastatrix* que suprimem a imunidade ativada por padrões moleculares conservados de patógenos em *Nicotiana benthamiana*.** Orientador: Sérgio Herminio Brommonschenkel.

Durante a interação com as plantas hospedeiras, os fungos causadores de ferrugens secretam e translocam diversas proteínas efetoras para o citoplasma das células vegetais, onde atuam suprimindo as respostas de defesa e promovendo o parasitismo. Em estudos prévios foram identificados genes candidatos a efetores em *Hemileia vastatrix* (*HvECs*) que codificam proteínas secretadas com funções desconhecidas. Visando entender o papel dessas proteínas secretadas na patogênese da ferrugem do cafeeiro, o presente trabalho teve como objetivo o estudo funcional de 54 candidatos a efetores do isolado monopostular de *H. vastatrix* HV-01 (raça II), avaliando-se a sua capacidade de suprimir a imunidade ativada por padrões moleculares conservados (PAMPs) da bactéria não patogênica *Pseudomonas fluorescens* em *Nicotiana benthamiana*. Essa resposta de imunidade, denominada PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), é a primeira linha de defesa induzida que as plantas utilizam para resistir ao ataque de patógenos. As sequências dos 54 genes que codificam as potenciais proteínas efetoras foram clonadas individualmente no vetor de expressão pEDV6 (*Effector Delivery Vector*) e os plasmídeos recombinantes foram transferidos para *P. fluorescens* EtHAN (*Effector to Host Analyser*) (*Pf EtHan*), que possui um sistema de secreção tipo III (SST3) capaz de translocar as proteínas codificadas pelos genes candidatos para o citoplasma de *N. benthamiana*. Desesseis proteínas efetoras apresentaram capacidade de suprimir PTI com alta reprodutibilidade em diferentes experimentos de co-infiltração de *Pf EtHan* com a bactéria patogênica *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 em *N. benthamiana*. A supressão de PTI por um gene candidato (*HvEC_064*) foi confirmada analisando-se o crescimento populacional de *Pst* DC3000 e morte celular nos tecidos infiltrados onde ocorreu, ou não, a supressão de PTI e ativação de imunidade desencadeada pelo reconhecimento de efetores dessa bactéria. Pode-se postular, com base nesses estudos, que os efetores de *H. vastatrix* com atividade supressora de PTI em *N. benthamiana* são prováveis efetores citoplasmáticos. Esses efetores serão priorizados em estudos futuros visando a identificação de genes de avirulência desse fungo e dos seus alvos nas células do cafeeiro.

ABSTRACT

REZENDE, Danielle, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2016. **Identification of effectors of *Hemileia vastatrix* that suppress the immunity activated by conserved molecular patterns of pathogens in *Nicotiana benthamiana*.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

During the interaction with host plants, rust fungi secrete and translocate several effector proteins into the cytoplasm of plant cells to suppress defence responses and promote parasitism. Previous studies have identified genes in *Hemileia vastatrix* that encode effectors with unknown functions. In order to understand the role of these effectors in the pathogenesis of coffee rust, this study aimed the functional analysis of 54 candidate effectors from the monopustular isolate of *Hemileia vastatrix* HV 01 (race II), by evaluating their ability to suppress Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) responses triggered by the nonpathogenic bacteria *Pseudomonas fluorescens* in *Nicotiana benthamiana*. This immune response, known as PTI (PAMP-Triggered Immunity), is the first line of induced defenses used by plants to resist pathogen attack. Gene sequences encoding the 54 putative effectors were individually cloned into pEDV6 (Effector Delivery Vector) vector. The recombinant plasmids were transferred to *P. fluorescens* EtHAN (Effector to Host Analyser) (*Pf* EtHan), which has a type III secretion system (T3SS) able to translocate the proteins encoded by the candidate genes into the cytoplasm of *N. benthamiana*. Sixteen candidate effector genes suppressed PTI with high reproducibility in different co-infiltration experiments of *Pf* EtHAN with the pathogenic bacterium *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 in *N. benthamiana*. The suppression of PTI by a candidate gene (*HvEC_064*) was confirmed by analysing *Pst* DC3000 population growth and cell death in the infiltrated tissues where PTI was suppressed. The effectors of *H. vastatrix* with suppressive activity of PTI identified are likely cytoplasmic effectors. These effectors will be further investigated in future studies aimed to identify avirulence genes of this fungus and its targets in coffee plant cells.

1. INTRODUÇÃO

A cafeicultura encontra-se entre as atividades agrícolas de maior importância social e econômica em todo o mundo. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, seguido pelo Vietnã e a Colômbia. As principais regiões brasileiras produtoras estão concentradas no estado de Minas Gerais, no Espírito Santo, seguido por São Paulo e Paraná, podendo destacar também o afloramento da Bahia, apresentando como estado promissor na produção de café de qualidade (ABIC, 2016; IOC, 2016).

A espécie *Coffea arabica* é a mais cultivada e comercializada no mundo devido a superioridade da qualidade da bebida, embora seja bastante suscetível as doenças. A principal doença que atinge o cultivo do cafeeiro é a ferrugem alaranjada causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.. Em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença podem ser causados danos de 35 a 50% da produção (Zambolim *et al.*, 2005). As medidas de controle mais utilizadas tem sido o uso de fungicidas protetores e/ou sistêmicos. O impacto ambiental e a contaminação dos aplicadores, bem como do grão, são desvantagens apresentadas com a utilização dessa abordagem. O emprego de cultivares resistentes constitui a medida de controle mais indicada, por ser eficiente e causar menor impacto ao ambiente (Zambolim *et al.*, 1999).

Cultivares resistentes à ferrugem do cafeeiro tem sido desenvolvidos por diferentes programas de melhoramento genético no Brasil e em outros países produtores de café. Todavia, o grande desafio tem sido obter cultivares com resistência durável, pois *H. vastatrix* possui alta variabilidade fenotípica quanto a genética, o que favorece o surgimento de novas raças do patógeno capazes de suplantar a resistência das cultivares obtidas (Várzea & Marques, 2005). Recentemente, foram descobertas raças deste fungo capazes de infectar cafeeiros com resistência derivada das principais fontes de resistência utilizadas nos programas de melhoramento genético (Gichuru *et al.*, 2012).

O conhecimento dos mecanismos moleculares e evolutivos empregados por *H. vastatrix* podem auxiliar o desenvolvimento de cultivares com resistência mais duradoura. Durante a interação com as plantas hospedeiras, os fungos causadores de ferrugens secretam e translocam diversas proteínas efetoras para o citoplasma das células vegetais, onde atuam suprimindo as respostas de defesa e promovendo o parasitismo. Algumas proteínas codificadas pelos genes de resistência funcionam como receptores citoplasmáticos que reconhecem diretamente os efetores ou a sua atuação em processos celulares (Ellis *et al.*, 2009). Esse reconhecimento ativa várias vias de sinalização celular que desencadeiam a morte celular no sítio de infecção e restrição do

desenvolvimento dos patógenos. Essa morte celular é denominada reação de hipersensibilidade, ou HR (*Hypersensitive Response*).

Os genes dos fitopatógenos que codificam efetores reconhecidos direta ou indiretamente por proteínas codificadas por genes R são denominados genes de avirulência (*Avr*). Essa interação específica e gene-a-gene foi inicialmente descrita por Flor (1942, 1971). Mutações nesses genes de *Avr* permitem aos fitopatógenos suplantar a resistência conferida pelos genes de resistência correspondentes. Em cafeeiro já foram descritos nove genes de resistência denominados de S_{H1} a S_{H9} (Bettencourt & Rodrigues, 1988). Assim pode-se inferir a existência de genes *Avr* no genoma de *H. vastatrix* correspondentes. Nenhum desses genes foi clonado e caracterizado até o momento, embora exista algum progresso nessa direção (Maia, 2013).

Em estudos prévios realizados por Maia (2013) foram identificados dezenas de genes de *H. vastatrix* com características típicas de genes candidatos a efetores, dentre elas o fato de codificarem proteínas secretadas e de função ainda desconhecida. O estabelecimento de funções específicas para os genes candidatos identificados por Maia (2013) é dificultado pelo fato deste patógeno ser um parasita obrigatório biotrófico. Isto impossibilita o estabelecimento de relação causa-efeito entre gene específicos e fenótipo por meio de estudos genéticos. Também não existe um sistema de transformação genética, o que impede a manipulação desse fungo por meio da geração de transformantes ou mutantes. Uma alternativa viável para a análise funcional de genes candidatos a efetores é a sua translocação para o citoplasma da célula vegetal por meio do sistema de secreção tipo III de fitobactérias gram-negativas. Essa abordagem tem sido utilizada com sucesso na caracterização funcional de proteínas efetoras de fungos causadores de ferrugens que são potencialmente reconhecidas por proteínas R (Maia, 2013; Upadhyaya *et al.*, 2014) ou capazes de suprimir respostas de defesa (Liu *et al.*, 2016). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o estudo funcional de 54 candidatos a efetores do isolado monopostular de *H. vastatrix* HV-01 (raça II) avaliando-se a sua capacidade de suprimir a imunidade ativada por padrões moleculares conservados (PAMPs) da bactéria não patogênica *Pseudomonas fluorescens* em *Nicotiana benthamiana*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O cafeeiro e sua importância econômica

Originado da Etiópia, centro da África, onde ainda hoje faz parte da vegetação natural, o cafeeiro foi propagado pela Arábia. No século VI foi cultivada no Iêmen, onde os grãos eram consumidos *in natura*. Um pouco mais de 100 anos depois, o café começou a ser torrado dando origem a bebida atual (Embrapa, 2016).

O cafeeiro é um arbusto da família Rubiaceae e do gênero *Coffea* L.. Atualmente é cultivado em países tropicais, tanto para consumo próprio como para exportação. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, seguido pelo Vietnã e a Colômbia. As principais regiões brasileiras produtoras estão concentradas no estado de Minas Gerais, no Espírito Santo, seguido por São Paulo e Paraná podendo destacar também o afloramento da Bahia como estado produtor, apresentando como promissor na produção de café de qualidade (ABIC, 2016; IOC, 2016). No ano de 2015, de janeiro a agosto, o café representou 6,9% do comércio exterior. Destaca-se como o quinto item mais exportado pelo agronegócio brasileiro, ficando atrás da soja, carne, produtos florestais e do complexo sucroalcooleiro (MAPA, 2015).

A cafeicultura é também uma das principais atividades agrícolas de importância social e econômica em todo mundo. Essa atividade é capaz de gerar empregos garantindo a subsistência de milhões de famílias, além de movimentar o mercado do agronegócio internacional. No ranking de *commodities* mais importantes mundialmente encontra-se atrás apenas do petróleo (IOC, 2016).

Algumas espécies de cafeeiro cultivadas são altamente suscetíveis a doenças. Dentre as principais doenças destaca-se a ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., uma doença foliar que, inicialmente, causa manchas cloróticas translúcidas com 1-3 mm de diâmetro, observadas na face inferior do limbo foliar. Em poucos dias, essas manchas crescem, atingindo 1-2 cm de diâmetro. Desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração amarelo-laranja, formadas por uredósporos do patógeno que, quando coalescem, podem cobrir grande extensão do limbo. Na superfície superior da folha, aparecem áreas descoloridas, de tonalidade amarelada, que correspondem às regiões infectadas na face inferior. Com o tempo, as lesões aumentam de tamanho, deixando no seu centro uma área necrótica. Em estádios avançados de infecção, a maior parte da área afetada morre e a produção de esporos continua somente na beira da pústula. Ocasionalmente, o fungo pode colonizar a extremidade

do ramo em desenvolvimento e frutos verdes. No campo, o sintoma mais notável é a desfolha das plantas de cafeeiro, que pode provocar o retardamento do desenvolvimento de plantas jovens, ou sinais de enfraquecimento de plantas velhas, com comprometimento da produção. A desfolha ocorrida antes do florescimento interfere no desenvolvimento dos botões florais e na frutificação. Por outro lado, a perda das folhas durante o desenvolvimento dos frutos leva à formação de grãos anormais e frutos ocos, afetando consideravelmente a produção, podendo ocorrer perdas em torno de 35 a 50 %, dependendo das condições climáticas e de outros fatores como estado nutricional da planta, cultivar plantada, tipo de irrigação empregado, entre outros (Zambolim *et al.*, 1999).

Vários fatores relacionados ao ambiente, ao patógeno e ao hospedeiro influenciam a incidência e a severidade da doença (Carvalho *et al.*, 2002; Pozza *et al.*, 2001). Dentre eles, os fatores climáticos são os mais importantes. A umidade relacionada ao molhamento foliar, advinda da chuva, irrigação e nevoeiro favorecem a germinação dos esporos do patógeno. A chuva não só favorece como também contribui para dispersão dos uredósporos (Vale *et al.*, 2004).

A temperatura é outro fator de forte impacto no desenvolvimento epidemiológico, pois influencia a duração do período de incubação e latente da doença e, conseqüentemente o progresso da doença (Kushalappa & Chaves, 1980).

A luminosidade também tem efeito direto e indireto na epidemiologia da doença. Na ausência de luz direta, os uredósporos germinam e penetram pelos estômatos da folha (Almeida, 1986). Indiretamente, o aumento da densidade de 6 plantas/ha pode alterar a luminosidade nas entrelinhas do dossel, modificando o microclima favorecendo o aumento da severidade da doença.

Existe uma correlação positiva entre severidade da doença e produção para o cafeeiro (Maffia *et al.*, 1999). Plantas estressadas com sobrecarga pendente apresentam maior severidade da doença e, conseqüentemente, maior desfolha (Zambolim, 2001; Zambolim *et al.*, 2002).

A principal estratégia de controle da ferrugem do cafeeiro é a utilização de fungicidas protetores e/ou sistêmicos. Embora eficiente, essa prática apresenta algumas desvantagens, indo desde o impacto ambiental à contaminação do aplicador ao alimento a ser consumido. Sendo assim, o plantio de cultivares resistentes constitui a medida de controle mais indicada pois causa menor impacto ambiental (Zambolim *et al.*, 1999).

A busca por cultivares com resistência durável à ferrugem do cafeeiro, tem sido um dos maiores desafios dos melhoristas do cafeeiro, pois *H. vastatrix* possui alta variabilidade genética, o que favorece o surgimento de novas raças do patógeno que são capazes de suplantar a resistência das cultivares desenvolvidas (Várzea & Marques, 2005).

2.2. Patossistema cafeeiro-ferrugem, o sistema imune vegetal e o papel dos efetores nas interações planta-patógeno

O fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* pertencente ao filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Incertae sedis (www.indexfungorum.org). Seu ciclo de vida é incompleto, pois seus estágios de écio e pécnio são desconhecidos (Bedendo, 1995). A duração do ciclo de vida do patógeno pode variar entre 17 a 50 dias, dependendo da região e isolado do fungo (Maia *et al.*, 2017). O gênero *Hemileia* pode ser diferenciado por duas características marcantes: penetração e esporulação através dos estômatos e uredósporos reniformes equinulados dorsalmente e lisos ventralmente (Zambolim *et al.*, 1997).

Os uredósporos presentes nas pústulas das folhas infectadas são dispersos principalmente pela ação do vento, da água da chuva e por insetos. Ao aderir na superfície inferior da folha do cafeeiro, e em condições favoráveis, os uredósporos germinam, produzindo um longo tubo germinativo que se desenvolve a procura de um estômato, onde diferencia o apressório. Este por sua vez se diferencia em uma hifa intercelular de infecção primária, que forma as células-mãe dos haustórios, a partir da qual haustórios primários são formados dentro das células subsidiárias e adjacentes dos estômatos. Atingindo o mesófilo, a hifa de infecção se diferencia em uma vesícula tipicamente em forma de âncora alojada na câmara subestomática. De cada ponta dos ramos da âncora, novas células-mãe dos haustórios são formadas, a partir das quais haustórios secundários são produzidos nas células do mesófilo (Ramirez *et al.*, 2009).

As plantas estão continuamente expostas as mudanças do ambiente e ao ataque de pragas e patógenos. Por sua vez, sem a formação de sistema imune adaptado e na ausência de células de defesa móveis, as plantas desenvolveram um sistema imune simples e eficiente, que é ativado após o reconhecimento de sinais dos patógenos (Dalió, 2013; Gassmann & Bhattacharjee, 2012). O sistema imune vegetal possui duas principais linhas de defesa. A primeira está associada à imunidade desencadeada por PAMPs, denominada PTI (*PAMP triggered immunity*) e a segunda associada a imunidade desencadeada pelo reconhecimento de efetores, ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones & Dangl, 2006).

Os PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) são moléculas altamente conservadas provenientes dos microrganismos e que apresentam funções essenciais em suas sobrevivências (Medzhitov & Janeway, 1997). Esses são reconhecidos por receptores de reconhecimento de PAMPs (PRRs - Pattern Recognition Receptors), que são proteínas transmembranas que apresentam geralmente repetições ricas em leucina (LRRs) no domínio extracelular, o qual estão envolvidos no reconhecimento dos sinais dos patógenos (Beck et al., 2012).

A proteína PRR mais estudada é a FLS2 (*flagelin sensing 2*), que foi inicialmente identificada em *Arabidopsis* e possui a capacidade de reconhecer um epítipo de 22 aminoácidos (flg22) na porção N-terminal conservada da proteína flagelina (Ramos et al., 2004). Esse receptor foi identificado em plantas de arroz, tomate, *Nicotiana benthamiana* e *Arabidopsis* (Boller & Felix, 2009). Outros exemplos bem caracterizados de PRR é a proteína Xa21, que reconhece proteína sulfatada AX21 de *Xanthomonas*, e o receptor CEBip, que reconhece regiões de monômeros da quitina, componente da parede celular de fungos (Dardick et al., 2012).

A ligação física entre o domínio extracelular do receptor (PRR) com o epítipo do ligante (PAMP) ocasiona uma mudança na estrutura do receptor e a ativação de uma cascata de sinalização citoplasmática gerada pelo domínio intracelular do receptor, ativando a imunidade desencadeada por PAMPs (PTI). Vários sinais são amplificados quando esta resposta é ativada. As alterações nos níveis de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno resultam na ativação de fatores de transcrição de genes de defesa e, subsequentemente, na expressão de genes envolvidos na resposta imune. Embora a PTI seja suficiente para prevenir a infecção, os patógenos adquiriram a habilidade de produzir proteínas efetoras que a suprimem (Win et al., 2012).

Os fitopatógenos adaptados são capazes de suplantar PTI, por meio da produção de efetores que atuam em componentes da via de transdução de sinais envolvidos nessa resposta de defesa, resultando na chamada suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS, *Effector Triggered Susceptibility*) (Birch et al., 2008). As moléculas efetoras podem acumular na superfície da célula, nos espaços intercelulares, no citoplasma, e se deslocarem para diferentes compartimentos subcelulares do hospedeiro. Por exemplo, os efetores TAL de *Xanthomonas* spp., que são translocados para a célula vegetal por meio do sistema de secreção tipo III, atuam no núcleo da célula vegetal promovendo a ativação transcricional de genes envolvidos, por exemplo, no transporte de açúcares e na regulação epigenética (Block et al., 2008; Bai et al.,

2009; Chen *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2012; Schornack *et al.*, 2010). Um grande número de efetores de *Phytophthora infestans* possuem motivos conservados, como os RxLR (R: arginina; x: qualquer aminoácido; L: leucina; R: arginina) que funcionam como sinal de translocação para o citoplasma vegetal (Birch *et al.* 2006; Kamoun, 2009). Um dos efetores RxLR de *P. infestans*, AVR3a, é capaz de suprimir a morte celular induzida pela elicítina INF-1 (Bos *et al.*, 2009). Já o efector SNE1, expresso durante a fase biotrófica do patógeno, suprime a morte celular que ocorre durante a fase necrotrófica da infecção (Kelley *et al.*, 2010).

A fim de evitar o desenvolvimento da infecção estabelecida pelos diferentes patógenos, as plantas desenvolveram uma segunda linha de defesa capaz de reconhecer as proteínas efetoras. A imunidade ativada por efetores (ETI) utiliza receptores intracelulares (proteínas R) codificadas pelos genes de resistência (genes R) (Win *et al.*, 2012). Consistente com o seu papel no reconhecimento de efetores e ativação de vias de transdução de sinais, a maioria das proteínas R apresentam um domínio central de ligação a nucleotídeos (NB), um domínio C-terminal com regiões repetidas ricas em leucina (LRR), e um terceiro domínio variável na região N-terminal que pode ser TIR (Toll/Interleucina1) ou CC (*Coiled-coil*) (Elmore *et al.*, 2011; Gururani *et al.*, 2012). As repetições ricas em leucina normalmente estão envolvidas em interações entre proteínas, enquanto a região NB é o módulo responsável pela sinalização. O reconhecimento dos efetores pode ser direto ou indireto. Nesse último caso, a interferência do efector no seu alvo celular é detectado pelas proteínas R. Por exemplo, a proteína codificada pelo gene *Rpm1* de *A. thaliana* ativa as respostas de defesa por meio da detecção de modificações na proteína RIN4, realizada pelo efector AvrRpm1 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Mackey *et al.*, 2002). A ativação das respostas de defesa leva à morte celular rápida no local da infecção, denominada HR (*Hypersensitive Response*). Outras respostas celulares são também observadas como alterações nos níveis de cálcio no citoplasma, fosforilação de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio, produção de fitoalexinas, fortalecimento da parede celular, síntese de enzimas hidrolíticas e de proteínas relacionadas a patogênese, dentre outras (Tsuda & Katagiri, 2010).

Os genes dos fitopatógenos que codificam efetores reconhecidos pelas proteínas codificadas pelos genes R são denominados genes de avirulência (genes *Avr*) e essa interação específica foi geneticamente analisada por Flor (1971) no patossistema linho-*Melampsora lini*. Com base nos seus estudos, Flor propôs a teoria gene-a-gene que estabelece que o fenótipo de resistência é observado quando a planta possui um gene de resistência e o patógeno possui um gene de avirulência correspondente (Flor, 1971). Esse estudo clássico associado com estudos

moleculares, efetuados nos últimos vinte anos, demonstram o papel central das proteínas efetoras e das proteínas R na determinação do fenótipo das interações planta-patógeno.

A caracterização molecular de genes *Avr* em fungos causadores de ferrugem é recente. Somente após seis décadas da publicação de Flor sobre a herança da resistência à ferrugem em plantas de linho (*Linum usitatissimum*), o gene *AvrL567* de *M. lini* foi clonado e caracterizado (Dodds *et al.*, 2004). A proteína *AvrL567* é secretada pelo haustório do fungo e tem atividade citoplasmática, induzindo HR dependente das proteínas NBS-LRR L5, L6 ou L7 do linho. Desde então, outros efetores de fungos causadores de ferrugens foram descritos. No patossistema linho-*M. lini* já foram caracterizadas as proteínas *AvrM*, *AvrL567*, *AvrP123* e *AvrP4*; no patossistema feijão-*Uromyces fabae* a proteína *RTP1*; e no patossistema trigo-*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* a proteína *PGTAUSPE-10-1* (Petre *et al.*, 2016).

Avanços nas técnicas de sequenciamento tem permitido a caracterização do secretoma de diversos fungos causadores de ferrugens (Cantu *et al.*, 2011, 2013; Duplessis *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2012; Hacquard *et al.*, 2012; Saunders *et al.*, 2012; Bruce *et al.*, 2013; Garnica *et al.*, 2013; Link *et al.*, 2014; Maia, 2013; Nemri *et al.*, 2014). Os estudos demonstram que esses fungos possuem um secretoma dinâmico e rico em proteínas candidatas a efetores. Por exemplo, 725 candidatos a efetores foram preditos a partir da análise do rascunho do genoma de *M. lini* (Nemri *et al.*, 2014). A partir da montagem parcial do genoma de *H. vastatrix*, Cristancho *et al.* (2014) fizeram a predição de 483 genes candidatos a efetores nesse patógeno. Já Maia (2013), analisando o transcriptoma de esporos germinados e da interação com o cafeeiro, identificou 171 genes que codificam putativos efetores, ou seja, proteínas pequenas, secretadas e de função desconhecida.

O estabelecimento de funções específicas para os genes identificados por Maia (2013) é dificultado pelo fato de *H. vastatrix* ser um parasita obrigatório biotrófico. Isto impossibilita o estabelecimento de relação causa-efeito entre genes específicos e fenótipos por meio de estudos genéticos. Também não existe um sistema de transformação estável, o que impede a manipulação genética desse fungo por meio da geração de transformantes ou mutantes. Uma alternativa viável para a análise funcional de genes candidatos a efetores e a sua translocação para o citoplasma da célula vegetal é por meio do sistema de secreção tipo III de fitobactérias gram-negativas. Essa abordagem tem sido utilizada com sucesso na caracterização funcional de proteínas efetoras de fungos causadores de ferrugens que são potencialmente reconhecidas por proteínas R (Maia, 2013; Upadhyaya *et al.*, 2014) ou capazes de suprimir respostas de defesa da planta (Liu *et al.*, 2016).

Um componente central dessa abordagem é o sistema de expressão EDV (*Effector-Detector Vector*) que foi desenvolvido para translocação de proteínas Avr do oomiceto *Hyaloperonospora arabidopsidis* para dentro do citoplasma de *A. thaliana*, via SST3 de *P. syringae* pv. *tomato* (Sohn *et al.*, 2007). No sistema EDV, os genes a serem analisados são clonados *in frame* com a sequência codificadora do peptídeo sinal de 136 aminoácidos localizado na região N-terminal da proteína efetora AvrRPS4, que sinaliza a secreção pelo SST3 de *P. syringae*. No citoplasma vegetal, a porção do peptídeo sinal é clivada por uma protease presente na planta, entre o segundo e terceiro G da sequência GGGKRVY, liberando o efetor. Com base nesse sistema, Sohn *et al.* (2007) foram capazes de induzir HR mediante o uso da expressão transiente de proteínas Avr de *H. arabidopsidis* em plantas de *A. thaliana* com os respectivos genes R capazes de reconhecê-los. O sistema EDV também foi utilizado para o estudo da atividade de dois efetores de *Magnaporthe oryzae*, Avr-Pik e AvrPii, mediante sua transferência via SST3 de *Burkholderia glumae* ao citoplasma de células de arroz. Além de indicar a atividade de avirulência dessas proteínas, os autores determinaram as atividades supressoras de morte celular em infiltrações desses clones em *N. benthamiana* (Sharma *et al.*, 2012). Por meio do sistema EDV e o SST3 de *P. syringae* pv. *garcae*, bactéria patogênica ao cafeeiro, Maia (2013) foi capaz de identificar uma proteína de *H. vastatrix* (HvEC-016) capaz de suprimir o crescimento de *P. syringae* pv. *garcae* em folhas de cafeeiros portadores do gene de resistência *S_H1*, e de promover o crescimento da mesma bactéria em genótipos suscetíveis.

As bactérias fitopatogênicas também possuem proteínas efetoras capazes de suprimir as respostas de defesa e promover o parasitismo. Desta forma, seu uso para estudos de expressão transiente de genes do fungo torna-se uma limitação nos estudos funcionais de efetores. Isso é de grande importância quando pretende-se identificar efetores capazes de suprimir PTI, uma vez que patógenos adaptados a determinados hospedeiros, como por exemplo *P. syringae* pv. *garcae* em cafeeiro, possuem efetores capazes de suprimir essa linha de defesa. Uma alternativa é efetuar a expressão e translocação dos efetores utilizando bactérias saprófitas, incapazes de causar doença, mas modificadas para a expressão do sistema de secreção tipo III, como ocorre com *P. fluorescens* EtHAN (*Effector-to-Host Analyser*) (Thomas *et al.*, 2009). Essa estratégia permite o uso de bactéria não patogênica na indução de HR pela presença do efetor no simplasto vegetal (Thomas *et al.*, 2009; Upadhyaya *et al.*, 2014), facilitando a visualização mais clara e consistente da resposta de diferentes genótipos da planta de interesse, sem a interferência de outros efetores. *Pseudomonas fluorescens* EtHAN e *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 já foram

utilizadas para a detecção desse tipo de atividade em efetores de alguns patossistemas, como *H. arabidopsidis* em *A. thaliana* (Badel *et al.*, 2013).

Por fim, deve-se ressaltar que a identificação e caracterização de um efector é passo fundamental para entender os processos biológicos que atuam na sua evolução (Gawehns *et al.*, 2013). Essa informação pode ser usada por exemplo, para direcionar a seleção de genes de resistência que reconhecem efetores conservados e importantes para a adaptabilidade do patógeno (Houterman *et al.*, 2008). Genes que codificam proteínas alvo na planta, denominados genes de suscetibilidade, podem ser modificados para obter plantas mais resistentes (Gawehns *et al.*, 2013). Os próprios genes efetores podem ser utilizados para auxiliar o melhoramento de plantas visando a obtenção de cultivares resistentes, acelerando a descoberta de genes de resistência (Vleeshouwers & Oliver, 2014). Essas aplicações demonstram o papel fundamental que os efetores possuem no manejo sustentável de doenças de plantas, justificando o seu estudo detalhado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Clonagem dos genes *HvEC* no vetor de expressão pEDV6 e obtenção de clones de *Pseudomonas fluorescens* EtHAN transformadas com as construções pEDV6::*HvEC*

As sequências dos genes candidatos a efetores do isolado HV-01 (raça II) de *H. vastatrix* (*HvEC*) foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor de entrada pENTR/D-TOPO® (Invitrogen). As sequências de cada um dos genes foram recombinadas no vetor de destino pEDV6, seguindo-se as instruções do manual Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen). Para garantir que as ORFs estavam *in frame* com a sequência que codifica o peptídeo AvrRps4N, os clones recombinantes pEDV6::*HvEC* foram confirmados por sequenciamento utilizando o par de nucleotídeos M13 F e M13 R. A obtenção de *P. fluorescens* EtHAN com as construções pEDV6::*HvEC* foram obtidas por meio do processo de triparental mating. Esse processo é uma conjugação bacteriana onde um plasmídeo conjugativo presente em uma *Escherichia coli* (estirpe HB101) auxilia a transferência de um plasmídeo doador, presente numa segunda estirpe de *E. coli* (estirpe DH5 α), para uma terceira estirpe de *P. fluorescens* EtHAN, que é a célula receptora. As construções pEDV6::*HvEC* possuem resistência a gentamicina (25 μ g/mL) e as *P. fluorescens* EtHAN (*Pf* EtHAN) possuem resistência ao cloranfenicol (30 μ g/mL). Deste modo, após o processo de triparental mating, os clones transconjugantes de *Pf* EtHAN (pEDV6::*HvEC*) foram selecionados no meio de cultura LB sólido contendo os respectivos antibióticos. As placas de Petri foram incubadas a temperatura de 28°C durante 48 horas em câmara incubadora tipo B.O.D.. Os clones de *Pf* EtHAN (pEDV6::*HvEC*) foram confirmados por PCR de colônia utilizando os pares de nucleotídeos específicos para cada gene *HvEC* (Maia, 2013) e estocadas com glicerol 50% em freezer - 80 °C.

3.2. Cultivo de *Nicotiana benthamiana*

Sementes de *N. benthamiana* foram semeadas em vasos de 1L contendo substrato Tropstrato HT Hortaliças. Permaneceram incubadas por 26 dias em câmara de 25°C até germinarem. Decorridos 12 dias, as mudas foram transplantadas em vasos de 2L contendo solo e substrato na proporção de 1:1. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação até que as plantas apresentassem o quarto par de folhas alternadas completamente expandidas.

3.3. Ensaio de coinfiltração de *Pseudomonas fluorescens* EtHAN e *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 em folhas de *Nicotiana benthamiana* e avaliação da atividade supressora de PTI de genes candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix*

Os clones de *P. fluorescens* EtHAN (pEDV6::*HvEC*) foram estriados em meio de cultura LB sólido com os antibióticos gentamicina (25µg/mL) e cloranfenicol (30µg/mL). Utilizou-se a bactéria *Pf* EtHAN não transformada como controle negativo, a qual foi estriada em meio LB sólido contendo apenas cloranfenicol (30µg/mL). A bactéria *P. syringae* pv. *tomato*, estirpe DC3000 (*Pst* DC3000), indutora de reação de hipersensibilidade (HR), foi estriada em meio King B sólido com os antibióticos rifampicina (100µg/mL) e gentamicina (25µg/mL). Essas bactérias foram incubadas em câmaras de crescimento tipo B.O.D, a 28°C. No dia seguinte a incubação, as células bacterianas foram ressuspensas em solução salina de cloreto de magnésio (MgCl₂, a 10 mM) e centrifugadas a 5.000 rpm, por 10 minutos, a 21°C, seguido por dois ciclos de ressuspensão em tampão MgCl₂ 10 mM. As suspensões bacterianas dos clones de *Pf* EtHAN (pEDV6::*HvEC*) e *Pf* EtHAN não transformada foram ajustadas para OD₆₀₀= 0,2 e a suspensão de *Pst* DC3000 ajustada para OD₆₀₀= 0,05.

As infiltrações dos clones de *Pf* EtHAN (pEDV6::*HvEC*) e *Pf* EtHAN não transformada foram realizadas na parte inferior do quarto par de folhas alternados completamente expandidos de *N. benthamiana*, com o auxílio de uma seringa de 1 mL, sem agulha, e com a área delimitada com caneta de tinta permanente de coloração preta. Após um intervalo de 7 horas, uma suspensão de *Pst* DC3000 foi introduzida sobrepondo as áreas previamente infiltradas com as suspensões de *Pf* EtHAN, sendo circulada a área foliar com caneta de tinta permanente de coloração vermelha. A supressão de PTI é avaliada pela ocorrência ou ausência de HR nas áreas foliares das interseções das coinfiltrações, as quais estão ilustradas na figura 1. Quando ocorre indução de HR nas interseções foliares coinfiltradas, significa que *Pf* EtHAN translocou uma proteína efetora de *H. vastatrix* capaz de suprimir PTI em *N. benthamiana*. Sendo assim, a bactéria *Pst* DC3000 foi capaz de multiplicar e translocar seus efetores tipo III para dentro da célula vegetal, onde foram reconhecidos pelo sistema imune de *N. benthamiana*, levando a indução da HR (Figura 1B). Por outro lado, quando não há indução de HR nas áreas foliares das interseções, significa que o gene candidato a efetor não foi capaz de suprimir a imunidade ativa por PAMPs de *Pf* EtHAN, logo a bactéria *Pst* DC3000 não conseguiu multiplicar, não havendo indução de HR (Figura 1C).

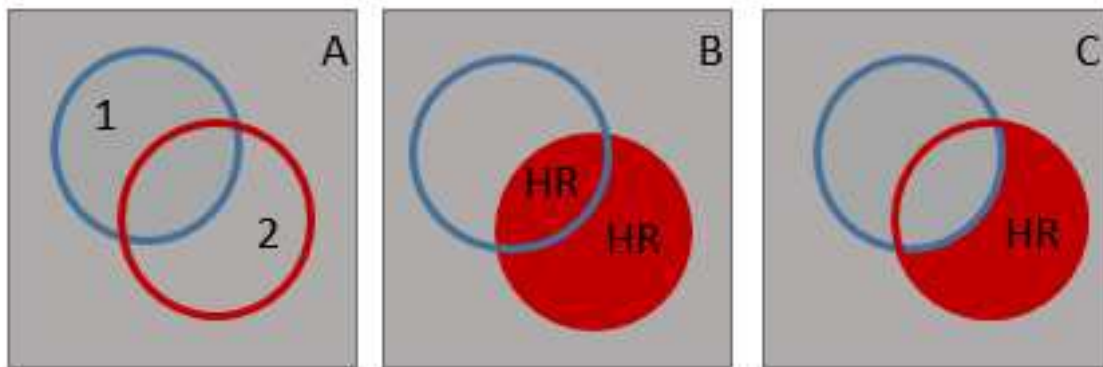


FIGURA 1. Representação esquemática dos ensaios de coinfiltrações de *Pseudomonas fluorescens* EtHAN, transformada ou não, e de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 utilizados nas análises funcionais de supressão de PTI dos genes candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix*. A1 - Área delimitada em azul foi infiltrada com *Pf* EtHAN expressando os genes *HvEC*, ou a estirpe não transformada ($OD_{600} = 0,2$). A2 - Área delimitada em vermelho foi infiltrada com *Pst* DC3000 ($OD_{600} = 0,05$). B - Fenótipo esperado para os candidatos a efetores com atividade supressora de PTI. C - Fenótipo esperado para os candidatos a efetores que não apresentam atividade supressora de PTI.

3.4. Análise do crescimento populacional de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 nas áreas de interseção foliares de *Nicotiana benthamiana* coinfiltradas com os clones de *P. fluorescens* EtHAN (pEDV6::*HvEC*-064) e *Pf* EtHAN não transformada.

Selecionou-se o clone *Pf* EtHAN (pEDV6::*HvEC*_64) com base na alta reprodutibilidade em suprimir PTI nos ensaios de coinfiltração em *N. benthamiana* para determinação da curva de crescimento populacional de *Pst* DC3000. As culturas bacterianas foram manipuladas conforme mencionado no item 3.3. Após lavagem das células, as suspensões de *Pf* EtHAN (pEDV6::*HvEC*-064) e *Pf* EtHAN (não transformada) foram ajustadas para a $OD_{600} = 0,1$ e infiltradas na parte inferior das folhas completamente expandidas de *N. benthamiana*, com o auxílio de uma seringa de 1 mL. Após sete horas, uma suspensão de *Pst* DC3000, ajustada para $OD_{600} = 0,001$, foi infiltrada sobrepondo as áreas foliares infiltradas com *Pf* EtHAN, transformada ou não. Nesta interseção foram retirados dois discos foliares de 1 cm de diâmetro, nos tempos de 0, 48, 60 e 72 horas após a segunda infiltração. Os discos foliares foram colocados em tubos de 1,5 mL contendo 250 μ L de tampão $MgCl_2$ 10 mM e três esferas de aço de 5 mm de diâmetro, onde permaneceram no aparelho macerador Mini Beadbeater-96 por 45 segundos. O macerado vegetal passou por diluições seriadas e alíquotas de 100 μ L foram plaqueadas em meio King B contendo rifampicina (100 μ g/mL) e gentamicina (25 μ g/mL). Realizou-se a contagem de células para cada diluição após 48 horas de incubação em B.O.D. Com o auxílio do Excel, construiu-se a curva de crescimento populacional de *Pst* DC3000 nos intervalos de tempos amostrados.

3.5. Teste de viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano

Efetuiu-se a análise de viabilidade das células vegetais de *N. benthamiana* nos ensaios onde os genes efetores de *H. vastatrix* apresentaram atividade supressora de PTI. As áreas foliares de *N. benthamiana* coinfiltradas foram colocadas em tubos falcon de 50 mL contendo a solução do corante Trypan Blue (6 vol. etanol, 1 vol. H₂O, 1 vol. ácido láctico, 1 vol de glicerol, 1 vol. fenol, azul de tripano 0,067%). Em seguida, os tubos falcon foram imergidos em água fervente, permanecendo por 2 minutos. Os tubos foram retirados, agitados circularmente por 1 minuto e mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. Após o arrefecimento, as folhas foram removidas da solução de coloração e transferidas para um novo tubo falcon de 50 mL contendo solução de cloral hidratado de concentração de 2,5 g/mL. As amostras foram incubadas no shaker a 150 rpm, até a obtenção de contraste ocorrido pela exclusão do azul de tripano do tecido vegetal. Posteriormente, a solução de cloral hidratado foi substituída por uma solução de glicerol 50% e as folhas foram fotodocumentadas.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade supressora de PTI dos candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix* em *Nicotiana benthamiana*

A atividade supressora foi avaliada pela indução da reação de hipersensibilidade (HR) nas interseções das coinfiltrações dos clones de *Pf* EtHAn (pEDV6::*HvEC*) e a bactéria patogênica *Pst* DC3000 em folhas de *N. benthamiana*. Dos 54 candidatos a efetores de *H. vastatrix* analisados, treze proteínas (HvEC-002, HvEC-04A, HvEC-006, HvEC-012, HvEC-021, HvEC-028, HvEC-036, HvEC-053, HvEC-064, HvEC-071, HvEC-081, HvEC-084 e HvEC-101) apresentaram atividade supressora de PTI com alta reprodutibilidade, com frequências acima de 83% das folhas coinfiltradas nos diferentes ensaios (Tabela 1). Em destaque, os efetores HvEC-006, HvEC-064 e HvEC-084 apresentaram uma frequência de 100% nos ensaios de supressão (Tabela 1). Dois efetores HvEC-005 e HvEC-040 suprimiram PTI com uma frequência de 75%, enquanto que a proteína HvEC-056 suprimiu em 62,50% das coinfiltrações. Os candidatos a efetores foram considerados negativos para atividade supressora de PTI nos ensaios onde *Pst* DC3000 não foi capaz de induzir HR nas interseções foliares, ou apresentaram variações menores que 50% de supressão (Tabela 1). Nos ensaios de coinfiltração com a bactéria *Pf* EtHAn não transformada (controle negativo) observou-se uma frequência de indução de HR menor que 5% das folhas avaliadas. Com base nos resultados, conclui-se que dezesseis proteínas efetoras de *H. vastatrix* foram capazes de suprimir PTI em diferentes experimentos de coinfiltração de *Pf* EtHAn (pEDV6::*HvEC*) e *Pst* DC3000 em folhas de *N. benthamiana* (Figura 2).

TABELA 1. Frequência da supressão da imunidade ativada por PAMPs em folhas de *Nicotiana benthamiana* dos 54 candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix* nos três ensaios independentes de coinfiltração de *Pseudomonas fluorescens* EtHAN transformadas com as construções pEDV6::*HvECs*, ou não, e *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

<i>P. fluorescens</i> EtHAN transformadas com as construções pEDV6:: <i>HvECs</i>	Ensaio			Frequência relativa	Frequência percentual	Supressão de PTI
	1	2	3			
não transformada (controle)	0/8	0/8	1/8	01/24	4,2%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _002*	7/8	8/8	6/8	21/24	87,5%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _04A*	8/8	8/8	7/8	23/24	95,8%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _005*	5/8	6/8	7/8	18/24	75,0%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _006*	8/8	8/8	8/8	24/24	100,0%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _007	0/8	2/8	1/8	03/24	12,5%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _008	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _009	2/8	0/8	0/8	02/24	8,3%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _010	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _011	2/8	0/8	3/8	05/24	20,8%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _012*	8/8	7/8	8/8	23/24	95,8%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _013	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _014	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _015	1/8	0/8	2/8	03/24	12,5%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _017	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _019	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _021*	6/8	7/8	8/8	21/24	87,5%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _022	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _024	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _025	0/8	2/8	0/8	02/24	8,3%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _026	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _027	0/8	3/8	2/8	05/24	20,8%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _028*	8/8	7/8	7/8	22/24	91,7%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _029	4/8	3/8	3/8	10/24	41,7%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _030	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _031	0/8	0/8	1/8	01/24	4,2%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _032	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _033	2/8	1/8	0/8	03/24	12,5%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _034	2/8	4/8	0/8	06/24	25,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _035	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _036*	5/8	7/8	8/8	20/24	83,3%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _037	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _038	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _040*	6/8	6/8	6/8	18/24	75,0%	Sim

*Clones de *Pf* EtHAN (pEDV6::*HvEC*) que suprimiram PTI em *Nicotiana benthamiana*.

TABELA 1. Continuação...

<i>P. fluorescens</i> EtHAn transformadas com as construções pEDV6:: <i>HvEC</i>	Ensaio			Frequência relativa	Frequência percentual	Supressão de PTI
	1	2	3			
pEDV6:: <i>HvEC</i> _041	0/8	0/8	3/8	03/24	12,5%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _042	0/8	0/8	2/8	02/24	8,3%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _043	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _050	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _053*	7/8	8/8	7/8	22/24	91,7%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _054	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _056*	5/8	7/8	6/8	15/24	62,5%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _057	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _059	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _062	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _064*	8/8	8/8	8/8	24/24	100,0%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _065	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _071*	5/8	8/8	7/8	20/24	83,3%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _074	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _081*	8/8	7/8	7/8	22/24	91,6%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _084*	8/8	8/8	8/8	24/24	100,0%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _086	0/8	0/8	3/8	03/24	12,5%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _087	0/8	0/8	0/8	00/24	0,0%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _094	0/8	0/8	2/8	02/24	8,3%	Não
pEDV6:: <i>HvEC</i> _101*	7/8	7/8	7/8	21/24	87,5%	Sim
pEDV6:: <i>HvEC</i> _104	0/8	3/8	1/8	04/24	16,7%	Não

*Clones de *Pf* EtHAn (pEDV6::*HvEC*) que suprimiram PTI em *Nicotiana benthamiana*.

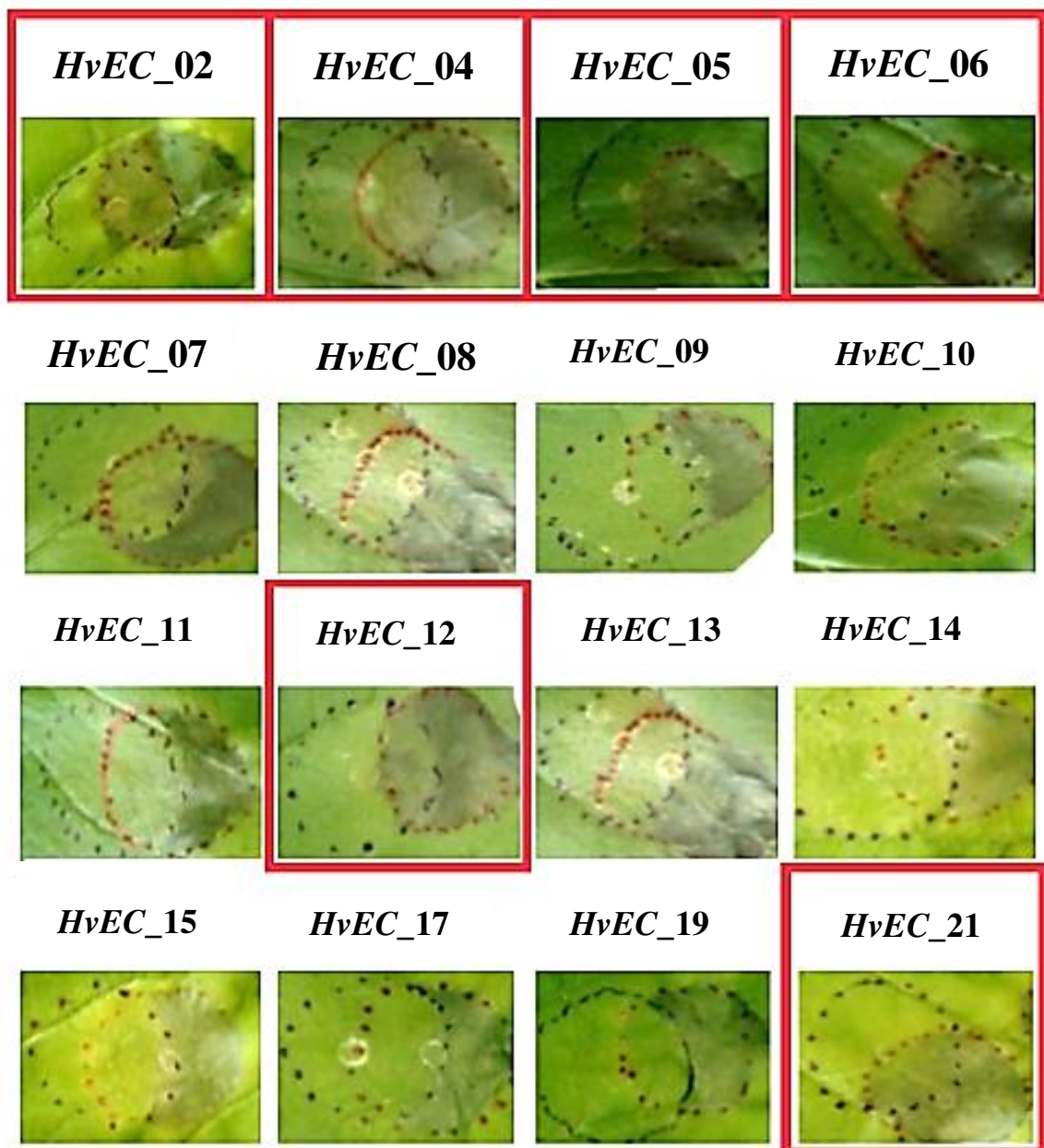


FIGURA 2. Avaliação da atividade supressora de PTI em folhas de *Nicotiana benthamiana* dos 54 candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix* em ensaios de coinfiltrações dos clones de *Pseudomonas fluorescens* EtHAn (pEDV6::*HvEC*) e da bactéria patogênica *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. As suspensões de *Pf* EtHAn ($OD_{600}=0,2$) transformadas com as construções pEDV6::*HvECs* e não transformada foram infiltradas na face inferior das folhas. Após um intervalo de sete horas, uma suspensão de *Pst* DC3000 ($OD_{600}=0,05$) foi infiltrada sobrepondo as áreas previamente infiltradas com *Pf* EtHAn. A presença ou ausência de necrose nas áreas foliares (indução de HR) foi avaliada 72 horas após a infiltração de *Pst* DC3000.

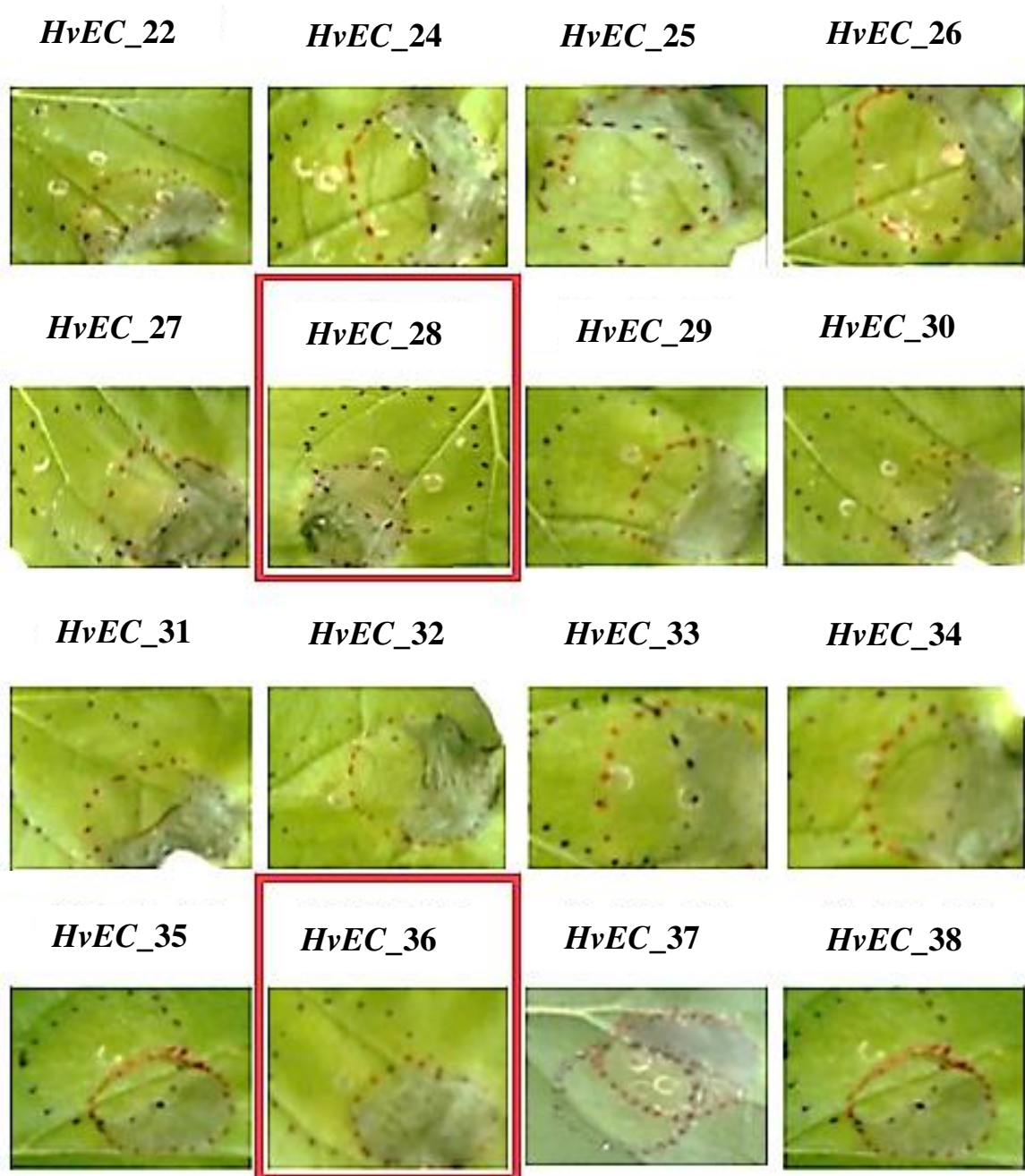


FIGURA 2. Continuação...

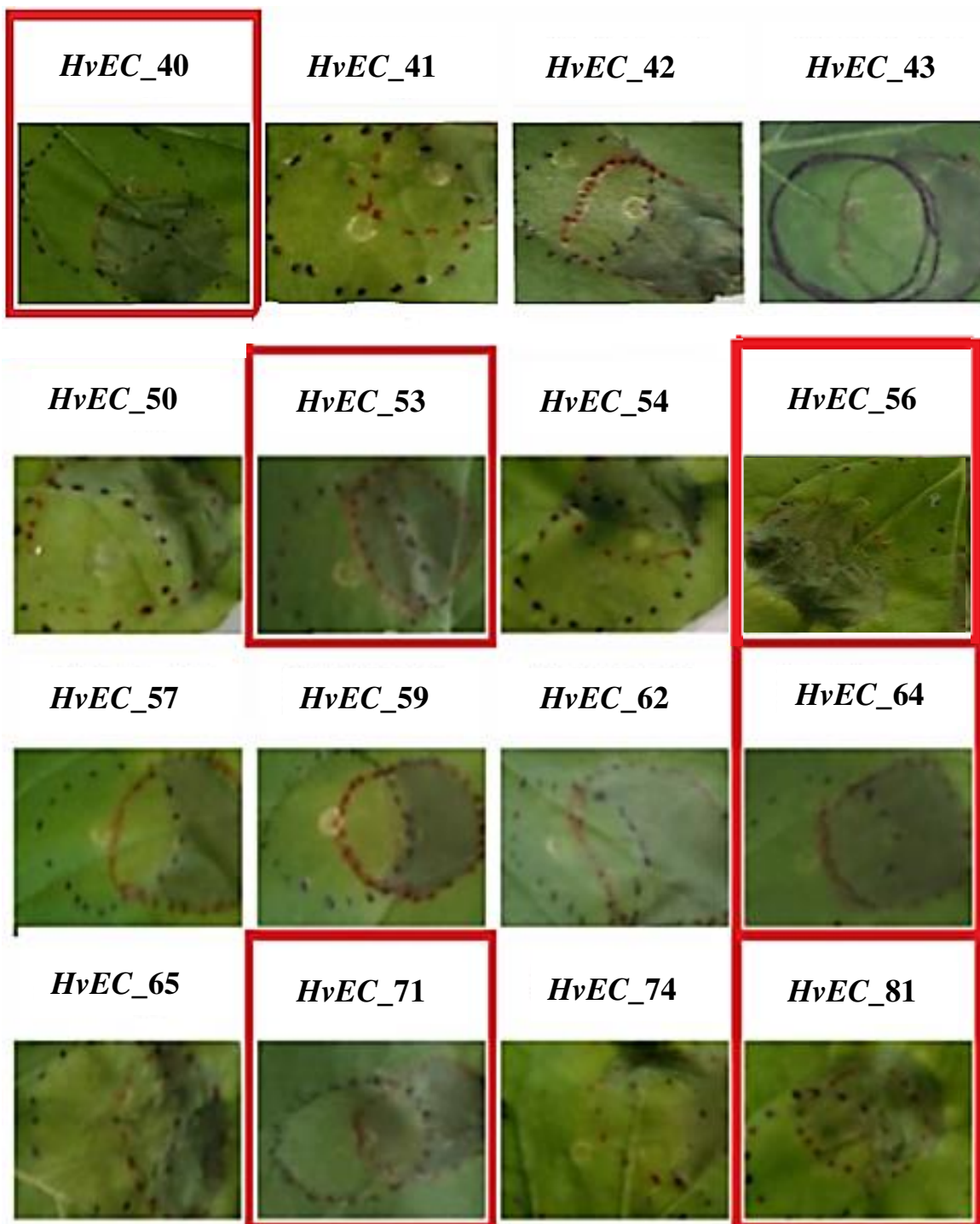


FIGURA 2. Continuação...

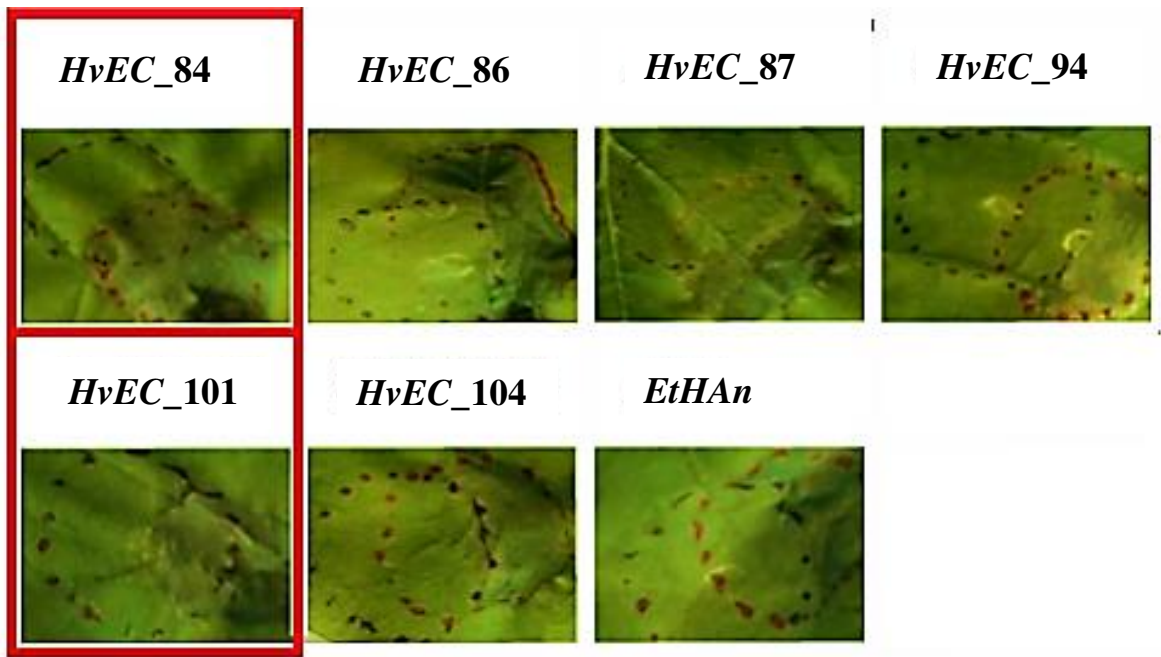


FIGURA 2. Continuação...

4.2. Teste de viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripano nas áreas foliares de *Nicotiana benthamiana* coinfiltradas com as bactérias *Pseudomonas fluorescens* EtHAn, transformada ou não, e *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

As células das áreas foliares infiltradas somente com *Pf* EtHAn, transformada ou não, foram capazes de absorver o corante azul de tripano. Contudo, após serem submetidas a solução de cloral hidratado, observou-se que o corante não permaneceu no interior das células, apresentando ausência de coloração azul, confirmando a viabilidade dessas células (Figura 3). Em contraste, as células das áreas coinfiltradas com *Pf* EtHAn, expressando os genes capazes de suprimir PTI, apresentaram coloração azulada, comprovando a ocorrência de morte celular. As áreas foliares infiltradas somente com *Pst* DC3000 também apresentaram coloração azulada intensa decorrente da indução da reação de hipersensibilidade.

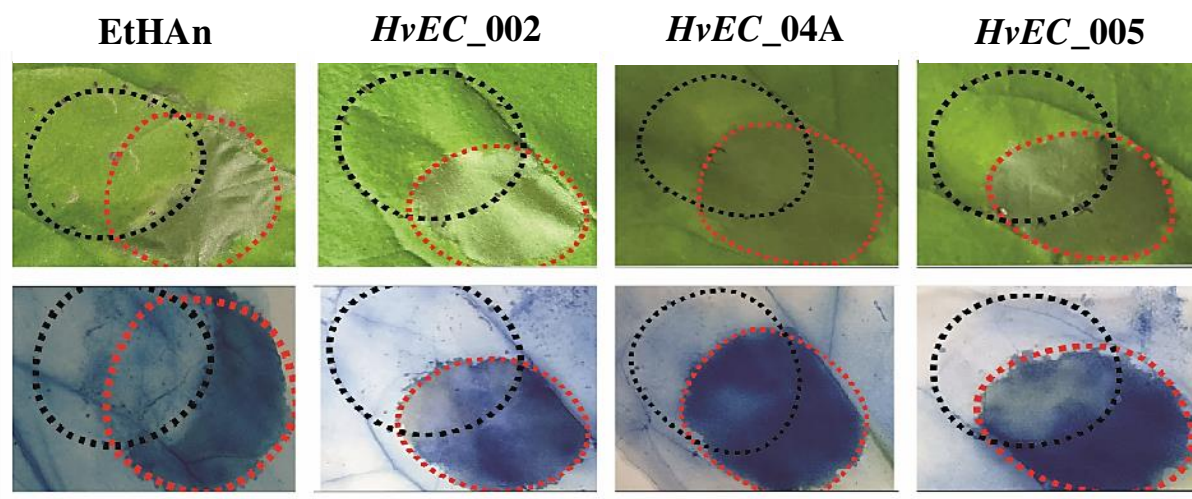


FIGURA 3. Teste de viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripano em folhas de *Nicotiana benthamiana* nos ensaios de coinfiltração onde a expressão transitente dos genes efetores de *Hemileia vastatrix* suprimiram imunidade ativada por PAMPs. As suspensões de *Pseudomonas fluorescens* EtHAn ($OD_{600}=0,2$) transformadas pelas construções pEDV6::*HvECs*, ou não transformada, foram infiltradas na face inferior de folhas de *N. benthamiana* (área pontilhada em preto). Após um intervalo de sete horas, uma suspensão de *P. syringae* DC3000 ($OD_{600}=0,05$) foi infiltrada sobrepondo as áreas previamente infiltradas com as suspensões de *Pf* EtHAn e uma área de tecido vegetal sadio (área pontilhada em vermelho). Setenta e duas horas após a segunda infiltração, as folhas foram coletas e coradas com azul de tripano. As células inviáveis são coradas de azul, pois não são capazes de excluir o azul de tripano de seu interior.

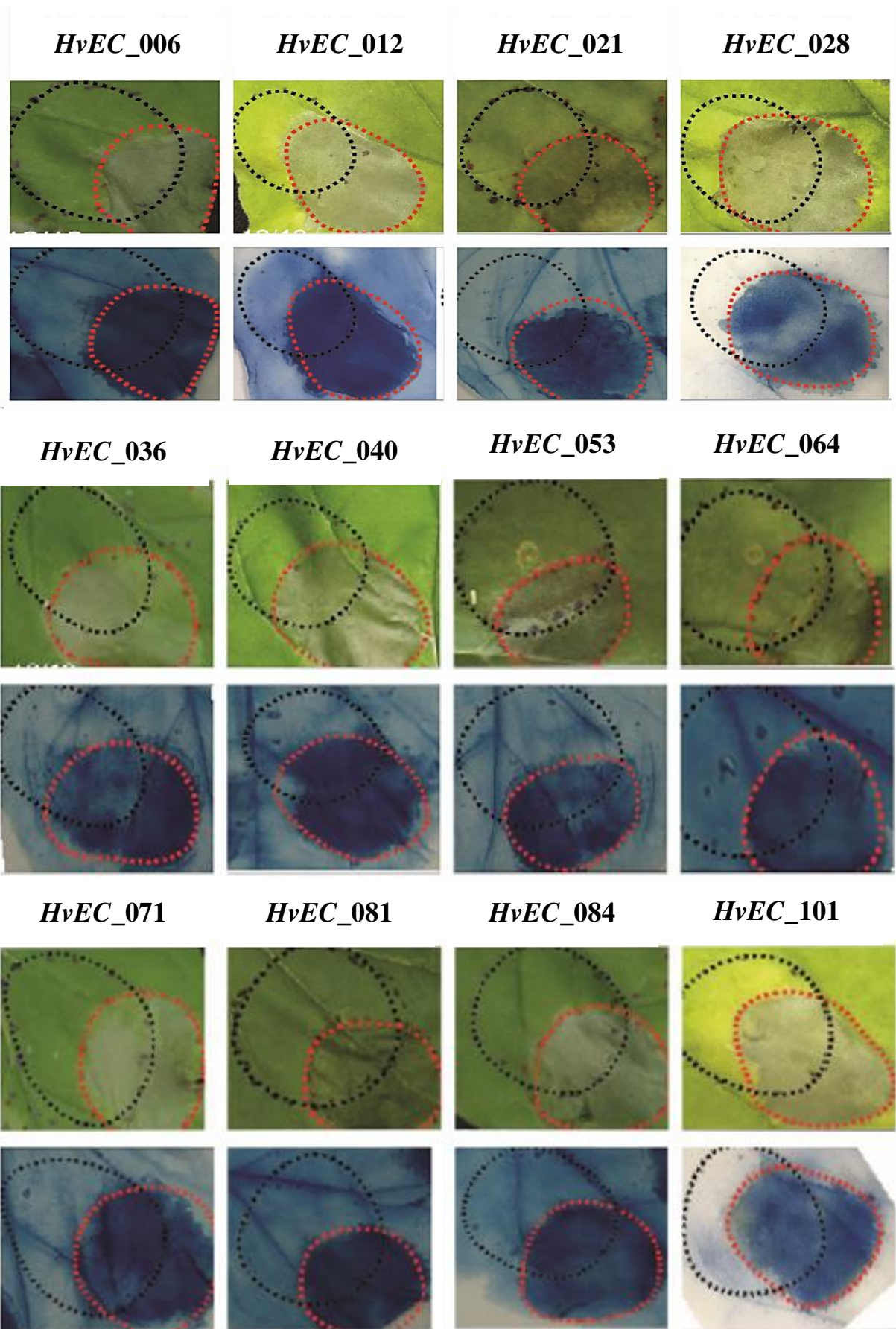


FIGURA 3. Continuação...

4.3. Determinação da curva de crescimento populacional de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 no ensaio de coinfiltração com o clone de *P. fluorescens* EtHAN (pEDV6::HvEC-064).

Para comprovar a supressão de PTI nas folhas de *N. benthamiana*, avaliou-se o crescimento populacional da bactéria patogênica *Pst* DC3000 nas áreas foliares coinfiltradas com *Pf* EtHAN (pEDV6::HvEC-064) e *Pf* EtHAN não transformada. A expressão transiente do efector HvEC-064 permitiu a proliferação da população de *Pst* DC3000 na área foliar previamente infiltrada com *Pf* EtHAN (pEDV::HvEC-064). Esse crescimento foi maior a partir de 36 horas após a infiltração (hai), atingindo uma diferença máxima de quase 3 logaritmos em 48 hai, quando comparado com a população de *Pst* DC3000 coinfiltrada com *Pf* EtHAN não transformada (Figura 4). A população de *Pst* DC3000 nas áreas foliares coinfiltradas com *Pf* EtHAN não transformada cresceu apenas um logaritmo em 24 hai e se manteve constante ao longo dos tempos amostrados, indicando que a imunidade desencadeada por PAMPs restringiu o crescimento de *Pst* DC3000 no limbo foliar de *N. benthamiana*. Sendo assim, conclui-se que a proteína efetora HvEC-064 suprimiu a resposta de defesa da planta permitindo o crescimento da população de *Pst* DC3000.

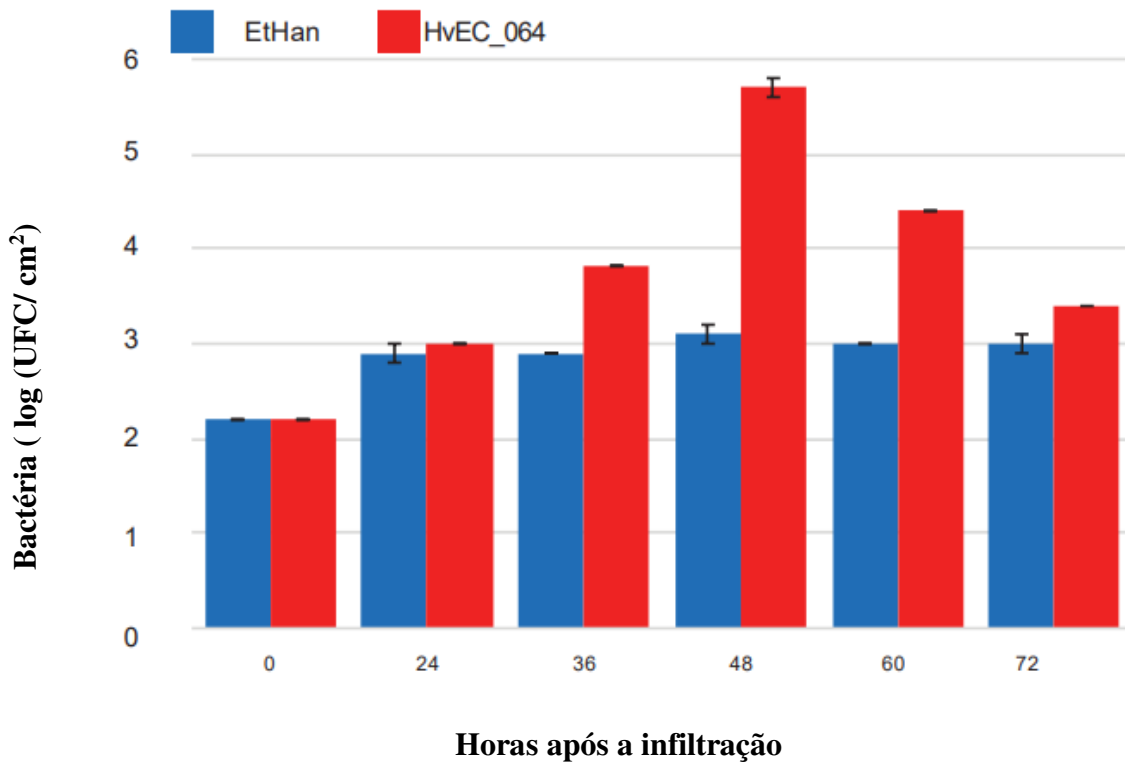


FIGURA 4. Curva de crescimento populacional de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 nas áreas foliares de *Nicotiana benthamiana* coinfiltradas com *Pf* EtHAN transformada com a construção pEDV6::*HVEC-064* (barra em vermelho) e *Pf* EtHAN não transformada (barra em azul). Dois discos foliares de 1 cm de diâmetro nas interseções das áreas coinfiltradas foram coletados nos tempos 0, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a segunda infiltração e triturados em tampão MgCl₂ 10 mM. Alíquotas das diluições seriadas foram plaqueadas em meio King B sólido contendo os antibióticos rifampicina (100µg/ml) e gentamicina (25µg/ml), para seleção e contagem das colônias (UFU) de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

5. DISCUSSÃO

O estudo funcional de proteínas efetoras de fitopatógenos requer análise da sua expressão e localização celular durante a interação com as plantas. Por meio da geração de mutantes e subsequente inoculação em plantas, comprova-se a alteração do fenótipo desta interação. Infelizmente, no caso da ferrugem do cafeeiro essa abordagem ainda não é exequível devido à dificuldade de manipulação genética e transformação desse patógeno, associada à sua natureza biotrófica, que demanda manuseio no próprio hospedeiro. Para suplantar essas barreiras e identificar genes de *H. vastatrix* importantes para a patogenicidade outras abordagens têm sido empregadas. Por exemplo, Maia (2013) utilizou com sucesso *P. syringae* pv. *garcae*, bactéria patogênica ao cafeeiro, e o sistema EDV para expressar e translocar proteínas de *H. vastatrix* candidatas a efetores no citoplasma de diferentes genótipos de cafeeiro com intuito de identificar proteínas efetoras reconhecidas direta ou indiretamente por proteínas codificadas pelos diferentes genes de resistência, *S_H1* a *S_H9*. O fenótipo esperado nesse caso seria a supressão do crescimento da bactéria ou da indução da HR nas interações da bactéria transformada com genes candidatos a efetores-genótipos de cafeeiro avaliados, onde o reconhecimento direto ou indireto das proteínas candidatas a efetores resulta na ativação da imunidade ativada por efetores (ETI). Maia (2013) comprovou a validade dessa abordagem identificando um gene candidato a efector (*HvEC_016*) capaz de suprimir o crescimento de *P. syringae* pv. *garcae* em folhas de cafeeiros portadores do gene *S_H1* e de promover o crescimento da mesma bactéria em genótipos suscetíveis. Essa dualidade de fenótipo, indução de ETI e promoção do parasitismo, é esperada e tem sido observada para muitos efetores caracterizados em diferentes patógenos (Chaparro-Garcia *et al.* 2014; Ellis *et al.* 2009).

Por utilizar uma bactéria patogênica ao cafeeiro, o sistema utilizado por Maia (2013) não permite identificar genes candidatos a efetores que poderiam codificar proteínas efetores capazes de suprimir a imunidade ativada por PAMPs (PTI). A supressão dessa linha de defesa, é uma etapa básica que tem que ser cumprida para que o patógeno seja capaz de causar doença em determinada espécie de planta. Por exemplo, *H. vastatrix* deve possuir efetores capazes de suprimir a imunidade ativada decorrente de reconhecimento de seus PAMPs, por exemplo a quitina e glucanos. Um sistema baseado na bactéria saprófita *P. fluorescens* EtHAN associado ao sistema EDV e a bactéria patogênica incompatível com o cafeeiro pode ser estabelecido para essa finalidade. Um fato complicador para o uso dessa abordagem em cafeeiro é o fenômeno

de resistência dependente da idade dos tecidos (Oliveira & Romeiro, 1991). Por exemplo, folhas jovens com brilho e suculentas são mais suscetíveis tanto a *H. vastatrix* quanto *P. syringae* pv. *garcae*. Esse fenômeno tem que ser levado em consideração no processo de triagem dos efetores e de certa forma, limita a capacidade de triagem de um grande número de candidatos, por limitar a disponibilidade de material vegetal disponível para os experimentos. Desta forma, optou-se neste trabalho pela utilização de um sistema heterólogo, amplamente validado para identificar efetores de bactérias, fungos e oomicetos (Badel *et al.* 2013), para efetuar ensaios de supressão de PTI de 54 candidatos a efetores, previamente identificados por Maia (2013) com base na caracterização do transcriptoma de esporos germinados e de uma interação compatível.

Dos 54 candidatos a efetores testados, dezesseis efetores (29,7%) apresentaram capacidade de suprimir PTI com alta reprodutibilidade em diferentes experimentos de co-infiltração de *Pf* EtHAN com a bactéria patogênica *Pst* DC3000 em *N. benthamiana*. A supressão de PTI causada pela expressão dos efetores foi visualizada pela ocorrência da reação de hipersensibilidade (HR) em decorrência do reconhecimento de efetores de *Pst* DC 3000. A supressão da HR por PTI é devido à restrição indireta ou direta da translocação de efetores pelo SST3 (Crabill *et al.*, 2010). Assim, os efetores de *H. vastatrix* ao suprimir PTI, “relaxam” essa restrição, permitindo que *Pst* DC3000 injete os seus efetores nas células de *N. benthamiana*, onde são reconhecidos por componentes do sistema imune (ETI), resultando na HR. Essa atividade supressora do candidato *HvEC_064* foi comprovada pela maior multiplicação de *Pst* DC3000 nos tempos que antecedem a observação de HR, fenômeno comum nas interações incompatíveis envolvendo bactérias fitopatogênicas (Alfano & Collmer, 1996; Klement, 1963), e pela redução da viabilidade das células nos tecidos que tinham sido previamente infiltrados com *Pf* EtHAN expressando esses efetores.

Conforme foi demonstrado por Maia (2013), os dezesseis efetores de *H. vastatrix* que foram capazes de suprimir PTI em *N. benthamiana* apresentam diferentes padrões de expressão gênica durante a interação e codificam proteínas secretadas com características distintas e de função desconhecida. Isso consolida a atuação desses efetores em diferentes componentes das vias de transdução de sinais envolvidas na PTI. A variabilidade da intensidade e frequência de supressão nos ensaios, evidenciada pelo aspecto da necrose na área de sobreposição das co-infiltrações, assim como a região de células mortas observadas na coloração com azul de tripano, pode indicar uma diferença de afinidade das proteínas efetoras com os seus alvos e/ou diferentes contribuições dos genes alvos das vias de transdução de sinais na manifestação da PTI. Coletivamente, esses resultados podem sugerir que *H. vastatrix* possui múltiplos efetores

capazes de suprimir a resposta imune em *N. benthamiana* e provavelmente em cafeeiro. Todavia, é necessário verificar se o mesmo conjunto de efetores identificados neste estudo é também capaz de suprimir PTI no cafeeiro, já que são plantas de famílias diferentes, e interações específicas devem ter ocorrido durante a coevolução de *H. vastatrix* com o cafeeiro.

Nesse sentido é interessante destacar os resultados obtidos por Liu *et al.* (2016) e Ramachandran *et al.* (2016) que corroboram a possibilidade de transferência de resultados obtidos em sistemas heterólogos muito diferentes, *N. benthamiana* e trigo, por exemplo. Usando o mesmo sistema de análise funcional empregado no presente estudo, Liu *et al.* (2016) identificaram um efector de *Puccinia striiformis* (PEC6) capaz de suprimir PTI em *N. benthamiana*. Esse mesmo efector foi capaz de suprimir PTI em trigo, planta hospedeira do patógeno, permitindo a ativação de ETI por *Pst* DC3000. Eles demonstraram também que o efector PEC6 interage com adenilato quinases (ADKs) de trigo e *Arabidopsis* e que o silenciamento da expressão de ADKs de trigo, por meio da técnica de HIGS (*Hostinduced gene silencing*), reduz o número de pústulas de *P. striiformis* e o crescimento de folhas. Como ADKs tem papel importante na regulação do metabolismo, na interconversão de citocininas e em reações de transferências de grupos metil, os autores sugerem que PEC6 poderia favorecer o processo infeccioso do patógeno atuando sobre ADK e interferindo em algum desses processos. Ramachandran *et al.* (2016), por sua vez, avaliaram 20 candidatos a efetores de *Puccinia graminis* e *Puccinia striiformis* e verificaram que nove são capazes de suprimir a indução de HR induzida em *N. benthamiana* pela expressão de quatro combinações de genes *Avr*/genes *R*, sendo esses efetores designados Shr1-Shr9 (*Supressors of hypersensitive response*). Além de suprimir HR, o efector Shr7 também suprimiu a PTI induzida pelo PAMP flg22 em *N. benthamiana*. A translocação da proteína efetora codificada por esse gene por meio de *Pf* EtHAn suprimiu a resposta de hipersensibilidade em trigo induzida pelos efetores de *Pst* DC3000, confirmando a sua atividade no sistema homólogo. Os resultados obtidos por Ramachandran *et al.* (2016) também forneceram evidência da existência de efetores em espécies de *Puccinia* capazes de suprimir diferentes respostas de defesa. Resultados similares foram observados para o efector Avr3a do oomiceto *Phytophthora infestans* por Chaparro-Garcia *et al.* (2014). Esse efector é capaz de suprimir as respostas de defesa mediadas por genes de resistência e flg22.

Efetores que suprimem PTI podem ser também detectados direta ou indiretamente pelas proteínas codificadas pelos genes R desencadeando a resposta de defesa ETI. Assim, é possível que algum efector com habilidade de suprimir funcione como genes de avirulência em genótipos

de cafeeiro com os genes de resistência S_H . Desta forma, é também importante efetuar a expressão das proteínas em células de genótipos de cafeeiro que constituem a série diferenciadora de raças de *H. vastatrix*. A utilização do sistema validado por Maia (2013) pode permitir verificar se algum desses efetores é capaz de elicitar HR ou suprimir sintomas causados pela bactéria *P. syringae* pv. *garcae*, em uma maneira S_H -específica.

Os efetores supressores de PTI identificados nesse estudo também podem ser usados como sondas para identificar seus alvos celulares em *N. benthamiana* e no cafeeiro, por meio das técnicas de duplo-híbrido em leveduras (Liu, 2016) e coimunoprecipitação associada a espectrometria de massas (Yin & Hulbert, 2011). A identificação desses alvos e validação da sua contribuição para adaptabilidade do patógeno pode oferecer oportunidades de desenvolvimento de variedades de cafeeiro resistentes não transgênicas por meio de técnicas de edição gênica (Bortesi & Fisher, 2015).

Por fim, os estudos funcionais poderiam ser complementados por estudos de localização subcelular utilizando o sistema heterólogo *N. benthamiana* que tem se tornado sistema-padrão para estudos dessa natureza envolvendo patógenos parasitas obrigatórios (Petre *et al.*, 2016; Badel *et al.* 2013). Esses estudos permitirão validar e compreender como *H. vastatrix* modula os processos fisiológicos do hospedeiro, oferecendo novas oportunidades para o controle genético da ferrugem do cafeeiro, como já ressaltado anteriormente. Talvez, seja também possível obter uma resistência mais duradoura, por meio da edição simultânea de diferentes alvos com significativa contribuição para o processo infeccioso de patógenos obrigatórios (Petre *et al.*, 2016).

6. CONCLUSÕES

- i.* Dezesesseis candidatos a efetores de *H. vastatrix* foram capazes de suprimir PTI com alta reprodutibilidade em diferentes experimentos de coinfiltração de *Pf* EtHAn com a bactéria patogênica *Pst* DC3000 em *N. benthamiana*;
- ii.* A supressão de PTI pelo gene candidato *HvEC_064* foi confirmada analisando-se o crescimento populacional de *Pst* DC3000 e morte celular nos tecidos infiltrados onde ocorreu, ou não, a supressão de PTI e ativação de PTI;
- iii.* Os dezesseis efetores identificados devem atuar em diferentes componentes das vias de transdução de sinais envolvidas na PTI, pois estudos prévios feitos por Maia (2013) sugerem que esses genes apresentam diferentes padrões de expressão durante a interação de *H. vastatrix* com o cafeeiro e codificam proteínas secretadas com características distintas e de função desconhecida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC 2016. **Associação Brasileira da Indústria do Café**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#consint2015.2>>.

Acesso em: 25 maio 2016.

ALFANO J. R.; COLLMER, A. **Bacterial pathogens in plants: life up against the wall**. The Plant Cell, 1996, p. 1683-1698.

ALMEIDA, S. R. Doenças do cafeeiro. In: RENA, A.B; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M., YAMADA, T. (Orgs.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato, 1986, p. 391-399.

BADEL J. L.; PIQUEREZ S. J. M.; GREENSHIELDS D.; RALLAPALLI G.; FABRO G.; ISHAQUE N.; JONES J. D. G. **Plant effector, competition assays detect *Hyaloperonospora arabidopsidis* effectors that contribute to virulence and localize to different plant subcellular compartments**. Molecular Plant-Microbe Interactions. v. 26, n.7, 2013, p. 745-757.

BAI X.; CORREA, V. R.; TORUÑO, T. Y.; AMMAR, D.; KAMOUN. S.; HOGENHOUT, S.A. **AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei**. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, p. 18-30.

BECK, M.; HEARD, W.; MBENGUE, M.; & ROBATZEK, S. **The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface**. Current Opinion Plant Biology, v.15, 2012, p. 67–74.

BEDENDO, I. P.; Ferrugens. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: princípio e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 3ed. v. 1 1995, p. 872-880.

BETTENCOURT, A. J.; RODRIGUES, C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. In: Clake, R. J, Macrae, R. **Coffee: Agronomy**. London: Elsevier Applied Science, 1988, p. 285-292.

BIRCH, P. R. J.; REHMANY, A. P.; PRITCHARD, L.; KAMOUN, S.; BEYNON, J. L. **Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells**. Trends Microbiology, v.14, 2006, p. 8–11.

BLOCK, A.; LI, G.; FU, Z. Q.; ALFANO, J. R. **Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets**. Current Opinion Plant Biology, v.11, 2008, p. 396–403.

BOLLER, T.; FELIX, G. A. **Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors**, v. 60. *Plant Biology*, 2009, p. 79–406.

BORTESI, L.; FISHER, R. **The CRISPR/CAS9 system for plant genome editing and beyond**. *Biotechnology Advances*, v. 33, 2015, p. 41-52.

BOS, J. I. B.; CHAPARRO-GARCIA, A.; QUESADA-OCAMPO, L. M.; MCSPADDEN-GARDENER, B. B.; KAMOUN, S. **Distinct amino acids of the *Phytophthora infestans* effector AVR3a condition activation of R3a hypersensitivity and suppression of cell death**. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v.22, 2009, p. 269-281.

BRUCE, M.; NEUGEBAUER, K. A.; JOLY, D. L.; MIGEON, P.; CUOMO, C. A.; WANG, S.; AKHUNOV, E.; BAKKEREN, G.; KOLMER, J. A.; FELLERS, J. P. **Using transcription of six *Puccinia triticina* races to identify the effective secretome during infection of wheat**. *Front in Plant Science*, 2013.

CANTU, D.; GOVINDARAJULU, M.; KOZIK, A.; WANG, M.; CHEN, X.; KOJIMA, K. K.; JURKA, J.; MICHELMORE, R. W.; DUBCOVSKY, J. **Next generation sequencing provides rapid access to the genome of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat stripe rust**. *Plos One*, 2011.

CANTU, D.; SEGOVIA, V.; MACLEAN, D.; BAYLES, R.; CHEN, X.; KAMOUN, S.; DUBCOVSKY, J.; SAUNDERS, D. G. O.; UAUY, C. **Genome analyses of the wheat yellow (stripe) rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveal polymorphic and haustorial expressed secreted proteins as candidate effectors**. *Genomics*, v.14, 2018, p. 270.

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

CHAPARRO-GARCIA, A.; SCHWIZER, S.; SKLENAR, J.; YOSHIDA, K.; PETRE, B.; BOS, J. I. B.; SCHORNACK, S.; JONES, A. M. E.; BOZKURT, T. O.; KAMOUN, S. ***Phytophthora infestans* RXLR- WY effector AVR3a associates with Dynamin-Related Protein 2 required for endocytosis of the plant pattern recognition receptor FLS2**. *Plos One*, 2014.

CHEN, L. Q.; HOU, B. H.; LALONDE, S.; TAKANAGA, H.; HARTUNG, M. L.; QU X. Q.; GUO, W. J.; KIM, J. G.; UNDERWOOD, W.; CHAUDHURI, B.; CHERMAK, D.; ANTONY, G.; WHITE, F. F.; SOMERVILLE, S. C.; MUDGETT, M. B.; FROMMER, W. B. **Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens**. *Nature*, v.468, 2010, p. 527-32.

CRABILL, E.; JOE, A.; BLOCK, A.; VAN ROOYEN, J. M.; ALFANO, J. R.; **Plant immunity directly or indirectly restricts the injection of type III effectors by the *Pseudomonas syringae* type III secretion system.** Cidade: Plant Physiology, 2010.

CRISTANCHO, M. A.; BOTERO-ROZO, D. O.; GIRALDO, W.; TABIMA, J.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; ESCOBAR, C.; ROZO, Y.; RIVERA, L. F.; DURÁN, A.; RESTREPO, S.; EILAM, T.; ANIKSTER, Y.; GAITÁN, A. L. **Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales.** In: Front in Plant Science: eCollection, 2014.

DALIO, R. J. D.; **Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.).** Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM), Freising, Germany, 2013.

DARDICK, C.; SCHWESSINGER, B.; RONALD, P. **Non-arginine-aspartate (non-RD) kinases are associated with innate immune receptors that recognize conserved microbial signatures.** Current Opinion Plant Biology, v.15, 2012, p. 358–66.

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, 2004, p. 755–768.

DUPLESSIS, S.; CUOMO, C. A.; LIN, Y.; AERTS, A.; TISSERANT, E.; VENEAULT-FOURREY, C.; JOLY, D. L.; HACQUARD, S.; AMSELEM, J.; CANTAREL, B. L.; CHIU, R.; COUTINHO, P. M.; FEAU, N.; FIELD, M.; FREY, P.; GELHAYE, E.; GOLDBERG, J.; GRABHERR, M. G.; KODIRA, C. D.; KOHLER, A.; KÜES, U. LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S. M.; MAGO, R.; MAUCELI, E.; MORIN, E.; MURAT, C.; PANGILINAN, J. L.; PARK, R.; PEARSON, M.; QUESNEVILLE, H.; ROUHIER, N.; SAKTHIKUMAR, S.; SALAMOV, A. A.; SCHMUTZ, J.; SELLES, B.; SHAPIRO, H.; TANGUAY, P.; TUSKAN, G. A.; HENRISSAT, B.; VAN DE PEER Y.; ROUZÉ, P.; ELLIS, J. G.; DODDS, P. N.; SCHEIN, J. E.; ZHONG, S.; HAMELIN, R. C.; GRIGORIEV, I.V.; SZABO, L. J.; MARTIN, F. **Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v.108, 2011, p. 9166-9171.

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, v.14, 2009, p. 399-405.

ELMORE, J. M.; LIN, Z. J. D.; COAKER, G. **Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams,** Current Opinion in Plant Biology, v.14, 2011, p. 365–71.

EMBRAPA 2016. **Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cafe/busca-de-publicacoes//publicacao/971467/_producaodecafe-cereja-descascado-equipamentos-e-custo-de-processamento>. Acesso em: 25 maio 2016.

FERNANDEZ, D.; TISSERANT, E.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.; VIEIRA, A.; PETITOT, A. S.; LOUREIRO, A.; POULAIN, J.; DA SILVA, C.; SILVA, M. D. C.; DUPLESSIS, S. **454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction**, *Molecular Plant Pathology*, v.13, 2012, p. 17-37.

FLOR, H. **Current status of the gene-for-gene concept**. *Phytopathology*, v.9, 1971, p. 275-296.

_____. **Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini***. *Phytopathology*, v.32,1942, p. 653–669.

GARNICA, D. P.; UPADHYAYA, N. M.; DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P.; **Strategies for wheat stripe rust pathogenicity identified by transcriptome sequencing**. *Plos One*, v.8, 2013.

GASSMANN, W.; BHATTACHARJEE, S. **Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks**. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v.25,2012, p. 862-868.

GAWEHNS, F.1.; CORNELISSEN, B. J.; TAKKEN, F.L. **The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity**. *Microbiology Biotechnology*, v.3, 2012, p. 9-223.

GICHURU, E. K.; ITHIRU, J. M.; SILVA, M. C.; PEREIRA, A. P.; VARZEA, V. M. P. **Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya**. *Tropical Plant Pathology*, v.37, 2012, p. 424-427.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S. K.; PARK, S. W. **Plant disease resistance genes: current status and future directions**. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.78, 2012, p. 51–65.

HACQUARD, S.; DELARUELLE, C.; FREY, P.; TISSERANT, E.; KOHLER, A.; DUPLESSIS, S. **Transcriptome analysis of poplar rust telia reveals overwintering adaptation and tightly coordinated karyogamy and meiosis processes**. *Front in Plant Science*, v.4, 2012.

HOUTERMAN, P. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M. **Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector.** Plos Pathogens, v.4, 2008.

IOC 2016. **Internation Coffee Organization.** Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/ml-exports>>. Acesso em: 25 MAIO 2016.

JONES J. D. G.; DANGL J. L. **The plant immune system.** Nature, v.444 2006, p. 9-323.

KAMOUN, S. The secretome of plant-associated fungi and Oomycetes. In: DEISING, H. **Plant Relationships.** 2nd Edition. Berlin: Springer-Verlag, 2009, p. 173– 80.

KELLEY, B. S.; LEE, S. J.; DAMASCENO, C. M. B.; CHAKRAVARTHY, S.; KIM, B. D.; MARTIN, G. B.; ROSE, J. K. C. **A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death.** The Plant Journal, v.62, 2010, p. 66-357.

KLEMENT, Z. **Rapid Detection of The Pathogenicity of Phytopathogenic Pseudomonads.** Nature, v.199, 1963, p. 299-300.

KUSHALAPPA, A. C.; CHAVES, G. M. **An analysis of the development of coffee rust in the field.** Fitopatologia Brasileira, v. 5, 1980, p. 95-103.

LINK, T. I.; LANG, P.; SCHEFFLER, B. E.; DUKE, M.V.; GRAHAM, M. A.; COOPER, B.; TUCKER, M. L.; VAN DE MORTEL, M.; VOEGELE, R. T.; MENDGEN, K.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. **The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families.** Molecular Plant Pathology, v.15, 2014, p. 379-393.

LIU, C.; PEDERSEN, C.; SCHULTZ-LARSEN, T.; AGUILAR, G. B.; MADRIZORDEÑANA, K.; HOVMØLLER, M. S.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. **The stripe rust fungal effector PEC6 suppresses pattern-triggered immunity in a host species-independent manner and interacts with adenosine kinases.** New Phytologist, 2016.

MACKEY D.; HOLT, B. F.; WIIG A.; DANGL, J. L. **RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1- mediated resistance in *Arabidopsis*.** Cell, 2002, p.743-54.

MAFFIA, L. A.; SILVA-ACUÑA, R.; ZAMBOLIM, L.; BERGER, D. **Incidence severity relationships on the pathosystem *Coffea arabica* L. - *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.** Plant Disease, v.83, 1999, p. 186-188.

MAIA, T. A. **Identificação e análise funcional de efetores de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro.** 124 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013.

MAPA 2015. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Informe estatístico do café. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Estatistica/Caf%C3%A9/InformeCafe-09-2015.xlsx>. Acesso em: 4 maio 2016.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R. **A ferrugem do cafeeiro no Brasil e seu controle.** Varginha: MAPA/PROCAFE, 2006.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. **Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition**, v. 91. Cidade: Cell, 1997, p. 8-295.

NEMRI, A.; SAUNDERS, D. G. O.; ANDERSON, C.; UPADHYAYA, N. M.; WIN, J.; LAWRENCE, G. J.; JONES, D. A. KAMOUN, S.; ELLIS, J. G.; DODDS, P. N. **The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*.** Front in Plant Science, v.5, 2014.

OLIVEIRA, J. M. R.; ROMEIRO, R. S.; MUCHOVEJ, J. J. **Population tendencies of *Pseudomonas cichorii* and *P. syringae* pv. *garcae* in young and mature coffee leaves.** Journal of Phytopathology, v.131, 1991, p. 210-214.

PETRE, B.; LORRAIN, C.; SAUNDERS, D. G. O.; WIN, J.; SKLENAR, J.; DUPLESSIS, S.; KAMOUN, S. **Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts.** Cellular Microbiology, v.18, 2016, p. 453-465.

POZZA, A. A. A.; PRIETO MARTINEZ, H. E.; CAIXETA, S. L. **Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.36, 2001, p. 53-60.

RAMACHANDRAN, S.; YIN, C.; KUD, J.; TANAKA, K.; MAHONEY, A.; XIAO, F.; HULBERT, S. H. **Effectors from wheat rust fungi suppress multiple plant defense responses.** Phytopathology, 2016.

RAMIRO, D. A.; ESCOUBE, J.; PETIOT, A. S.; NICOLE, M.; MALUF, M. P.; FERNANDEZ, D. **Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defense responses in resistant and susceptible coffee cultivars**, v. 58. Plant Pathology, 2009, p. 944-955.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. **Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa.** Trends Microbiology, v.12, 2004, p. 944-955.

SAUNDERS, D. G. O.; WIN, J.; CANO, L. M.; SZABO, L. J.; KAMOUN, S.; RAFFAELE, S. **Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi.** Plos One, 2012.

SCHORNACK, S.; DAMME, M. V.; BOZKURT, T. O.; CANO, L. M.; SMOKER, M.; THINES, M.; GAULIN, E.; KAMOUN, S.; HUITEMA, E. **Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v.107, 2010, p. 6-17421.

SHARMA, T. R.; RAI, A. K.; GUPTA, S. K.; VIJAYAN, J.; DEVANNA, B. N. **Gestão de explosão de arroz através da resistência da planta hospedeira: retrospectiva e perspectivas.** Agricultural Research, v.1, 2012.

SOHN, K. H.; LEI, R.; NEMRI, A.; JONES, J. D. **The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*.** Plant Cell, v.19, 2007, p. 4077- 4090.

SOUZA, T. A. DE; SOPRANO, A. S.; LIRA, N. P. V. DE; QUARESMA, A. J. C.; PAULETTI, B. A.; PAES LEME, A. F.; BENEDETTI, C. E. **The TAL effector PthA4 interacts with nuclear factors involved in RNA-dependent 42 processes including a HMG protein that selectively binds poly(U) RNA.** Plos One, 2012.

THOMAS, W. J.; THIREAULT C.A., KIMBREL J.A. & CHANG J.H. **Recombineering and stable integration of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp/hrc cluster into the genome of the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf01.** The Plant Journal, v. 60, 2009, p. 919-928.

TSUDA, K.; KATAGIRI, F. **Comparing signaling mechanisms engaged in pattern triggered and effector-triggered immunity.** Current opinion in Plant Biology, v.13, 2010, p. 459-465.

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.** Molecular Plant Microbe Interactions, v.27, 2014, p. 255–264.

VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. Efeito da temperatura no período latente de *Hemileia vastatrix* Berk & Br., agente causal da ferrugem do cafeeiro. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL.** Poços de Caldas: Resumos expandidos. Embrapa/Café, v. 2, 2004, p. 175-178.

VÁRZEA, M. P. V.; MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. *Coffea* durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, M.P.V. (Orgs). **Durable Resistance to coffee leaf rust**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005, p. 53-74.

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

WIN, J.; CHAPARRO-GARCIA, A.; BELHAJ, K.; SAUNDERS, D. G.; YOSHIDA, K.; DONG, S.; SCHORNACK, S.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S. HOGENHOUT, S. A.; KAMOUN, S. **Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives**. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2012.

YIN, C.; HULBERT, S. H. **Prospects of functional analysis of effectors from cereal rust fungi**. *Euphytica*, v.179, 2011, p. 57-67.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. **Controle de doenças de Plantas**. Brasília-DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997, p. 83-179.

ZAMBOLIM, L., VALE, F. X. R.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. **Manejo integrado das doenças do cafeeiro**. In: **Encontro sobre produção de café com qualidade**, v. 1. Viçosa/MG:, 1999, p. 134-215.

ZAMBOLIM, L. **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa: UFV, 2001.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Epidemiologia e controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.).In: ZAMBOLIM, L. (Org.) **O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2002, p. 369-433.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*Coffea arábica* e *Coffea canephora*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres,4 ed.,2005.