

GUSTAVO ADOLFO MARIN RAMIREZ

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Hemileia vastatrix* CANDIDATOS A EFETORES CAPAZES DE ATIVAR OU SUPRIMIR RESPOSTAS DE DEFESA NO CAFEIEIRO

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
2015

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

T

M337i
2015 Marin Ramirez, Gustavo, 1988-
Identificação de genes de *Hemileia vastatrix* candidatos a efetores
capazes de ativar ou suprimir respostas de defesa no cafeeiro / Gustavo
Marin Ramirez. - Viçosa, MG, 2015.
xi, 53f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Cafeeiro. 2. *Hemileia vastatrix*. 3. Proteínas. 4. Ferrugem. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia.
Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.73

GUSTAVO ADOLFO MARIN RAMIREZ

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Hemileia vastatrix* CANDIDATOS A EFETORES CAPAZES DE ATIVAR OU SUPRIMIR RESPOSTAS DE DEFESA NO CAFEIEIRO

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: 26 de Março de 2015

Antônio Carlos Baião de Oliveira

Thiago Andrade Maia

Jose Rogerio de Oliveira

Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

A Deus, sobretudo,
Aos meus pais, Diego e Consuelo,
À minha Esposa Claudia
À minha filha Martina,
À minha avó Margarita

Dedico!

“E disse Deus: Produza a terra erva verde,
erva que dê semente.... E assim foi”
Gênesis 1:11

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e oportunidade de realizar meus sonhos.

À minha família, pelo apoio incondicional, amor e compreensão.

À minha esposa Claudia, por dividir comigo esta etapa da minha vida, por todo amor, carinho e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do mestrado e formação profissional.

Ao professor Sergio Hermínio Broommonschenkel, pela orientação, profissionalismo, amizade, apoio e, principalmente, pela paciência e confiança depositada durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento da Fitopatologia (UFV) pela colaboração e valiosos ensinamentos.

À Organização dos Estados Americanos (OEA), ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. José Rogério de Oliveira e ao Dr. Antônio Carlos Baião de Oliveira por gentilmente aceitarem participar da banca de defesa.

Aos pesquisadores Jorge Badel e Thiago Maia pelas importantes sugestões durante a elaboração desta dissertação.

À bióloga Natalia Penido Lopez, técnica responsável pelo sequenciamento no Laboratório de Genômica e Genética.

Aos meus colegas integrantes e ex-integrantes do laboratório de Genômica e Genética de Interação Planta - Patógeno (LGGIPP): Jamile, Priscilla, Natália, Flavio, Jorge, Tadeu, Luís, Daniel, Sirlaine, Luciano, Danielle, Bernadete, Celio, Paulo, Fernanda, Thais, Gustavo e Bernardo pelo convívio, amizade e disponibilidade em ajudar.

Aos meus colegas de turma do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, especialmente ao Vinicius, Leonardo, Leandro e Renata pelas horas de estudo e amizade.

Aos meus amigos brasileiros e a todas as pessoas que, de alguma forma, me auxiliaram, compartilharam bons momentos comigo e permitiram que eu conhecesse sua cultura.

Meus sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

GUSTAVO ADOLFO MARIN RAMIREZ, filho de Consuelo Ramirez Perez e Diego Fernando Acosta Lopez, nasceu em Cali, Vale do Cauca – Colômbia no dia 30 de Agosto de 1988.

Ingressou na Universidade Nacional da Colômbia sede Palmira (UNAL) em Janeiro de 2006, concluindo o curso de Engenharia Agrônômica em Julho de 2011. Durante os anos 2009 e 2010, esteve vinculado à Faculdade de Agronomia como Assistente de Pesquisa. Em 2011, trabalhou como Assistente Técnico e Pesquisador Jovem na área de fitopatologia do setor frutícola na Corporação Colombiana de Pesquisa Agropecuária (CORPOICA).

No primeiro semestre de 2013 iniciou o mestrado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Interação Planta-Patógeno, trabalhando no patossistema *Hemileia vastatrix*-Cafeeiro, sob a orientação do Prof. Sergio Hermínio Brommonschenkel.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Importância Econômica da Cultura do Cafeeiro.....	4
2.2 O fungo <i>Hemileia vastatrix</i> , agente causal da Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro	6
2.3 Controle Genético da Resistência do Cafeeiro a <i>Hemileia vastatrix</i>	7
2.4 Variabilidade Genética de <i>Hemileia vastatrix</i>	9
2.5 O Sistema imune das plantas e as proteínas efetoras.....	10
2.6. O processo infeccioso de <i>Hemileia vastatrix</i>	12
2.7. Identificação e caracterização funcional de genes efetores.....	15
MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1.1 Genótipos de cafeeiro inoculados.....	19
3.1.2 Obtenção de clones de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> contendo genes de <i>Hemileia vastatrix</i> candidatos a efetores corretamente clonados no vetor pEDV6.....	20
3.1.3 Análise funcional dos genes candidatos a efetores em genótipos de cafeeiros baseado no SST3 de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	22
3.1.4 Determinação do crescimento de populações de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> <i>in vivo</i>	22
3.2 Estimativas do crescimento de populações de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> <i>in vitro</i>	23
3.3 Resposta de Hipersensibilidade em Tabaco.....	24
RESULTADOS.....	26
4.1 Clonagens dos genes candidatos a efetores de <i>H. vastatrix</i> no vetor pEDV6 e análise de expressão transiente em folhas de cafeeiro mediado pelo SST3 de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	26
4.2 Determinação do crescimento de populações de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> <i>in vivo</i>	35
4.2.1- Crescimento populacional de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> estirpe <i>Psg</i> 1723 pEDV:: HvEC _016 em genótipos de cafeeiros contendo o gene <i>S_H1</i>	35

4.2.2- Aumento da virulência de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> . (<i>Psg</i> 1723) pEDV:: HvEC _016 em genótipos de cafeeiro com ausência do gene <i>S_{H1}</i>	35
4.2.3- Estabilidade dos construções pEDV::HvECs em <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> . (<i>Psg</i> 1723).....	37
4.3 Determinação do crescimento de populações de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> . (<i>Psg</i> 1723) <i>in vitro</i>	39
4.4 Reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco infiltradas com diferentes concentrações de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> (<i>Psg</i> 1723) contendo as construções com os genes candidatos a efetores de <i>H. vastatrix</i>	40
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

MARIN RAMIREZ, Gustavo A, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Hemileia vastatrix* CANDIDATOS A EFETORES CAPAZES DE ATIVAR OU SUPRIMIR RESPOSTAS DE DEFESA NO CAFEIEIRO.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

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 interação biotrófica. Algumas dessas proteínas efetoras, denominadas proteínas de avirulência (Avr), são reconhecidas por proteínas codificadas por genes de resistência, o que desencadeia uma resposta de defesa da planta contra a infecção pelo patógeno. Estudos prévios demonstraram que a proteína HvEC-016 secretada por *H. vastatrix* apresenta características de proteína de avirulência quando expressa transientemente em genótipos de cafeeiros portadores do gene de resistência *SH1*. No entanto, análises funcionais mais detalhadas ainda são necessárias para confirmar o papel dessa proteína durante a interação do patógeno com o cafeeiro. Desse modo, os objetivos deste estudo foram: (i) confirmar a atividade efetora da proteína HvEC_016 como fator de avirulência e/ou virulência em genótipos de cafeeiro com a presença ou ausência do gene de resistência *SH1*; (ii) avaliar a estabilidade dos plasmídeos nos clones bacterianos utilizados nos estudos da expressão transiente nos tecidos foliares de cafeeiro; (iii) identificar novas proteínas secretadas pela raça II de *H. vastatrix* (isolado Hv-01) que apresentam atividade de avirulência em cafeeiros com diferentes combinações de genes *SH*, utilizando o vetor de expressão transiente pEDV6 e o Sistema de Secreção Tipo III de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (estirpe 1723). Confirmaram-se as atividades funcionais de avirulência e virulência da proteína HvEC_016 por meio da avaliação do crescimento populacional do clone *Psg* 1723 pEDV::HvEC_016 em plantas de cafeeiro com e sem o gene *SH1*, respectivamente. A análise por PCR de colônia das células bacterianas isoladas a partir dos tecidos foliares infiltrados mostrou que o vetor pEDV6 apresentou estabilidade nos clones bacterianos

analisados. A expressão transiente de cinco genes candidatos a efetores (*HvEC_006*, *HvEC_054*, *HvEC_057*, *HvEC_081* e *HvEC_101*) suprimiu o desenvolvimento de sintomas da doença em cafeeiros portadores do gene *S_{H1}*. A análise do crescimento das populações desses clones em genótipos com ou sem o gene *S_{H1}* deverá ser futuramente efetuada para comprovar os resultados obtidos. A expressão transiente de proteínas efectoras putativas no citoplasma do cafeeiro mediante a aplicação do sistema EDV constitui uma metodologia importante para a identificação de genes de avirulência e/ou virulência de *H. vastatrix*.

ABSTRACT

MARIN RAMIREZ, Gustavo A, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **IDENTIFICATION OF *Hemileia vastatrix* CANDIDATE EFFECTOR GENES ABLE TO TRIGGER OR SUPPRESS THE DEFENSE RESPONSE IN COFFEE PLANTS.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

During the interaction with the host plant, rust fungi secrete a range of effector proteins, which modify the structure and function of the host cell allowing the establishment of the biotrophic interaction. The proteins encoded by resistance genes recognize some of these effector proteins, in this case also known as protein avirulence (Avr), and triggers a defense response in the plant that restricts further development of the pathogen. At least nine dominant genes (S_H1 - S_H9) which provide resistance to the coffee rust have been genetically identified. In addition, genes from *Hemileia vastatrix* that encode secreted proteins have also been characterized. A protein secreted by *H. vastatrix*, HVEC_016, with potential avirulence activity when expressed transiently in coffee genotype carrying the resistance gene S_H1 was previously identified. This transient expression was obtained using the pEDV6 expression vector and the type III secretion system (T3SS) of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. However, further functional analyses are required to confirm the role of HVEC_016 protein during the *H. vastatrix* interaction with coffee. Therefore, the purposes of this study were: (i) to confirm the HVEC_016 avirulence and/or virulence function in coffee genotypes with the presence or absence of the S_H1 resistance gene ; (ii) to analyse the stability of pEDV6 vector in the bacteria cells infiltrated into coffee leaves; (iii) to identify new proteins secreted by *H. vastatrix* (isolated HV-01) which have virulence activity in coffee plants with different combinations of S_H genes, by analyzing five effector candidate genes (HVECs) using pEDV6 and the T3SS of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (strain 1723). By analysing the population growth of the Psg 1723 PEDv::HVEC_016 clone in coffee plants, it was possible to confirm the avirulence and virulence activities of the HVEC_016 protein in the presence and absence of S_H1 gene, respectively. PCR analysis of bacteria colonies isolated from the infiltrated leaf tissue showed that pEDV6 vector is stable during the growth of the analysed clones in coffee leaves without selection.

Transient expression of five genes *HvECs* (*HvEC_006*, *HvEC_054*, *HvEC_057*, *HvEC_081* and *HvEC_101*) suppressed the development of disease symptoms in coffee genotypes with the *S_H1* gene. Additional experiments are underway to confirm these results and to verify if these effectors have virulence activity in coffee genotypes without resistance genes. These results also demonstrate the potential of pEDV6 and *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* for functional studies of candidate effectors from *H. vastatrix*.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro é uma das principais culturas de exportação e investimentos em países tropicais e subtropicais. O café é considerado um produto importante para a agricultura em todo o mundo, estando posicionado em segundo lugar como commodity depois do petróleo (ICO, 2013). Também ocupa posição de destaque no mercado internacional, sendo o Brasil o principal produtor e exportador de café (MAPA, 2014).

A produção cafeeira no Brasil está distribuída principalmente na região Sudeste, sendo os estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo os maiores produtores, com 49.9, 29.0 e 9.0%, respectivamente, da produção nacional (CONAB, 2014). Embora 103 espécies de café sejam relatadas, apenas duas possuem importância econômica. *Coffea arabica* e *Coffea canephora* contribuem com 65% e 35% da produção nacional (MAPA, 2014).

Diversos fatores podem limitar o rendimento da cultura, dentre eles as doenças bióticas. Doenças como Ferrugem, Cercosporiose, Rizoctoniose, Mancha Manteigosa, Mancha Aureolada e a Coffee berry disease – CBD têm papel relevante no comprometimento da produtividade (IAPAR, 2014). A ferrugem alaranjada do Cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, merece destaque por ter sido historicamente um problema recorrente em todo o globo. Estima-se que a ferrugem do cafeeiro possa causar perdas da ordem de 30% da produção na ausência de medidas fitossanitárias adequadas (Zambolim *et al.*, 2005).

Atualmente, as mudanças climáticas associadas à utilização de variedades susceptíveis e o deficiente manejo agrônomico, incluindo densidades acima de 10000 plantas por hectare, adubação insuficiente e controle químico inadequado, permitiram o surto da doença, especialmente na América Central e na Colômbia. Isso causou um grande impacto regional na produção da safra 2013-2014, gerando uma redução de sacas anual de 96.2%, e uma perda de 15.4% da produção referente a um ciclo da cultura (SIECA, 2014).

O uso de cultivares resistentes à ferrugem é comprovadamente eficiente no controle da doença (Zambolim *et al.*, 2005). Porém, a falta de conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade e virulência de *H.*

vastatrix e dos mecanismos envolvidos na resistência dos genótipos resistentes dificultam o desenvolvimento de cultivares com resistência durável.

Até o momento, foram geneticamente identificados pelo menos nove genes de efeito principal (S_H1 a S_H9) que conferem, isolados ou associados, resistência à ferrugem (Bettencourt e Rodrigues, 1988). Os genes $S_H1,2,4,5$ são encontrados em genótipos de café arábicas puros da Etiópia, S_H3 em seleções da Índia, e os $S_H6,7,8,9$ estão presentes em derivados do Híbrido de Timor. Esses genes são os recursos genéticos mais usado pelos programas de melhoramento na América (Romero *et al.*, 2014). No entanto, a resistência dos cafeeiros melhorados tem sido rapidamente suplantada pelo patógeno, dificultando o controle da doença por meio da utilização de cultivares resistentes (Zambolim *et al.*, 2005).

Durante a interação com o cafeeiro, *H. vastatrix* secreta diversas proteínas efetoras para suplantar as respostas de defesa do hospedeiro e promover o parasitismo (Fernandez, 2012; Maia, 2013). De modo geral, a resistência do cafeeiro à ferrugem ocorre após a formação dos haustórios secundários no mesófilo, cujo fenótipo característico é a indução de reação de hipersensibilidade (HR) (Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008; Ramiro *et al.*, 2009). Assim, é possível que proteínas efetoras produzidas no haustório e translocadas para o citoplasma do cafeeiro sejam reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes S_H . Dessa forma, a expressão transiente de proteínas secretadas de *H. vastatrix* no citoplasma de cafeeiros portadores de genes S_H pode ser utilizada como estratégia para identificar efetores com atividade de avirulência.

Entre as alternativas utilizadas para expressão transiente de proteínas candidatas a efetores no tecido foliar do hospedeiro é a agroinfiltração. No entanto, essa técnica é dificultada pelo fato de o tecido foliar do cafeeiro ser resistente à infecção por *Agrobacterium tumefaciens* (Van Boxtel *et al.*, 1995). Assim, um protocolo de expressão transiente em folhas de cafeeiro foi desenvolvido para a translocação de proteínas de *H. vastatrix* pelo Sistema de Secreção Tipo III (SST3) de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Maia, 2013). Essa abordagem, denominada sistema pEDV (*Effector Delivery Vector*), foi utilizada com sucesso na caracterização funcional da proteína efetora HvEC_016. O crescimento da população de *P. syringae* pv. *garcae*, expressando a proteína HvEC_016, foi restringida em tecidos de folhas do

cafeeiro *Dilla & Alghe*, portador do gene S_{H1} , indicando que pode ter ocorrido uma resposta de resistência nas folhas de café devido ao reconhecimento da proteína efetora HvEC_016 pela proteína R codificada pelo gene S_{H1} (Maia, 2013). No entanto, esta afirmação não pôde ser estendida para outros genótipos de café, portadores do gene S_{H1} , pois não avaliou-se o crescimento das bactérias nesses cafeeiros. Por conseguinte, análises funcionais mais detalhadas são necessárias para confirmar o papel da proteína HvEC_016 durante a interação com o cafeeiro. Assim, os objetivos deste estudo foram: (i) confirmar a atividade efetora da proteína HvEC_016 como fator de avirulência e/ou virulência em genótipos de cafeeiro com a presença ou ausência do gene de resistência S_{H1} ; (ii) avaliar a estabilidade dos vetores pEDV6 nas células bacterianas infiltradas nos tecidos foliares dos cafeeiros; (iii) identificar novas proteínas secretadas por *H. vastatrix* (isolado Hv-01) que apresentam atividade de avirulência em cafeeiros com diferentes combinações de genes S_H , mediante a análise de cinco genes candidatos a efetores (*HvECs*), utilizando o vetor pEDV6 e o SST3 de *Pseudomonas. syringae* pv. *garcae* (estirpe 1723).

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância Econômica da Cultura do Cafeeiro

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo depois da água, e a segunda mercadoria com maior comercialização depois do petróleo. Em 2013, o Brasil foi responsável pela comercialização de 50,8 milhões de sacas de café (60 kg por saca) no mercado mundial como grãos *in natura* (FAO, 2014). A safra alcançou 45,34 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, tendo a produção do Brasil representado um terço da produção global. A produção mundial de café se dá principalmente por países tropicais e subtropicais, os quais, na sua maioria, são países em vias de desenvolvimento. (Figura 1).

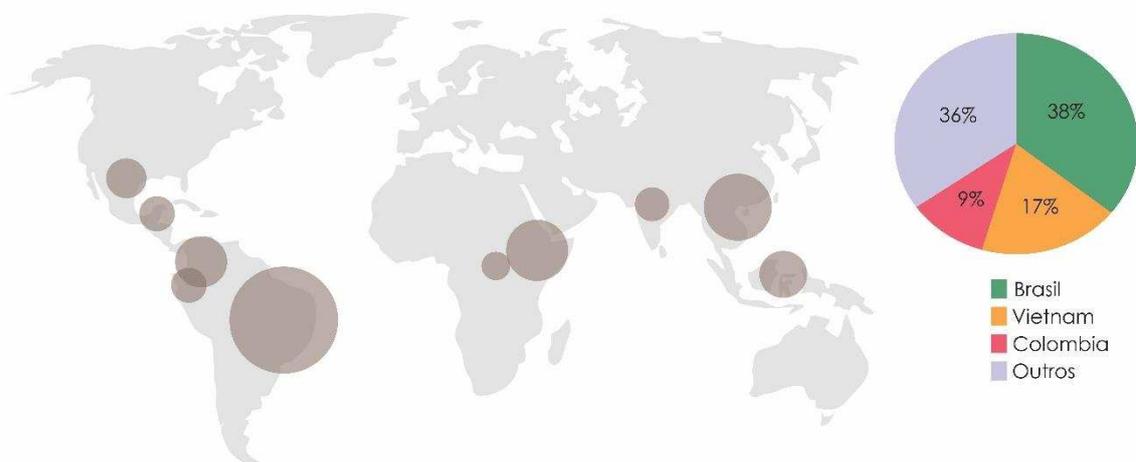


Figura 1. Distribuição da cultura do cafeeiro no mundo. Adaptado (ICO, 2013)

Embora não seja uma cultura alimentar, constitui a principal fonte de renda em mais de 60 países, sendo meio de subsistência para cerca de 25 milhões de pessoas no mundo. Nas Américas, os principais exportadores de café são: Brasil (primeiro exportador no mundo), Colômbia (terceiro exportador no mundo), México (sétimo exportador no mundo), Honduras (oitavo exportador no mundo), Peru (nono exportador no mundo) e Guatemala (décimo exportador no mundo), produzindo quase 70% do café consumido no mundo. (ICO, 2013).

O gênero *Coffea* possui cerca de 103 espécies descritas, e somente duas delas têm participação importante no mercado mundial. A espécie produzida de maior importância econômica é *Coffea arabica*, responsável por 70% do café consumido no mundo, cujo cultivo se dá principalmente na América e algumas regiões da África e Ásia de maior altitude e os demais 30% correspondem a *Coffea canephora*, também chamada café robusta, a qual, pelas suas condições especiais, é cultivada na África e Sudeste Asiático, especialmente em baixas altitudes. Outras espécies, como *C. liberica* e *C. racemosa*, são cultivadas em pequenas regiões de Moçambique tendo uma importância estritamente local (Rodrigues *et al.*, 1975; Moreno R., 2000).

No Brasil, a produção cafeeira está concentrada principalmente na região Sudeste, onde estão os três maiores estados produtores: Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, responsáveis por 49,93, 29,0 e 9,0% da produção, respectivamente (Figura 2). Em 2014 a produção de café arábica alcançou 32,31 milhões de sacas, exibindo uma queda de 15,6% em comparação à produção do ano anterior (CONAB, 2014).

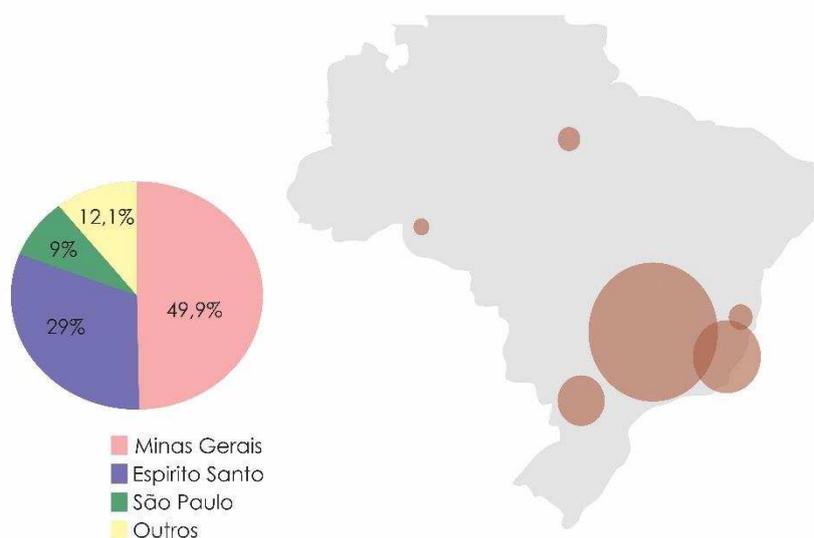


Figura 2. Distribuição da produção de café no Brasil, Adaptado (CONAB, 2014)

2.2 O fungo *Hemileia vastatrix*, agente causal da Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro

O fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Ber. está classificado no filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales, família *Incertae Sedis* (www.indexfungorum.org). Este fungo é o agente causal da ferrugem alaranjada do cafeeiro, sendo considerado uma ferrugem microcíclica, uma vez que seu ciclo de vida conta com três estágios (uredial, telial e basidial). Os urediniósporos dicarióticos são responsáveis pela fase propagativa da doença (Coutinho *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 2009).

O gênero *Hemileia* foi descrito pela primeira vez por Berkeley e Broome em 1861. Em 1868, este fungo causou o primeiro grande impacto econômico no Ceilão (hoje Sri Lanka) (Wellman, 1961). É chamado de *Hemileia* devido à morfologia dos urediniósporos, que possuem uma face lisa e a outra equinulada (Rodrigues, 1990).

Nas Américas, a doença foi relatada pela primeira vez no Brasil em janeiro de 1970, no Estado da Bahia (Chaves *et al.*, 1970). Dez anos depois, a ferrugem do café já havia sido disseminada para os demais países produtores de café na América Latina (Schieber e Zentmyer, 1984). Acredita-se que os urediniósporos do fungo foram trazidos para as Américas por correntes de ar provenientes de Angola (Bowden *et al.*, 1971), ou acidentalmente introduzido em plantas, roupas contaminadas ou bagagens (Kushalappa, 1989) (Figura 3).

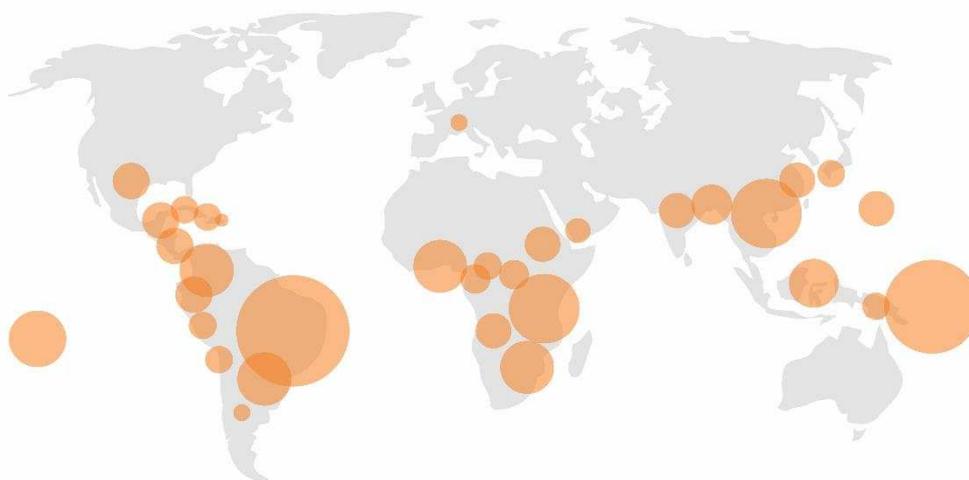


Figura 3. Distribuição da ferrugem alaranjada do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix* no mundo, adaptado (Plantwise, 2014)

A ferrugem do cafeeiro é a doença de maior importância econômica no contexto global por afetar principalmente as folhas, ocasionando forte desfolha que reduz a capacidade fotossintética da planta e leva à morte dos ramos produtivos quando a a severidade da doença é muito alta. Como consequência, a produtividade é reduzida e a vida útil da lavoura comprometida (Zambolim *et al.*, 1997; Moreno. R. *et al.*, 2000).

Estima-se que na América Latina perdem-se entre 15% a 30% da produção mundial por causa da doença, e caso não fossem tomadas medidas de controle estas perdas aumentariam para 30 a 50% (Van der Vossen, 2005). No caso de *Coffea arabica*, as reduções no rendimento da cultura podem variar de 35 a 50% quando as condições são favoráveis ao desenvolvimento da doença e há a ausência de controle químico (Zambolim *et al.*, 2005).

Segundo Cristancho *et al.*, (2012) no período de 2008 a 2011, observou-seem algumas variedades comerciais suscetíveis nas regiões produtoras da Colômbia, um aumento incomum na incidência da doença, além da severidade alta nas folhas infectadas (> 30%). Dados obtidos por Avelino *et al.*, (2015), no período de 2011 a 2013, relatam redução ao redor de 50% na capacidade de exportação na América Central, devido ao impacto da ferrugem em *Coffea arabica*. Fatores como as mudanças climáticas, ausência das práticas de fertilização e a aplicação programada de fungicidas, com um custo de 67 US\$/ha, favoreceram a ocorrência dos surtos severos da doença. O Instituto de Café da Costa Rica estimou perdas de mais de 50% na safra 2013-2014 no país. A América Central, como consequência desses surtos de ferrugem, teve uma perda anual de 96,2% e uma redução de 15,4% da produção em um ciclo da cultura (SIECA, 2014).

Portanto, o grau de severidade da doença depende das variedades empregadas, das condições climáticas, das medidas de controle adotadas, da carga pendente e do estado nutricional da planta (Becker *et al.*, 1991).

2.3 Controle Genético da Resistência do Cafeeiro a *Hemileia vastatrix*

O método de controle da ferrugem alaranjada do cafeeiro mais eficaz e menos agressivo ao meio ambiente é o controle genético. Este é baseado no conjunto de princípios científicos, metodologias, técnicas e estratégias aplicados na obtenção de

genótipos com características desejáveis, tendo como processo fundamental a adaptação por substituição dos alelos sob seleção. A mutação, a hibridação interespecífica e a transgenia geram novos caracteres de diversidade no cultivo, o que permite a obtenção de germoplasma com caracteres desejados, sendo o melhoramento um processo cíclico (Levitus *et al.*, 2004)

A ocorrência de doença em genótipos previamente resistentes à doença foi observada inicialmente em cafeeiros em Java, Indonésia, e na Índia, no final do século XIX e no início do XX. Em 1932, Mayne, sugeriu a existência a existência de raças fisiológicas em *H. vastatrix*. Os estudos realizados no CIFIC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro) permitiram identificar, até agora, nove genes de efeito principal, denominados S_H1 a S_H9 (Bettencourt e Rodrigues, 1988; Noronha-Wagner e Bettencourt, 1967). Os genes S_H1 , S_H2 , S_H4 e S_H5 foram caracterizados em arábicas puros da Etiópia, o gene S_H3 foi identificado somente em seleções da Índia, porém é considerado derivado de *Coffea liberica* e os genes S_H6 , S_H7 , S_H8 , S_H9 presentes em derivados do Híbrido de Timor, um híbrido natural proveniente do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora*. Isso indica que esses genes foram originados do café robusta (*C. canephora*), que é o recurso genético mais usado pelos programas de melhoramento como fonte de resistência nas Américas (Rodrigues e Bettencourt, 1975; Bettencourt e Rodrigues, 1988

Os genes de resistência identificados em *C. canephora* (S_H6 a S_H9) e *C. liberica* (S_H3) têm proporcionado resistência durável significativa em diferentes regiões avaliadas (Bettencourt, *et al.*, 1982; Sera *et al.*, 2013). Os programas de melhoramento genético do cafeeiro visando a obtenção de plantas com resistência à ferrugem no Brasil têm disponibilizado periodicamente aos cafeicultores cultivares comerciais com resistência proveniente do Híbrido de Timor e de seus derivados (Bettencourt e Lopes, 1982). Os genes de resistência S_H1 , S_H2 e S_H4 , isolados ou associados, também tem proporcionado resistência duradoura (Sera *et al.*, 2007). O gene S_H3 e alguns genes de *C. canephora* como o “Híbrido de Timor” e “Icatu” são mais eficientes para uma resistência durável quando usados em associações com outros genes S_H . (García, 2012).

No entanto, a resistência dos cafeeiros melhorados tem sido rapidamente suplantada pelo patógeno, dificultando o controle com base no uso exclusivo de

variedades resistentes (Zambolim *et al.*, 2005). Estudos desenvolvidos por Sera *et al.*, (2007) evidenciaram uma alta susceptibilidade em genótipos de cafeeiro que possuem o gene $S_H 2$ quando desafiados com raças de *H. vastatrix* portadoras do gene de virulência (v_2). Já os genótipos de cafeeiro portadores dos genes $S_H 1$ e $S_H 4$ apresentam resistência à doença em campo quando desafiados com raças (v_1) e (v_4), respectivamente.

2.4 Variabilidade Genética de *Hemileia vastatrix*

A geração de variabilidade genética no fungo pode ser explicada por um fenômeno natural denominado “fenômeno-Kamat”, em que a cariogamia e a meiose acontecem dentro do urediniósporo de *H. vastatrix* (Rajendren, 1967). Carvalho *et al.*, (2011), por meio de estudos de citometria de fluxo, comprovaram que nos urediniósporos pode ocorrer ocorre a cariogamia seguida da haploidização. Isso pode explicar a alta diversidade genotípica verificada nas populações de *H. vastatrix* (Nunes *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2013), contribuindo para o surgimento frequente e rápido de novas raças do patógeno (Capucho *et al.*, 2012; Gouveia *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2014).

Os estudos de variabilidade genética de *H. vastatrix* geralmente foram feitos através de testes de inoculação na série diferenciadora de cafeeiro. Após a criação do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras, Portugal, em 1955, foram desenvolvidas pesquisas sobre a especificidade fisiológica de *H. vastatrix* (D'Oliveira, 1965). Os estudos permitiram a caracterização de mais de 45 raças do fungo (Várzea e Marques, 2005; Silva *et al.*, 2006) e a definição de 40 grupos fisiológicos de cafeeiro caracterizados pela reação diferencial de *H. vastatrix* (Bettencourt, 1981; Rodrigues e Bettencourt, 1975).

No Brasil, 15 raças fisiológicas já foram descritas (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII, XXXVII) (Cabral *et al.*, 2009; Capucho *et al.*, 2012; Zambolim *et al.*, 2005;), sendo a raça II predominante nos estados produtores (Zambolim *et al.*, 2005). É importante ressaltar também a ocorrência de raças identificadas com amplo espectro de virulência, como por exemplo, a raça XXXIII ($v_{2,5,6,7,9}$) (Cabral *et al.*, 2009), e a raça XXXVII ($v_{1,2,5,6,7,9}$), como também da

possibilidade de ocorrência da raça XXXIX (v_{2,4,5,6,7,8,9}) na Colômbia, com sete genes de virulência presente (Sera *et al.*, 2007). Essa alta variabilidade do fungo representa um grande desafio aos melhoristas na busca por cultivares com resistência durável.

Um dos objetivos de um programa de melhoramento genético é incorporar genes de resistência para o controle das doenças. Por isso, é necessário conhecer a diversidade genética e a estrutura das populações, assim como compreender a variabilidade dos isolados de *H. vastatrix* (McDonald e Linde, 2002). O conhecimento das raças fisiológicas do patógeno é muito importante, pois estudos desenvolvidos apresentam evidências de variações na patogenicidade dentro do patossistema *Hemileia*-Cafeeiro (Rodrigues e Bettencourt, 1975).

2.5 O Sistema imune das plantas e as proteínas efetoras

As plantas dependem da imunidade inata para se defenderem dos patógenos, independentemente do tipo de organismo associado às mesmas. Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram duas principais linhas de defesa. A primeira é chamada imunidade desencadeada por PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), também conhecida como PTI (*PAMP-Triggered Immunity*). Já a segunda é desencadeada pelo reconhecimento de proteínas efetoras (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones e Dangl, 2006; Boller e Felix, 2009; Dodds e Rathjen, 2010).

A primeira linha de defesa, PTI, utiliza receptores localizados na membrana plasmática, denominadas PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) que reconhecem proteínas ou padrões moleculares conservados associados a agentes patogênicos (PAMPs) (Zipfel, 2009). Geralmente são proteínas relacionadas às características estruturais, como a quitina e a flagelina (Jones e Dangl, 2006; de Wit, 2007). A quitina é o principal componente estrutural da parede celular fúngica (de Wit *et al.*, 2009; Stergiopoulos e de Wit, 2009) e a flagelina é uma subunidade que compreende o filamento flagelar em bactérias (Zipfel e Felix, 2005). A PTI é suficiente para prevenir a infecção pelo seu amplo espectro. Porém, muitos agentes patogênicos têm adquirido a capacidade de produzir proteínas efetoras capazes de suplantarem ou suprimirem PTI e, por conseguinte, contribuir para a virulência do agente patogênico gerando susceptibilidade na planta (Win *et al.*, 2012).

Em contraste, uma segunda linha de defesa foi desenvolvida pelas plantas e é induzida pelo reconhecimento direto ou indireto das proteínas efetoras do patógeno pelas proteínas R. As proteínas efetoras são pequenas moléculas secretadas pelos organismos associados às plantas, com a capacidade de modificar a estrutura e função da célula hospedeira (Hogenhout *et al.*, 2009). Contribuem com o parasitismo por meio da supressão e/ou suplantação das respostas de defesa do hospedeiro conseguindo alterar suas funções fisiológicas (Dodds *et al.*, 2006; Kamoun, 2009). Muitas delas são reconhecidas pelo sistema imune da planta mediado pelos genes R, desencadeando uma resposta rápida de hipersensibilidade, sendo nesta situação, denominadas proteínas de avirulência (Heath, 2000).

As proteínas codificadas pelos genes R, possuem domínios conservados na sua estrutura, o que permite classificá-las em diferentes classes. A classe de maior frequência tem o domínio conservado NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site - Leucine rich repeat*). Essa classe pode ser dividida em duas sub-classes dependendo da região N-terminal. A primeira subclasse possui uma extremidade TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) como, por exemplo, as proteínas L6, RPP5 e RPP1. A segunda subclasse é caracterizada por possuir uma extremidade LZ – (*Leucine Zipper*), como por exemplo as proteínas codificadas pelos genes *RPS2*, *RPM1* em *Arabidopsis* e *I2*, *Mi*, e *Prf* (Jones e Dangl, 2006). Com base nesses domínios conservados, um grande número de genes de resistência tem sido isolados e caracterizados em diversas espécies de plantas (Richter e Ronald, 2000; Sharma *et al.*, 2009)

Grande parte dos fungos e oomicetos fitopatogênicos colonizam os espaços intercelulares dos tecidos vegetais e secretam efetores por meio dos haustórios (Catanzariti *et al.*, 2007; Ellis *et al.*, 2009; Win *et al.*, 2012; Petre e Kamoun, 2014). Os fungos causadores de ferrugens formam haustórios, estrutura especializada na absorção de nutrientes e secreção de proteínas efetoras na matriz extra-haustorial. Tais efetores são translocados para dentro da célula do hospedeiro, por mecanismos ainda desconhecidos, induzindo alterações estruturais, celulares e bioquímicas (Catanzariti *et al.*, 2007; Petre e Kamoun, 2014).

2.6. O processo infeccioso de *Hemileia vastatrix*

Fungos biotróficos como os causadores das ferrugens são inteiramente dependentes das células do hospedeiro vivo para o seu crescimento e reprodução (Heath, 2000; Panstruga, 2009). Sendo assim, estes patógenos possuem características peculiares que os distinguem dos demais: (i) estruturas de infecção altamente desenvolvidas; (ii) atividade secretora limitada, especialmente de enzimas líticas; (iii) camadas interfaciais que separam as membranas plasmáticas de fungos e de plantas, ricas em proteínas e carboidratos; (iv) possuem hifa especializada chamada haustório, que está envolvida na absorção e no metabolismo de nutrientes; (v) secretam proteínas efetoras para suplantar resposta de defesa do hospedeiro e induzir genes específicos no hospedeiro para o estabelecimento da interação biotrófica (Mendgen e Hahn, 2002; Panstruga 2009).

A fase dicariótica de *H. vastatrix* é caracterizada por várias alterações morfogênicas (Mendgen e Hahn, 2002). Os eventos relacionados à patogênese são específicos e se iniciam com a adesão de urediniosporos (UR) na face abaxial das folhas do cafeeiro. Após essa adesão ocorre a germinação, por meio do alongamento do tubo germinativo, que se desenvolve para encontrar um estômato e logo inicia a formação do apressório (AP) (Fig. 4). O apressório se diferencia em hifa primária (HiP), que penetra através dos estômatos (a partir de 12h após a inoculação) mediante uma hifa de penetração. A medida que avança é produzida duas ramificações laterais grossas na extremidade, semelhantes a âncoras (AN), as quais irão formar a célula-mãe do haustório (CMH) e o haustório primário (HP) (a partir de 36h após a inoculação) nas células subsidiárias ou estomáticas adjacentes antes da colonização do mesófilo (Fig. 4). O fungo segue seu crescimento, intercelularmente, com a formação de hifas, CMH e um grande número de haustórios, nas células do parênquima esponjoso, paliádico e até mesmo da epiderme superior. A formação destas estruturas em células epidérmicas é uma característica única de *H. vastatrix* (Ramiro *et al.*, 2009).

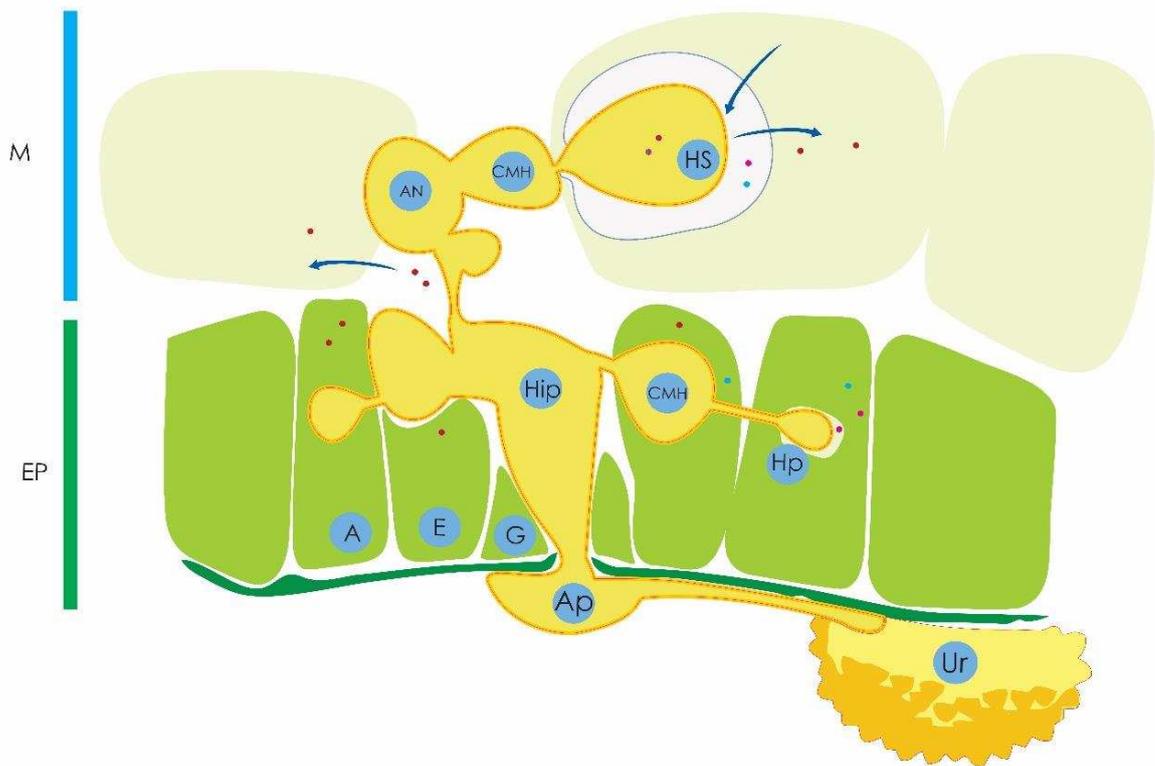


Figura 4. Ilustração esquemática da fase inicial de desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* nos tecidos do cafeeiro. Após a germinação de urediniósporo (Ur) e formação de apressório (Ap), o patógeno diferencia uma hifa de infecção primária intercelular (HiP), que forma a célula-mãe do haustório (CMH), a partir do qual o haustório primário (HP) é formado dentro da célula subsidiária (s) e ao lado (A) dos estômatos (E). Quando as hifas primárias chegam no mesófilo (M), ocorre o desenvolvimento de uma vesícula em forma de âncora (An) na câmara subestomática. A partir das extremidades dos braços da âncora, novas CMH são formadas e os haustórios secundários (SH) são produzidos nas células do mesófilo (M). (Ep): epiderme; (G): células-guarda. (Adaptado de Ramiro *et al*, 2009)

Durante a penetração dos haustórios no interior das células do hospedeiro ocorre a dissolução localizada da parede celular, seguida da invaginação da membrana celular da planta, formando uma membrana extra-haustorial ao redor do haustório (Fig. 5). Na interface entre a parede celular do haustório e a membrana extra-haustorial forma-se uma camada de substâncias gelatinosas, rica em carboidratos, denominada matriz extra-haustorial (Catanzariti *et al.*, 2007). Os haustórios são o principal sítio de absorção de nutrientes a partir do hospedeiro e são determinantes para a fase biotrófica da infecção. Essas estruturas possuem transportadores de aminoácidos, transportadores de açúcares e bombas $H^+ATPases$ envolvidas no transporte ativo de nutrientes provenientes das células do hospedeiro

(Mendgen e Hahn, 2002). A formação do haustório também induz alterações estruturais na célula hospedeira, tais como o rearranjo do citoesqueleto, a migração do núcleo e condensação da cromatina (Mendgen e Hahn, 2002). Acredita-se que estas alterações são induzidas pela ação das proteínas efetoras sintetizadas no haustório, que são secretadas na matriz extracelular e translocadas para dentro da célula da planta (Figura 5).

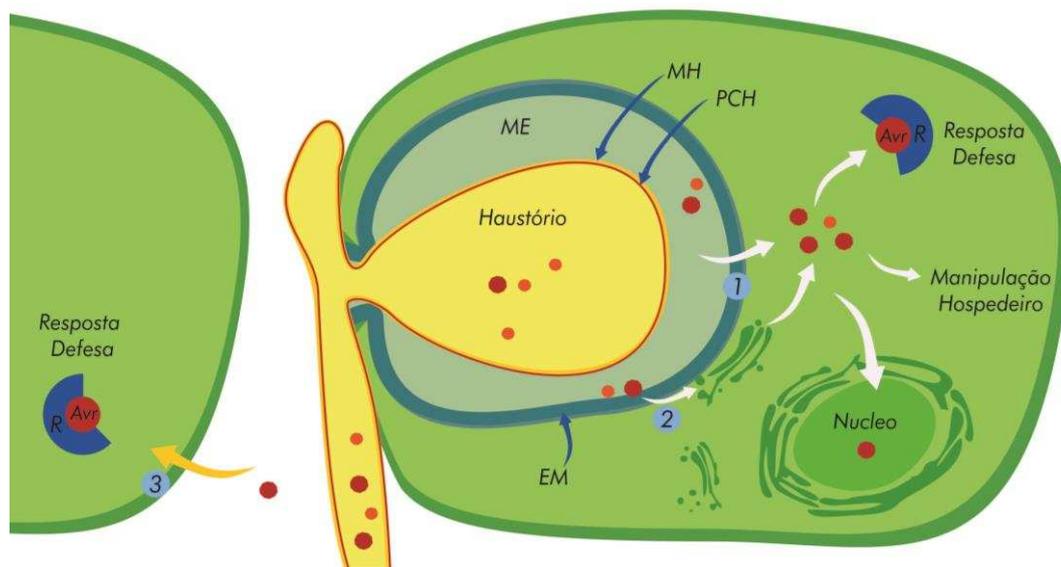


Figura 5. A interface haustório-hospedeiro. Esquema do haustório em uma célula do café mostrando a membrana extra-haustorial (ME), extracelular (EM) e a matriz haustorial (MH). Proteínas efetoras são segregadas na matriz haustorial e extra-haustorial. Um subconjunto de proteína é translocado para a célula hospedeira diretamente através do haustório (1) ou por meio de vesículas das endomembranas do sistema de membranas do hospedeiro (2). Uma vez dentro do citoplasma do hospedeiro, o efetor pode alterar as vias metabólicas e a resposta de defesa. Proteínas efetoras que são reconhecidas por proteínas de resistência (R) são denominadas proteínas de avirulência (Avr). Este reconhecimento desencadeia as respostas de defesa da planta. Outras proteínas efetoras produzidas pelo patógeno podem se dirigir às organelas, tais como o núcleo, onde podem modificar a transcrição de genes de plantas. Os efetores secretados a partir das hifas também podem entrar nas células hospedeiras através de um mecanismo ainda desconhecido (3), e quando reconhecidos por uma proteína de resistência, também podem desencadear respostas de defesa (Adaptado de Catanzariti *et al.*, 2007; Petre e Koumon, 2014).

2. 7. Identificação e caracterização funcional de genes efetores

As estratégias para a detecção de genes que codificam proteínas efetoras envolvem diferentes áreas de conhecimento, como bioquímica, genética, genômica e bioinformática. Essas estratégias compreendem duas etapas principais: (i) a utilização da bioinformática para identificar genes candidatos, satisfazendo uma lista de critérios específicos e, (ii) validação dos genes candidatos usando critérios funcionais, como a expressão transitória em plantas e avaliação da atividade efetora das proteínas codificadas (Kamoun, 2006). A aplicação destas estratégias permitiu a identificação de genes que codificam proteínas efetoras em fungos filamentosos e oomicetos (Ellis *et al.*, 2009).

Uma abordagem de análise funcional de proteínas efetoras de patógenos biotróficos de plantas é a sua expressão transiente no citoplasma da célula de genótipos resistentes. Bioensaios com efetores de *Phytophthora infestans* agroinfiltrados em *Solanum spp.* tiveram a capacidade de induzir resposta de hipersensibilidade ou morte celular (Vleeshouwers *et al.*, 2006). Isso também ocorre nas ferrugens, como no caso da expressão da proteína AvrL567 no citoplasma da célula, que induz uma reação de hipersensibilidade dependente das proteínas NBS-LRR L5, L6 ou L7 do linho (*Linum usitatissimum*) (Dodds *et al.*, 2004).

Muitas das proteínas efetoras em fungos filamentosos são expressas durante as diferentes etapas do parasitismo. (Hacquard *et al.*, 2012; Kleemann *et al.*, 2012; Win *et al.*, 2012). Estudos realizados no patossistema *Hemileia*-cafeeiro, demonstraram que na fase de formação dos uredinosporos (21 dias após a inoculação) (Fernandez *et al.*, 2012), na fase de formação do apressório são expressos genes que codificam proteínas com característica de efetores (Cristancho *et al.*, 2014; Talhinnhas *et al.*, 2014). Maia (2013) demonstrou que 22 genes que codificam proteínas efetores são regulados positivamente durante a fase biotrófica. Adicionalmente, Maia (2013) utilizando o sistema EDV (Effector Detector Vector) para a expressão transiente do efetor candidato *HvEC-016* no citoplasma de cafeeiros resistentes, evidenciou uma atividade de avirulência para a proteína efetora *HvEC-016* em genótipos de cafeeiros com o gene *S_{H1}*.

O sistema EDV desenvolvido por Sonh *et al.*, (2007) permite a translocação de uma proteína efetora para o citoplasma vegetal mediado pelo Sistema de Secreção Tipo III (SST3) da fitobactéria transformada com o vetor pEDV (Figura 6). Mediante a clonagem de genes *in frame* com uma sequência que codifica um peptídeo de 136 aminoácidos localizado na região N-terminal da proteína efetora AvrRps4, que sinaliza a secreção para o SST3 de *Pseudomonas*, foi possível a translocação das proteínas efetoras ATR1 e ATR13 de *Hyaloperonospora arabidopsidis* (anteriormente *Hyaloperonospora parasitica*).

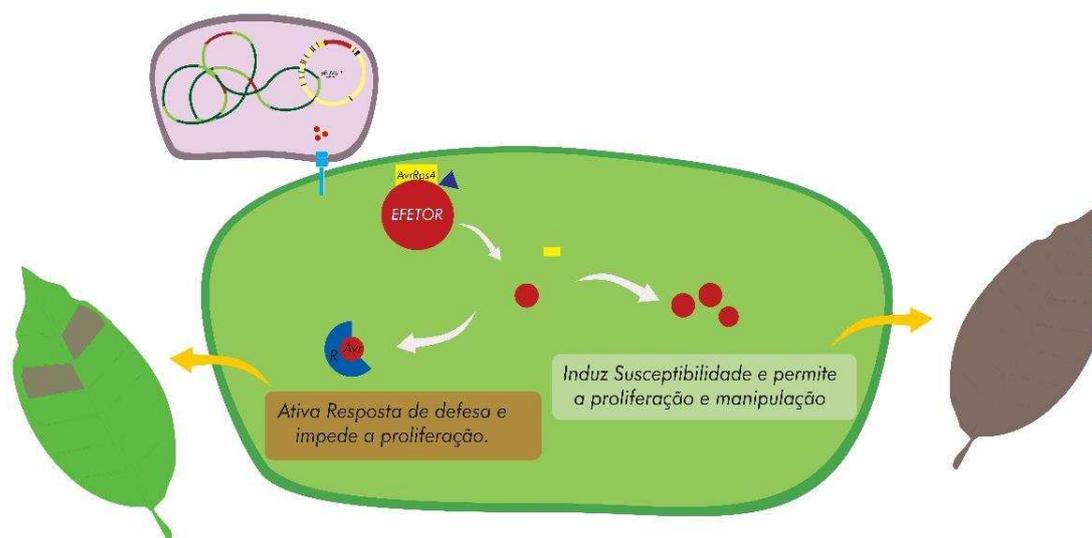


Figura 6. Representação esquemática da translocação de proteínas efetoras no citoplasma da da célula vegetal mediada pelo vetor pEDV. O gene que codifica a proteína efetora é clonado *in frame* com a sequência de nucleotídeos que codifica o sinal de secreção de 136 aminoácidos da proteína efetora AvrRps4 que direciona a secreção por SST3. O contato das bactérias com a célula hospedeira desencadeia a formação de SST3 e a expressão da proteína efetora. Após a translocação, a proteína pode ser reconhecida por proteínas efetoras R e desencadear a resposta de defesa da planta, o que restringe o crescimento de bactérias. Se a planta tem uma proteína R que é capaz de reconhecer a proteína efetora, é possível interferir na sua célula alvo, o que contribui para o crescimento e desenvolvimento dos sintomas da doença bacteriana.

O SST3 é um sistema complexo composto por mais de 20 proteínas e assemelha-se a um dispositivo em forma de agulha, que atravessa a membrana interna e externa da célula bacteriana e se estende para um canal, o pilus, para a membrana da célula da planta, permitindo a secreção e a translocação de proteínas efetoras no citoplasma da célula vegetal (Figura. 7).

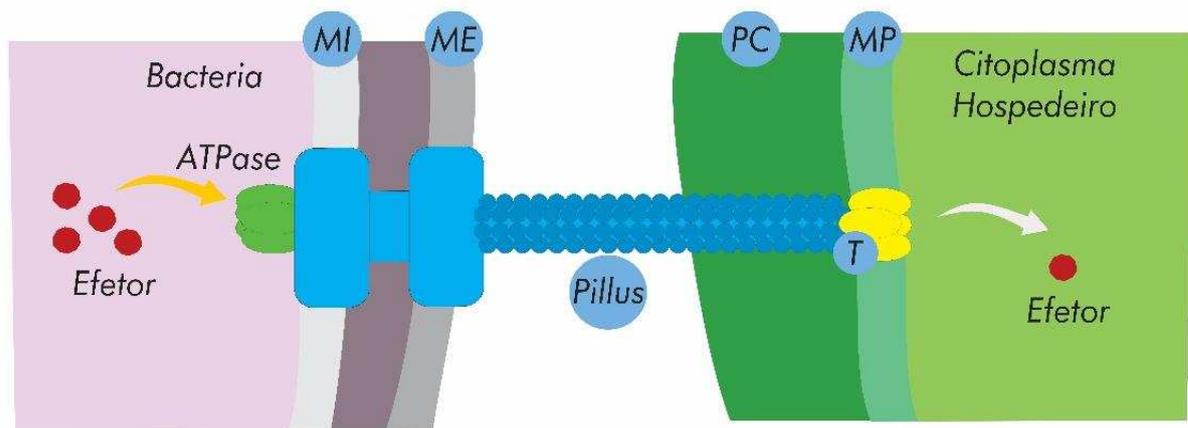


Figura 7. Representação esquemática do transporte de proteínas efetoras pelo sistema de secreção do Tipo III (T3SS). O corpo basal do SST3 se estende através da membrana interna (MI) e da membrana externa (ME) bacteriana, conectando-se a um pílus extracelular em forma de agulha que atravessa a parede celular vegetal (PC) e contacta a membrana plasmática, (MP). Associado ao pílus encontra-se o complexo de translocação (*translocon*) (T), que forma um canal protéico que executa a passagem das proteínas efetoras para o citoplasma da célula vegetal. (Adaptado de Büttner e He, 2009).

Fabro *et al.*, (2011) também utilizaram o sistema EDV para análise funcional de efetores putativos de *H. arabidopsidis* por meio do SST3 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000-LUX (Pst), em *Arabidopsis* e em nabo (planta não hospedeira). Nesse estudo, 70% dos efetores candidatos contribuíram positivamente para o crescimento bacteriano de Pst DC3000-LUX em mais de um acesso de *Arabidopsis* avaliado, o que indica que esses efetores contribuem para uma maior agressividade de *H. arabidopsidis*. De forma geral, grande parte desses mesmos efetores suprimiram a deposição de calose, que é uma evidência citológica da ativação da PTI como resultado do reconhecimento de PAMPs. No entanto, nenhum efetor foi capaz de induzir morte celular macroscópica típica de HR nos diferentes acessos inoculados, ou seja, Fabro *et al.*, (2011) não conseguiram identificar nenhum gene de avirulência.

Com o objetivo de desenvolver métodos para detectar e quantificar rapidamente a contribuição de efetores candidatos de *H. arabidopsidis*, Badel *et al.*, (2013) utilizaram o sistema EDV para translocar efetores via SST3 de Pst DC3000. Esses autores inocularam misturas de clones bacterianos expressando diferentes efetores e estimaram a contribuição de efetores individuais, através do cálculo da abundância de cada efetor candidato na população bacteriana recuperada, a partir de folhas aos três dias após a inoculação, em relação à abundância no inóculo misto

inicial. Foram identificados efetores que contribuem positivamente para o crescimento de Pst DC3000 em alguns acessos de *Arabidopsis*. Os efetores HaRxLL464, HaRxL75, HaRxL22, HaRxLL441 e HaRxL89 foram capazes de suprimir PTI.

Sharma *et al.*, (2013) também utilizaram o sistema EDV para translocar as proteínas efectoras AVR-Pik e AVR-Pii de *Magnaporthe oryzae* para o citoplasma de arroz, utilizando o SST3 de *Burkholderia glumae*, um patógeno emergente nessa cultura. A translocação de AVR-Pik e AVR-Pii para o citoplasma de cultivares de arroz contendo os genes R cognatos revelou atividade de avirulência. Além disso, o efector AVR-Pik reduziu e atrasou a HR desencadeada por *B. glumae* em *Nicotiana benthamiana* (planta não hospedeira), indicando uma atividade supressora de morte celular. Esses resultados reforçam o potencial do sistema EDV para elucidar o papel de efetores de fungos durante a interação com plantas hospedeiras e não-hospedeiras.

Upadhyaya *et al.*, (2014) utilizaram o sistema de *Pseudomonas fluorescens* EtHAn para avaliar a translocação da proteína candidata a efector AvrRpm1 de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, agente causal da ferrugem do caule em trigo. Eles confirmaram a translocação do efector por meio da quantificação da atividade calmodulina dependente de adenil ciclase (CyA) que é ativa em procariotos na presença da calmodulina, que não são capazes de produzir essa proteína. A quantificação da atividade enzimática nas células vegetais inoculadas permitiu comprovar a translocação da proteína efectora para dentro da célula vegetal e a efetividade deste sistema para a análise funcional de genes candidatos a efetores em trigo.

O sistema EDV também pode ser uma ferramenta útil para análise funcional de efetores em *H. vastatrix*. Na interação *Hemileia*-cafeeiro, estudos citológicos e bioquímicos têm mostrado que a resistência do cafeeiro é, em geral, do tipo pós-haustorial e estando associada à indução de reação de hipersensibilidade (HR) (Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006; Ramiro *et al.*, 2009). Assim, é possível que proteínas efectoras produzidas no haustório e translocadas para o citoplasma do cafeeiro sejam reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes S_H , que conferem ao cafeeiro resistência à ferrugem. Devido ao fato do cafeeiro ser suscetível a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, agente causal mancha aureolada do cafeeiro, o sistema pEDV é uma ferramenta promissora para estudos funcionais em *H. vastatrix*.

MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1.1 Genótipos de cafeeiro inoculados

As plantas propagadas vegetativamente e utilizadas para os ensaios de infiltração pertencem à coleção de genótipos de cafeeiros diferenciadores de raças de *H. vastatrix* do CIFC, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, os quais se distinguem pela presença de diferentes genes de resistência à ferrugem. Cultivares comerciais de café com diferentes genes S_H também foram utilizados para realização dos estudos funcionais (Tabela 1).

Os cafeeiros diferenciadores foram propagados vegetativamente por meio de enraizamento de estacas e/ou por enxertia utilizando o "Catuaí Vermelho IAC-44" como porta-enxerto. Após quatro meses de enviveiramento, quando as mudas apresentaram dois a três pares de folhas foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia/UFV.

Os clones diferenciadores e os cultivares comerciais de café foram cultivados em vasos plásticos de 5 litros de capacidade, contendo substrato constituído de terra de camada subsuperficial e esterco de curral curtido, na proporção de 3:1, adubado com 1,5 Kg de NPK na formulação 4-14-8 por m³ de substrato. Foram efetuados tratamentos fitossanitários para controle de cochonilha, ácaro e pulgões e foi feita adubação com solução nutritiva para correção de deficiência de micronutrientes.

Tabela 1. Reação diferencial de genótipos de cafeeiros à inoculação com isolado de *H. vastatrix* HV-01 e à infiltração de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

Genótipos de cafeeiros	Genes de resistência	Reação a HV-01 ^b	Reação a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> .
128/2 - <i>Dilla & Algue</i>	<i>S_H</i> 1	Resistência	Susceptibilidade
644/18 - <i>H. Kawisari</i>	<i>S_H</i> ?	Resistência	Susceptibilidade
785/15 <i>Catucaí vermelho</i>	<i>S_H</i> ?	Susceptibilidade	Susceptibilidade
24/137 <i>Catucaí Amarelo</i>	<i>S_H</i> ?	Susceptibilidade	Susceptibilidade
IAC44 <i>Catuai Vermelho</i>	<i>S_H</i> 5	Susceptibilidade	Susceptibilidade
134/4 - S 12 <i>Kaffa</i>	<i>S_H</i> 1,4	Resistência	Susceptibilidade
87/1 - <i>Geisha</i>	<i>S_H</i> 1,5	Resistência	Susceptibilidade
IPR 105	<i>S_H</i> 2,3	Resistência	Susceptibilidade
1006/10 - KP 532	<i>S_H</i> 1,2,5	Resistência	Susceptibilidade
H153/2	<i>S_H</i> 1,3,5	Resistência	Susceptibilidade
635/3	<i>S_H</i> 1,4,5	Resistência	Susceptibilidade
HW 17/12	<i>S_H</i> 1,2,4,5	Resistência	Susceptibilidade
H147/1	<i>S_H</i> 2,3,4,5	Resistência	Susceptibilidade
H420/10	<i>S_H</i> 5,6,7,9	Resistência	Susceptibilidade
IAPAR 59	<i>S_H</i> 5,6,7,8,9,?	Resistência	Susceptibilidade
IPR 107	<i>S_H</i> 5,6,7,8,9,?	Resistência	Susceptibilidade

3.1.2 Obtenção de clones de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* contendo genes de *Hemileia vastatrix* candidatos a efetores corretamente clonados no vetor pEDV6.

Com base em estudos prévios realizados por Maia (2013), selecionaram-se seis genes (*HVEC_016*, *HVEC_006*, *HVEC_054*, *HVEC_057*, *HVEC_081*, *HVEC_101*) que codificam proteínas secretadas pelo isolado monopustular de *H. vastatrix* Hv-01. A partir dessas sequências foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores sem a região que codifica o peptídeo sinal, acrescentado do sítio CACC no iniciador *Forward* para clonagem pelo sistema *Gateway*[®] (Invitrogen). Os clones foram amplificados a partir de cDNA, sintetizado a partir de RNA extraído de folhas de café infectadas por *H. vastatrix*. Em seguida, os amplicons foram clonados no vetor de entrada pENT/D-

TOPO (Invitrogen), sendo posteriormente mobilizados para o vetor de destino pEDV6 (Figura 8), seguindo as instruções do manual *Gateway LR Clonase II Enzyme Mix* (Invitrogen). Efetuou-se o sequenciamento dos clones com os oligonucleotídeos M13F e M13R, para confirmação das clonagens das ORFs *HvECs in frame* com a sequência que codifica o peptídeo AvrRps4N. As construções pEDV::HvECs foram mobilizadas para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg1723) por eletroporação. As células transformadas foram selecionadas em meio seletivo contendo os antibióticos rifampicina (100 µg/mL) e gentamicina (25 µg/mL). O vetor pEDV6 foi gentilmente cedido pelo Dr. Jonathan D. G. Jones do The Sainsbury Laboratory, Inglaterra. A estirpe de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* 1723 foi obtida da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, São Paulo-SP.

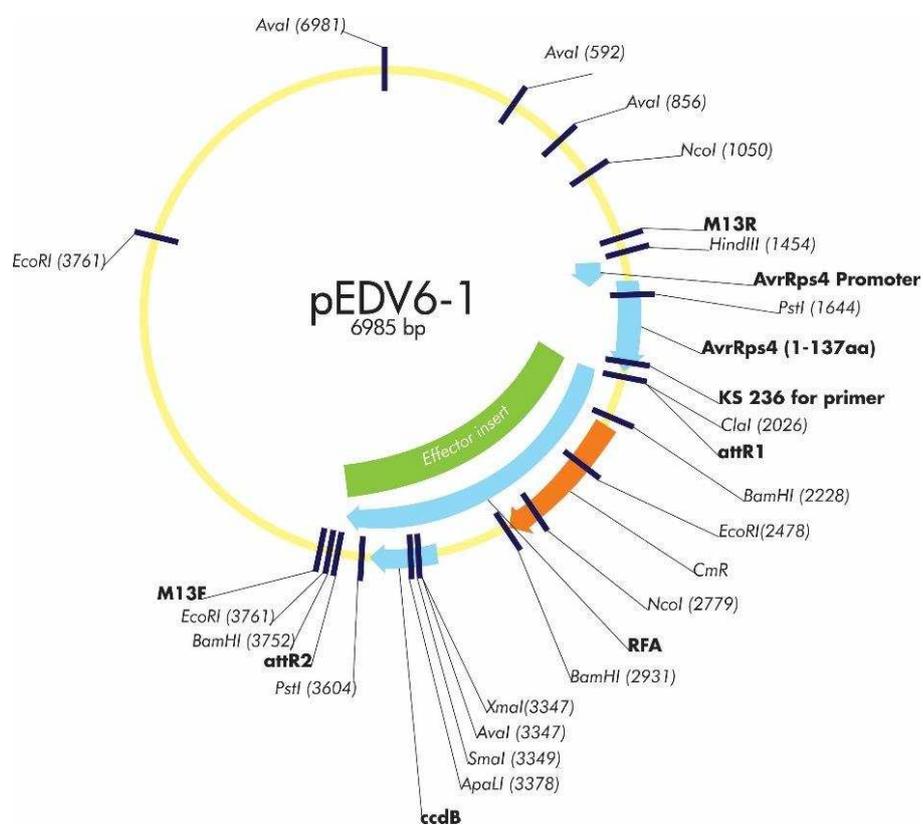


Figura 8. Mapa do vetor pEDV6. Vetor utilizado para expressar as proteínas *HvECs* de *H. vastatrix* em *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. *AvrRps4 promoter* é o promotor do gene que codifica a proteína efetora AvrRPS4; AvrRps4 (aa 1-137) representa a sequência que codifica o peptídeo sinal que direciona a secreção pelo Sistema de Secreção Tipo III (SST3). Este peptídeo é reconhecido e clivado por proteases da planta na sequência GGGKRVY.

3.1.3 Análise funcional dos genes candidatos a efetores em genótipos de cafeeiros baseado no SST3 de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

As células de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* transformadas com as construções pEDV::HvECs foram estriadas em placas de meio King B_(sólido) com rifampicina (100 µg/mL) e/ou gentamicina (25 µg/mL) e crescidas a 28°C por 48 horas. As células foram ressuspensas em solução salina de cloreto de magnésio (MgCl₂, a 10 mM) e centrifugadas a 5.000 rpm, por 10 minutos, a 22°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensado em 30 mL de solução salina. Determinou-se a concentração da suspensão bacteriana pela leitura da densidade ótica (OD) no espectrofotômetro Bio-Rad Smartspec™ Plus (Bio-Rad) (Figura 9-A). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada uma densidade ótica OD₆₀₀ = 0,2 (aproximadamente 2 x 10⁷ UFC/mL) e as infiltrações foram realizadas com o auxílio de seringas hipodérmicas em folhas de cafeeiros. As suspensões bacterianas foram também infiltradas em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) para verificar se a expressão dos genes HvECs poderia interferir na funcionalidade do SST3 de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Adicionalmente, verificou-se a possibilidade dos HvECs atuarem como supressoras de morte celular em folhas de tabaco variando a densidade de inóculo infiltrado. Como controle negativo utilizou-se a bactéria selvagem *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* estirpe 1723 e a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* transformada com pEDV::vazio. Posteriormente, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 25°C e 12 horas de fotoperíodo, onde permaneceram por seis dias, sendo avaliadas a partir do terceiro dia após infiltração. (Figura 9-B)

3.1.4 Determinação do crescimento de populações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* *in vivo*.

O crescimento das populações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* 1723 (estirpe selvagem) e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* contendo as construções pEDV::vazio e pEDV::HvEC_016 foram avaliadas no limbo foliar dos genótipos de cafeeiro da série diferenciadora de raças de *H. vastatrix* portadores do gene de resistência S_{H1}: 128/2 *Dilla & Algue* (S_{H1}), 134/4 - S12 Kaffa (S_H 1,4), 87/1 *Geisha*

(S_H1,5), 1006/10 - KP 532 (S_H 1,2,5), H153/2 (S_H 1,3,5), 635/3 (S_H 1,4,5), Hw17/12 (S_H 1,2,4,5). Adicionalmente, genótipos portadores de genes de resistência S_H na ausência do gene S_H 1, Catuaí Vermelho "IAC-44" (S_H5), H147/1(S_H 2,3,4,5), H420/10 (S_H 5,6,7,9) e cultivar comercial IAPAR 59 (S_H 5,6,7,8,9,?) foram infiltrados com as mesmas bactérias para avaliar a hipótese de que a proteína efetora HVEC-016 contribui para a virulência de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* quando a bactéria é infiltrada em genótipos de cafeeiro com a ausência do gene de resistência S_H1.

O experimento foi realizado pelo método de diluição e contagem das colônias em placas, conforme descrito por Oliveira *et al.* (1991), com algumas modificações. As culturas de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* estirpe 1723 (selvagem) e contendo as construções pEDV::vazio e pEDV::HVEC_016 foram ressuspendidas em tampão MgCl₂ 10 mM. Essas suspensões tiveram uma densidade ótica OD₆₀₀ = 0,0001 (aproximadamente 1 x 10⁴ UFC/mL). As suspensões foram injetadas, com o uso de seringas hipodérmicas, em folhas novas de cafeeiro, completamente expandidas, de modo a ocupar todos os espaços entre as nervuras laterais das folhas. Este fato pôde ser observado quando todo o limbo foliar apresentou-se encharcado. Foram inoculadas três folhas para cada tratamento. Com auxílio de um furador metálico, foram retirados dois discos de folha de 0,75 cm de diâmetro, em intervalos de 0, 72 e 96 horas após a infiltração. Cada disco de folha foi macerado em tubos de 1,5 mL, contendo 250 µl de tampão MgCl₂ 10mM. De cada macerado, obtiveram-se diluições sucessivas de 10⁻¹ a 10⁻⁵. Em placas de Petri, que continham meio King B_(sólido) com rifampicina (100 µg/mL) e/ou gentamicina (25 µg/mL), foi adicionado 0,1 mL da diluição correspondente. As placas foram incubadas a 28°C, por 48 horas, e procedeu-se a contagem do número de colônias. (Figura 9-C)

3.2 Estimativas do crescimento de populações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* *in vitro*

O crescimento das populações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* 1723 (estirpe selvagem) e de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* transformadas com as construções pEDV::vazio e pEDV::HVEC_016 foram avaliadas no meio líquido King B contendo os antibióticos adequados. O experimento foi realizado pelo método da

leitura da densidade ótica (OD₆₀₀) das concentrações das bactérias em meio líquido. As culturas de bactéria foram ressuspensas em tampão MgCl₂ 10 mM e uma densidade ótica OD₆₀₀ = 0,2 (aproximadamente 2 x 10⁸ UFC/mL). Adicionou-se 1mL das suspensões bacterianas em 16 mL de meio, contendo os antibióticos adequados. O experimento foi conduzido em triplicata e as amostras foram lidas em intervalos de 3 em 3 horas após a incubação no shaker (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78 e 81) a 28°C, 280 rpm. (Figura 9-D)

3.3 Resposta de Hipersensibilidade em Tabaco

Sementes de *N. tabacum* cv. Havana foram semeadas em vasos de 2 litros contendo substrato. Trinta dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos de 1 litro. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C e aproximadamente 12 horas de fotoperíodo, antes e após a inoculação.

As suspensões bacterianas foram ajustadas para OD₆₀₀ (2,0; 1,2; 0,6 e 0,2) tal como descrito na subseção respectiva tanto dos controles como os candidatos. As suspensões foram inoculadas em folhas de tabaco *N. tabacum* cv. Havana e realizaram-se duas réplicas biológicas. A inoculação foi realizada por infiltração de suspensões bacterianas nos espaços intercelulares via face abaxial da folha, com o auxílio de uma seringa de 1 mL descartável sem agulha (Thomas *et al*, 2009; Sharma *et al*, 2013; Du *et al*, 2014). Aproximadamente 48 horas após a inoculação, observou-se a ocorrência de HR (necrose no tecido infiltrado) ou supressão de morte celular (não necrose). *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* 1723, estirpe selvagem, foi utilizada como um controle positivo para a indução de HR em plantas não hospedeiras e solução 10 mM de MgCl₂ como controle negativo.

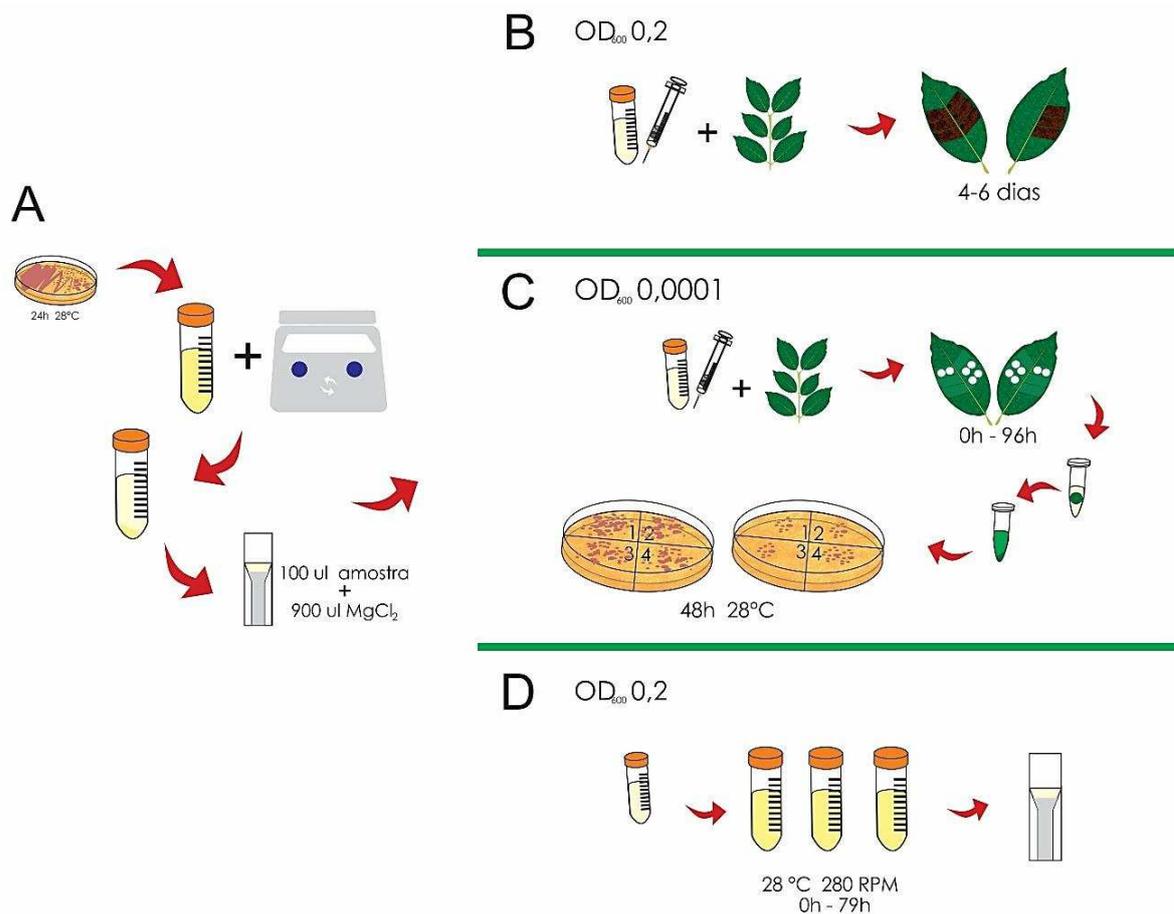


Figura 9. Esquema da metodologia utilizada a análise funcional dos genes candidatos a efetores. (A) Esquema de seleção de bactérias e ajuste da densidade ótica OD₆₀₀ (B) Metodologia para infiltração transiente em genótipos de cafeeiro; (C) Metodologia de crescimento de populações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in vivo; (D) Metodologia de crescimento de populações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in vitro.

RESULTADOS

4.1 Clonagens dos genes candidatos a efetores de *H. vastatrix* no vetor pEDV6 e análise de expressão transiente em folhas de cafeeiro mediado pelo SST3 de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

Dos 17 clones *HvECs* sequenciados, seis candidatos (*HvEC_016*, *HvEC_006*, *HvEC_054*, *HvEC_057*, *HvEC_081* e *HvEC_101*) apresentaram orientação correta no vetor pEDV6, com o códon de parada e sem o sinal de secreção. Estes clones foram selecionados para análises de expressão transiente em folhas de cafeeiros mediada pelo SST3 de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* estirpe 1723 (*Psg* 1723).

Os ensaios de infiltração neste estudo mostraram que cafeeiros portadores do gene *S_{H1}*, isolado ou associado a outros genes *S_H*, não desenvolveram sintomas de necrose quando desafiados com o clone *Psg* 1723 pEDV::*HvEC_016*. Por outro lado, observaram-se sintomas de doença, caracterizados por necrose, em folhas de cafeeiros contendo o gene *S_{H1}* quando as plantas foram infiltradas com os controles positivos (clone *Psg* 1723 pEDV::vazio e *Psg* 1723 selvagem) (Figura 10).

Curiosamente, do mesmo modo que o clone *Psg* 1723 pEDV::*HvEC_016*, os clones pEDV::*HvEC_006*, pEDV::*HvEC_054*, pEDV::*HvEC_057*, pEDV::*HvEC_081* e pEDV::*HvEC_101* não induziram sintomas de necrose em genótipo de cafeeiro contendo o gene *S_{H1}* (Figuras 11, 12, 13, 14, 15). Porém, em genótipos de cafeeiro nos quais o gene *S_{H1}* está ausente, os clones induziram sintomas de necrose que se iniciavam três dias após as infiltrações (Figura 10, 11,12,13,14,15).

Os controles positivos (*Psg* 1723 pEDV::vazio e *Psg* 1723 selvagem) apresentaram o mesmo padrão nas expressões fenotípicas das interações *Psg* 1723-cafeeiro. Os ensaios foram repetidos visando comparar os sintomas da doença induzidos pelo clone *Psg* 1723 pEDV::vazio, com os outros clones *Psg* 1723 pEDV::*HvECs*. Os *HvECs* induziram uma reação de resistência em genótipos de cafeeiro portadores do gene *S_{H1}*. Os resultados das reações diferenciais entre os clones *Psg* pEDV::*HvECs* e os genótipos de cafeeiro avaliados estão na tabela 2.

Tabela 2. Reação diferencial de genótipos de cafeeiro à inoculação com isolado de *H. vastatrix* HV-01 e à infiltração de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* transformada com as construções pEDV-vazio e pEDV (AvrRps4N-HvECs). O experimento foi repetido três vezes, com resultados similares.

Genótipos de cafeeiro	Genes de resistência	Reação de Resistência HV-01 ^b	Reação de Resistência a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i> .								
			Selvagem 1723	pEDV::vazio	pEDV::HVEC_016	pEDV::HVEC_006	pEDV::HVEC_054	pEDV::HVEC_057	pEDV::HVEC_081	pEDV::HVEC_101	
128/2 - <i>Dilla & Algue</i> ^a	<i>S_H</i> 1	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
644/18 - <i>H. Kawisari</i> ^a **	<i>S_H</i> ?	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
785/15 <i>Catucá vermelho</i>	<i>S_H</i> ?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24/137 <i>Catucá Amarelo</i>	<i>S_H</i> ?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IAC44 <i>Catuai Vermelho</i>	<i>S_H</i> 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
134/4 - S 12 <i>Kaffa</i> ^a	<i>S_H</i> 1,4	R	S	S	R	-	-	-	-	-	-
87/1 – <i>Geisha</i> ^a	<i>S_H</i> 1,5	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
IPR 105 ^b	<i>S_H</i> 2,3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1006/10 - KP 532 ^{a**}	<i>S_H</i> 1,2,5	R	S	S	R	-	-	-	-	-	-
H153/2 ^a	<i>S_H</i> 1,3,5	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
635/3 ^{a**}	<i>S_H</i> 1,4,5	R	S	S	R	-	-	-	-	-	-
HW 17/12 ^a	<i>S_H</i> 1,2,4,5	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
H147/1 ^a	<i>S_H</i> 2,3,4,5	R	S	S	S	-	-	-	-	-	-
H420/10 ^a	<i>S_H</i> 5,6,7,9	R	S	S	S	-	-	-	-	-	-
IAPAR 59 ^b	<i>S_H</i> 5,6,7,8,9,?	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IPR 107 ^b	<i>S_H</i> 5,6,7,8,9,?	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

^a Coleção de genótipos de cafeeiro diferenciadores de raças de *Hemileia vastatrix* do CIOF. ^b Genótipos de cafeeiro que possuem resistência em campo a *H. vastatrix*, contendo diferentes genes *S_H*. ^c Isolado de *H. vastatrix* (raça II): Sintomas observados nas plantas infiltradas com bactéria: **S** – presença de anasarca (48 *hai*) e necrose (72 *hai*). **R** - ausência de anasarca e necrose; ** Genótipos de cafeeiro com genes de resistência *S_H*, desafiados com o a proteína HVEC_016 por Maia (2013).

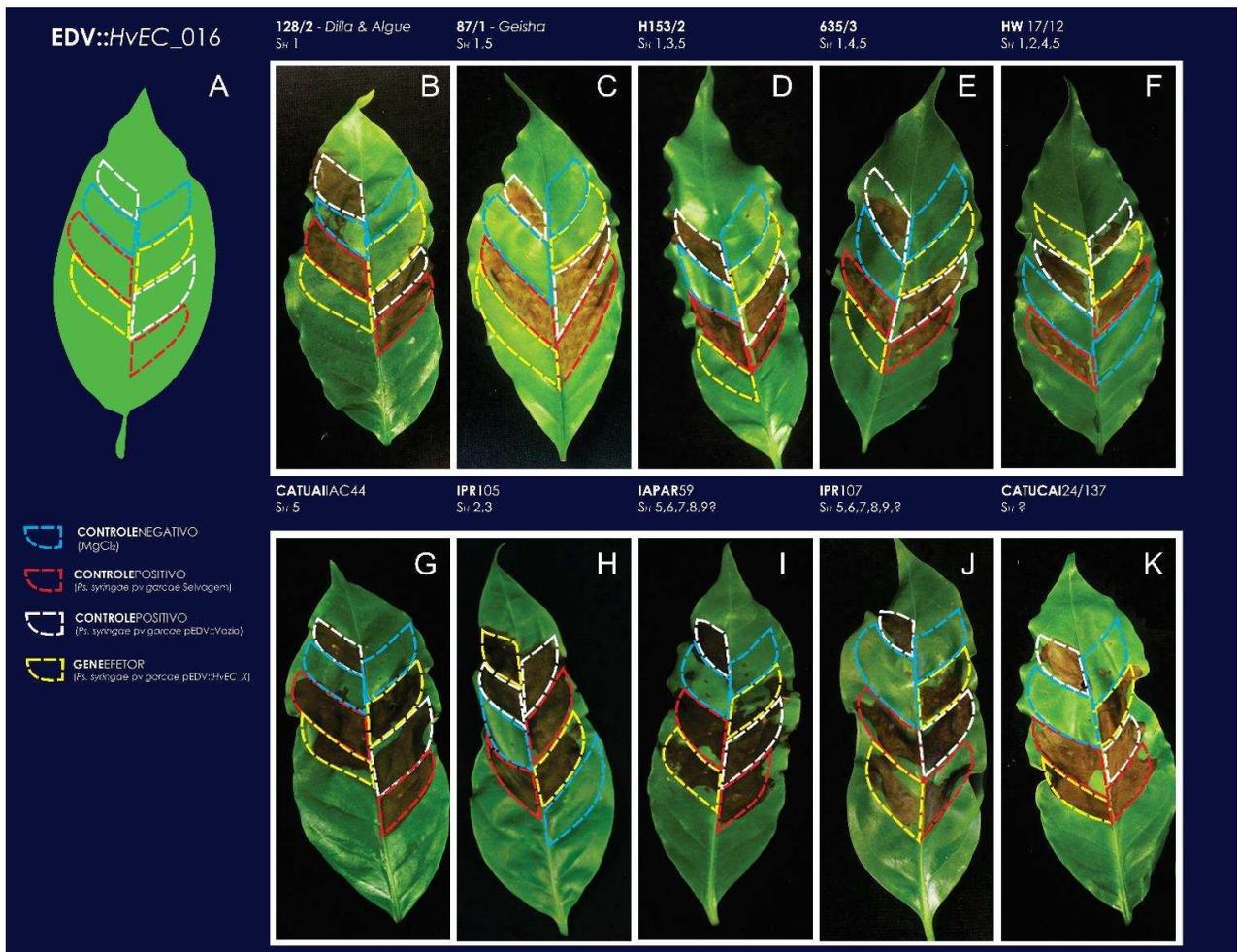


Figura 10. Sintomas observados em folhas de cafeeiros infiltrados com suspensões bacterianas ajustadas a uma densidade ótica $OD_{600} = 0,2$ (aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). (A) esquema representativo da folha de café mostrando as regiões do limbo, entre as nervuras laterais, em que foram infiltrados *Psg1723* Selvagem, controle positivo (vermelho); *Psg1723* transformada com a construção pEDV::vazio, controle positivo (branco); com *Psg1723* transformada com as construções pEDV::HvEC_016 (amarelo); $MgCl_2$ 10 mM, controle negativo (azul). Plantas de B a F possuem o gene de resistência S_{H1} , e as plantas de G a K não possuem o gene de resistência S_{H1} .

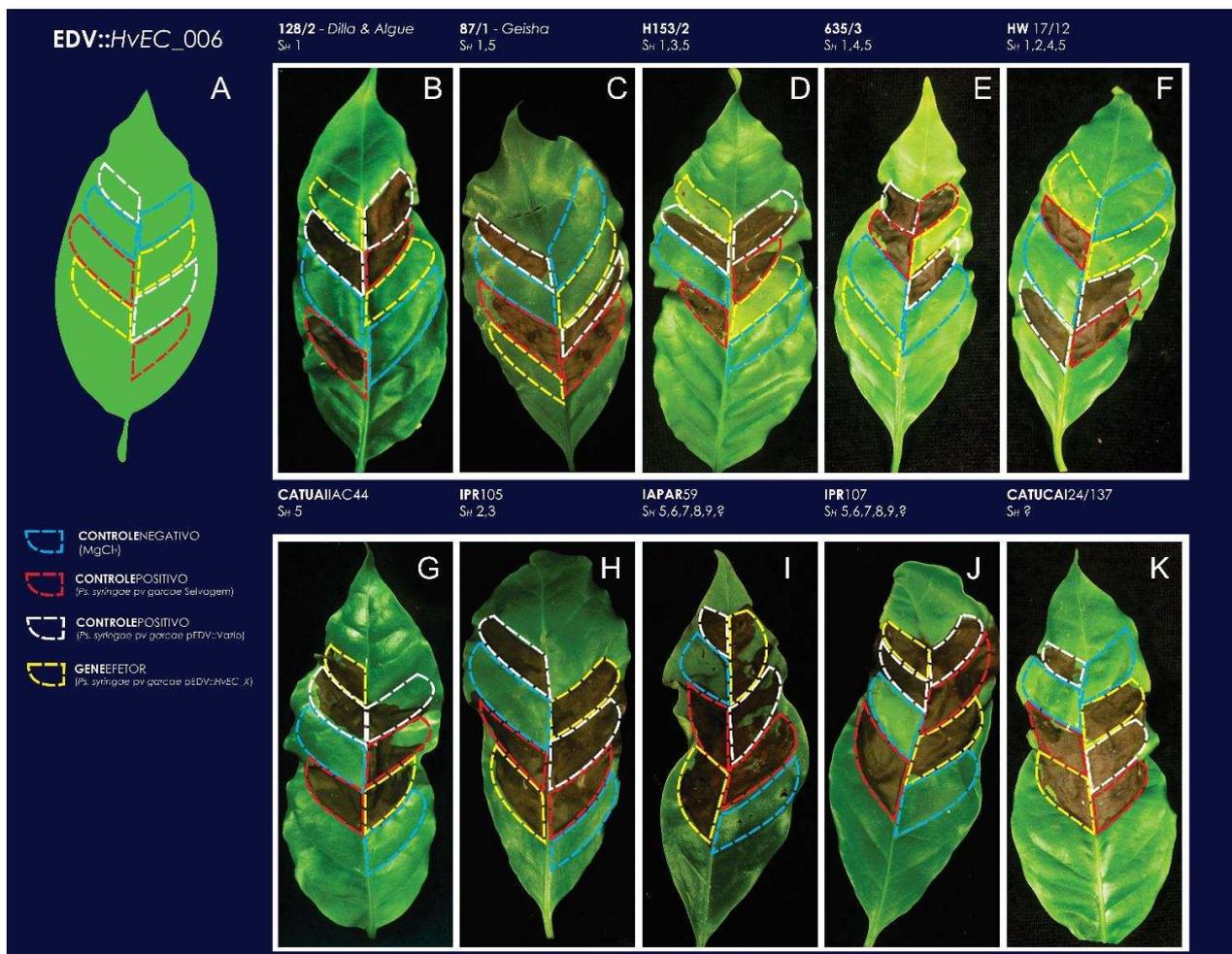


Figura 11. Sintomas observados em folhas de cafeeiros infiltrados com suspensões bacterianas ajustadas a uma densidade ótica $OD_{600} = 0,2$ (aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). (A) esquema representativo da folha de café mostrando as regiões do limbo, entre as nervuras laterais, em que foram infiltrados *Psg1723* Selvagem, controle positivo (vermelho); *Psg1723* transformada com a construção pEDV::vazio, controle positivo (branco); com *Psg 1723* transformada com as construções pEDV:: HVEC_006 (amarelo); $MgCl_2$ 10 mM, controle negativo (azul). Plantas de B a F possuem o gene de resistência S_H1 , e as plantas de G a K não possuem o gene de resistência S_H1 .

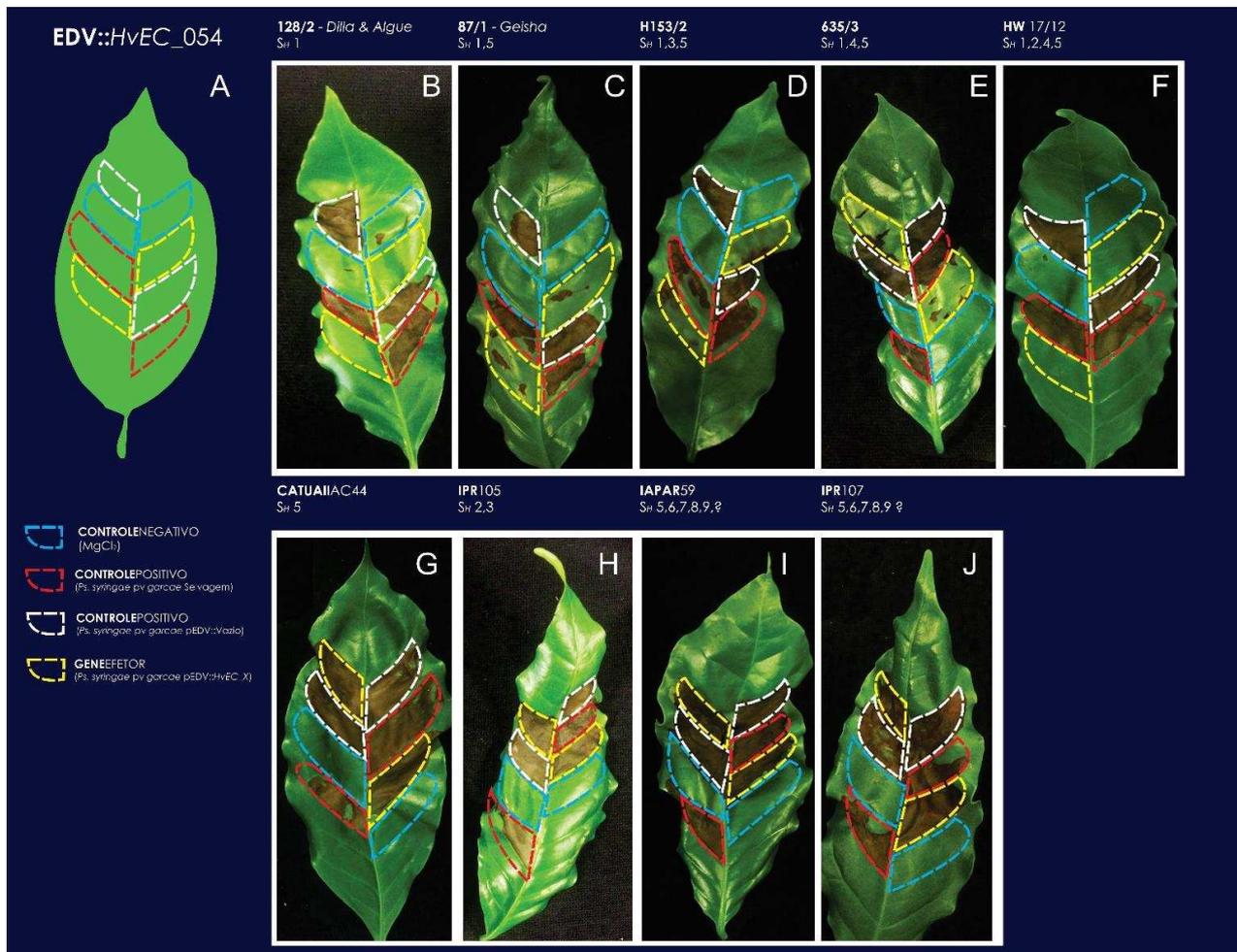


Figura 12. Sintomas observados em folhas de cafeeiros infiltrados com suspensões bacterianas ajustadas a uma densidade ótica $OD_{600} = 0,2$ (aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). (A) esquema representativo da folha de café mostrando as regiões do limbo, entre as nervuras laterais, em que foram infiltrados *Psg1723* Selvagem, controle positivo (vermelho); *Psg1723* transformada com a construção pEDV::vazio, controle positivo (branco); com *Psg1723* transformada com as construções pEDV:: HVEC_054 (amarelo); MgCl₂ 10 mM, controle negativo (azul). Plantas de B a F possuem o gene de resistência *SH1*, e as plantas de G a J não possuem o gene de resistência *SH1*.

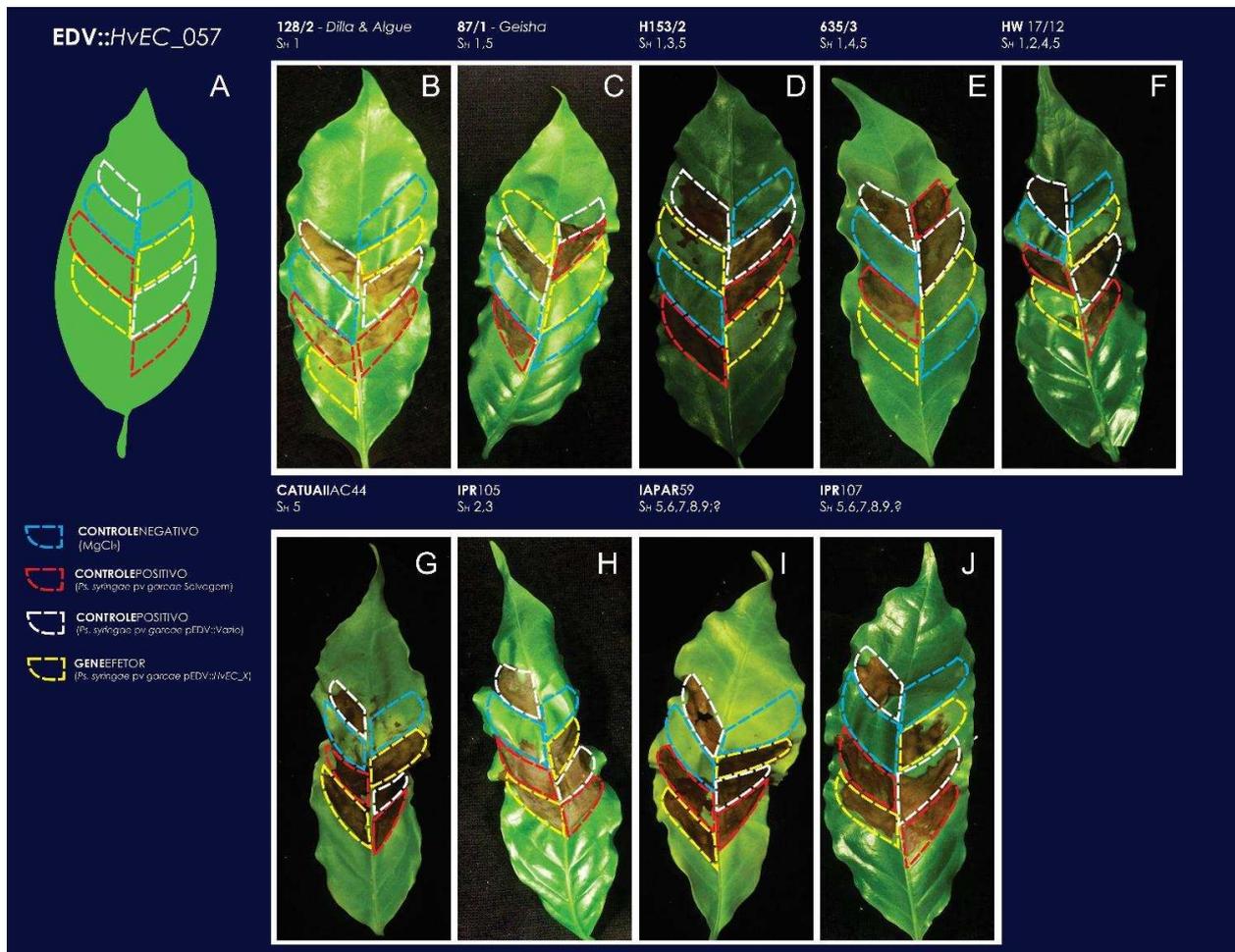


Figura 13. Sintomas observados em folhas de cafeeiros infiltrados com suspensões bacterianas ajustadas a uma densidade ótica $OD_{600} = 0,2$ (aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). (A) esquema representativo da folha de café mostrando regiões do limbo, entre as nervuras laterais, em que foram infiltrados *Psg1723* Selvagem, controle positivo (vermelho); *Psg1723* transformada com a construção pEDV::vazio, controle positivo (branco); com *Psg 1723* transformada com as construções pEDV:: HvEC_057 (amarelo); MgCl₂ 10 mM, controle negativo (azul). Plantas de B a F possuem o gene de resistência SH1, e as plantas de G a J não possuem o gene de resistência SH1.

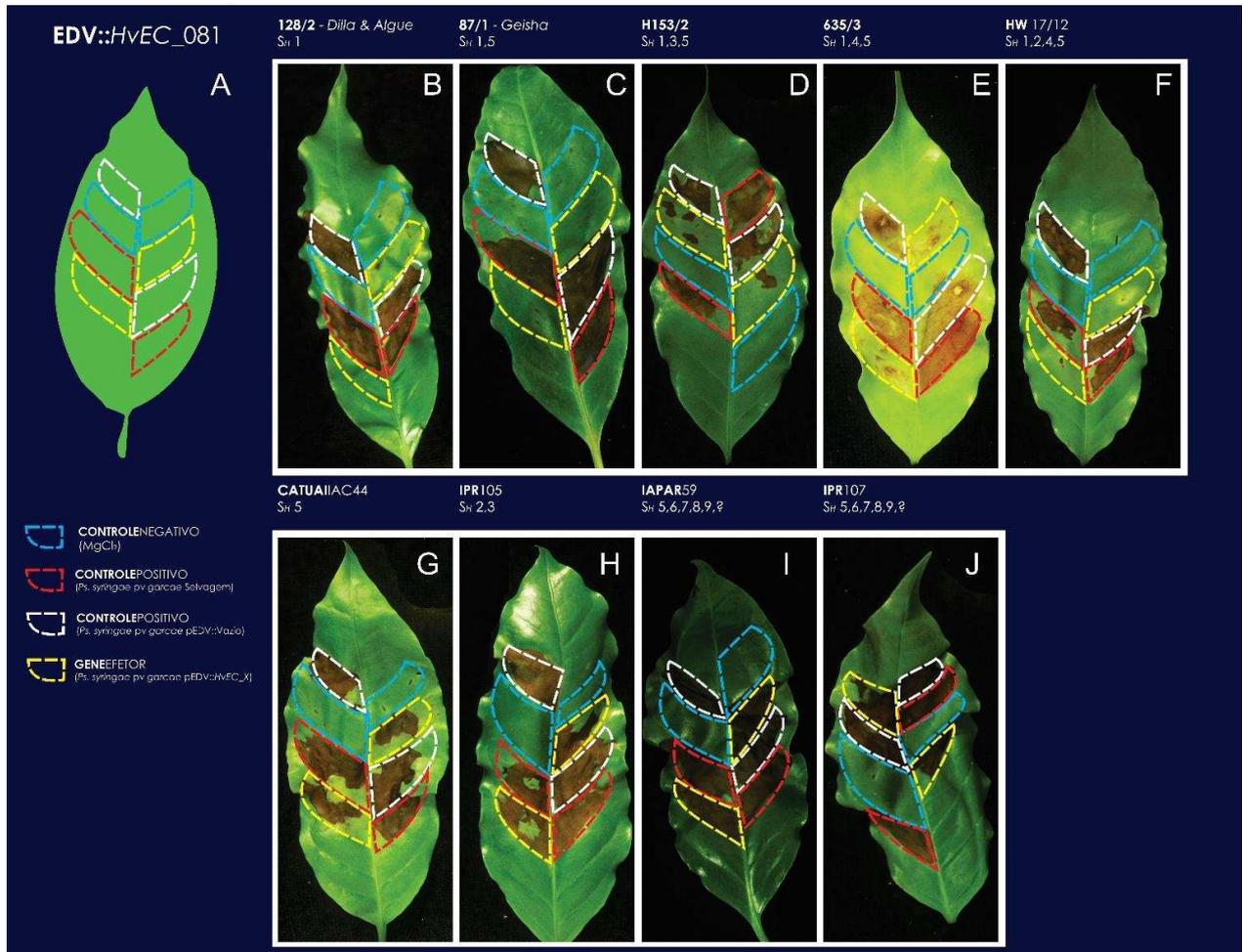


Figura 14. Sintomas observados em folhas de cafeeiros infiltrados com suspensões bacterianas ajustadas a uma densidade ótica $OD_{600} = 0,2$ (aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). (A) esquema representativo da folha de café mostrando as regiões do limbos, entre as nervuras laterais, em que foram infiltrados *Psg1723* Selvagem, controle positivo (vermelho); *Psg1723* transformada com a construção pEDV::vazio, controle positivo (branco); com *Psg 1723* transformada com as construções pEDV:: HvEC_081 (amarelo); MgCl₂ 10 mM, controle negativo (azul). Plantas de B a F possuem o gene de resistência *S_H1*, e as plantas de G a J não possuem o gene de resistência *S_H1*.

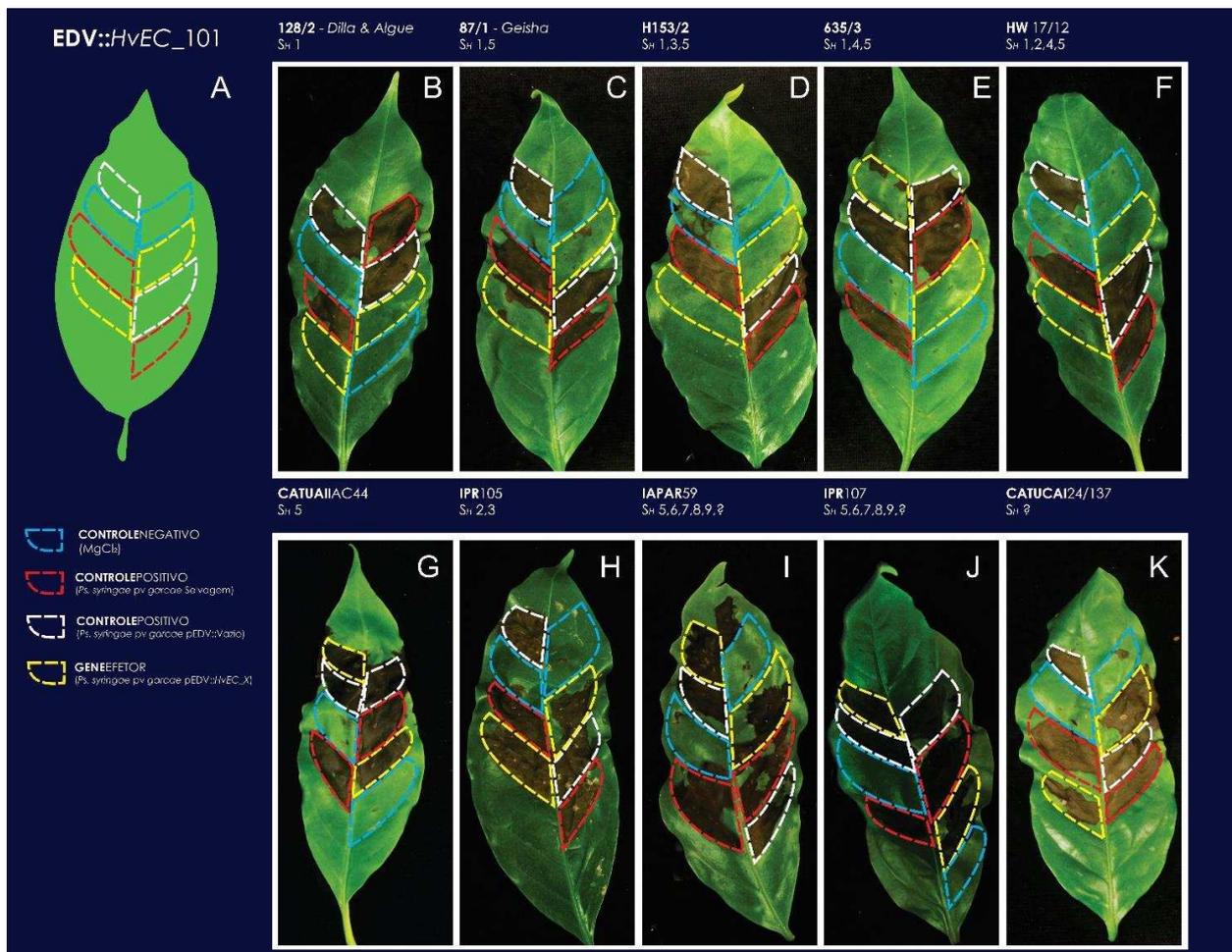


Figura 15. Sintomas observados em folhas de cafeeiros infiltrados com suspensões bacterianas ajustadas a uma densidade ótica $OD_{600} = 0,2$ (aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). (A) esquema representativo da folha de café mostrando regiões do limbo, entre as nervuras laterais, em que foram infiltrados *Psg1723* Selvagem, controle positivo (vermelho); *Psg1723* transformada com a construção pEDV::vazio, controle positivo (branco); com *Psg1723* transformada com as construções pEDV:: HVEC_101 (amarelo); MgCl₂ 10 mM, controle negativo (azul). Plantas de B a F possuem o gene de resistência *SH1*, e as plantas de G a J não possuem o gene de resistência *SH1*.

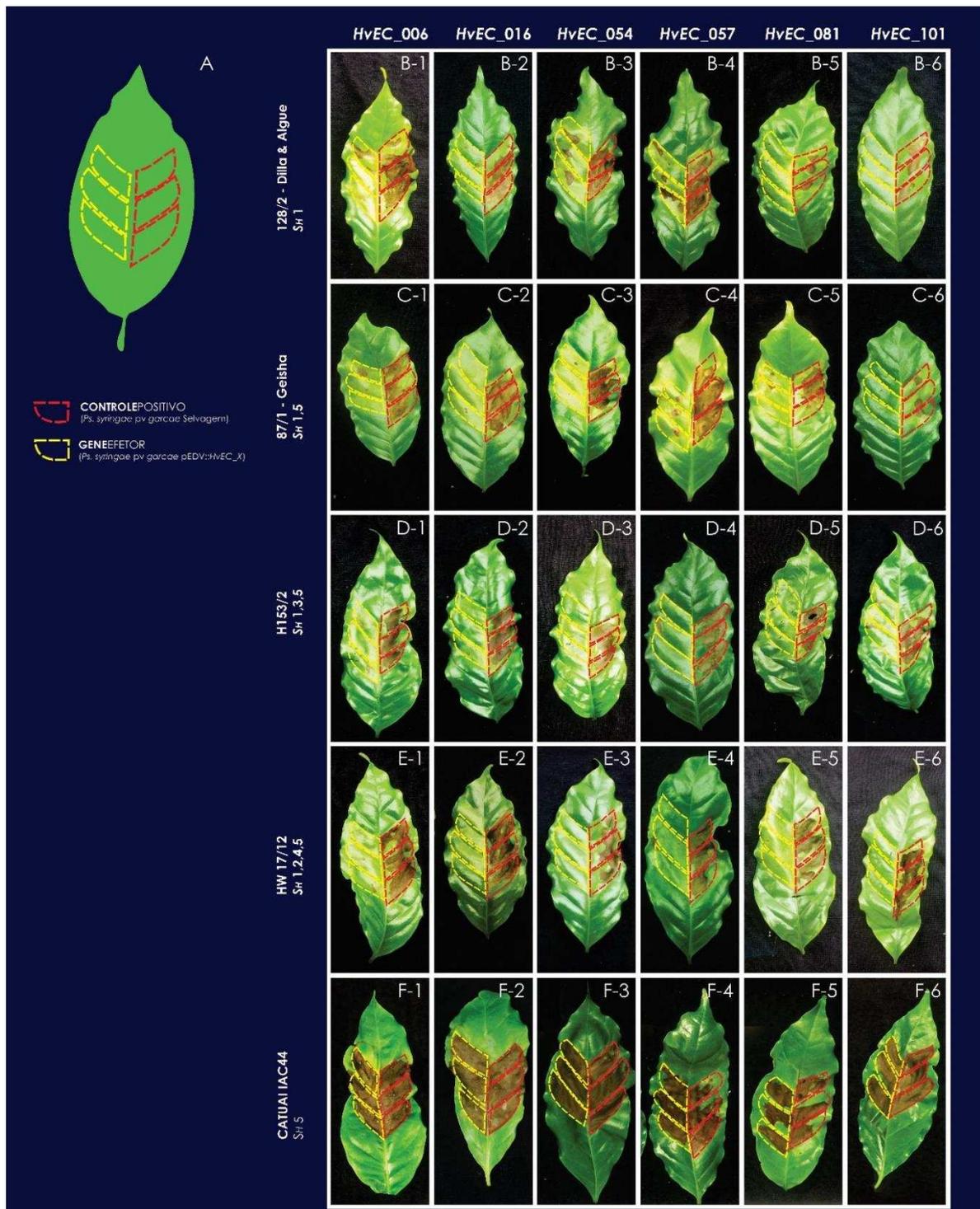


Figura 16. Sintomas observados em folhas de cafeeiros portadores do gene de resistência à ferrugem S_H da coleção de diferenciados de raças de *Hemileia vastatrix*. As folhas foram infiltradas com suspensões bacterianas ajustadas a uma densidade ótica $OD_{600} = 0,2$ (aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). **(A)** Esquema representativo da folha de café mostrando as regiões do limbo, entre as nervuras laterais, em que foram infiltrados os clones *Psg1723* pEDV:: HVEC's (à esquerda-amarelo) e com o clone *Psg 1723* pEDV::vazio (à direita-vermelho); **(B)** genótipo 128/2 Dilla & Algue (S_H1); **(C)** genótipo 87/1 Geisha ($S_H1,5$); **(D)** genótipo H153/2 ($S_H1,3,5$); **(E)** genótipo HW 17/12 ($S_H1,2,4,5$); **(F)** genótipo Catuai IAC44 (S_H5).

4.2 Determinação do crescimento de populações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in vivo.

4.2.1- Crescimento populacional de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* estirpe *Psg* 1723 pEDV:: HVEC_016 em genótipos de cafeeiros contendo o gene *SH1*.

As cultivares 128/2 *Dilla & Algue*, 134/4 - S12 Kaffa, 87/1 *Geisha*, 1006/10 - KP 532, H153/2, 635/3, Hw17/12 inoculadas com o clone *Psg* 1723 expressando a proteína HVEC_016 apresentaram uma significativa redução no crescimento da população bacteriana em 72 e 96 horas após infiltração (Figura 17), quando comparadas com os controles positivos (*Psg* 1723 pEDV::vazio e *Psg* 1723 selvagem). O número de bactérias em folhas inoculadas com *Psg* 1723 pEDV:: HVEC_016 foi aproximadamente 10 vezes menor que em folhas inoculadas com os controles positivos (*Psg* 1723 pEDV::vazio e *Psg* 1723 selvagem) (Figura 17). Não observaram-se sintomas de clorose, encharcamento e necrose nas plantas infiltradas com os clones controles positivos.

4.2.2- Aumento da virulência de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. (*Psg* 1723) pEDV:: HVEC_016 em genótipos de cafeeiro com ausência do gene *SH1*.

As cultivares "IAC-44", H147/1, H420/10 e IAPAR 59 foram inoculadas com os mesmos clones de *Psg* 1723, descritos em 4.2.1. Houve aumento significativo do número de células do clone *Psg* 1723 pEDV:: HVEC_016 em relação ao clone pEDV::vazio, nos genótipos avaliados, às 72 e 96 horas após infiltração. Observou-se o crescimento das populações bacterianas em alto nível, nos tempos de 72 e 96 hai. No entanto, não se detectou o desenvolvimento de sintomas da doença nos genótipos de café estudados (Figura 17).

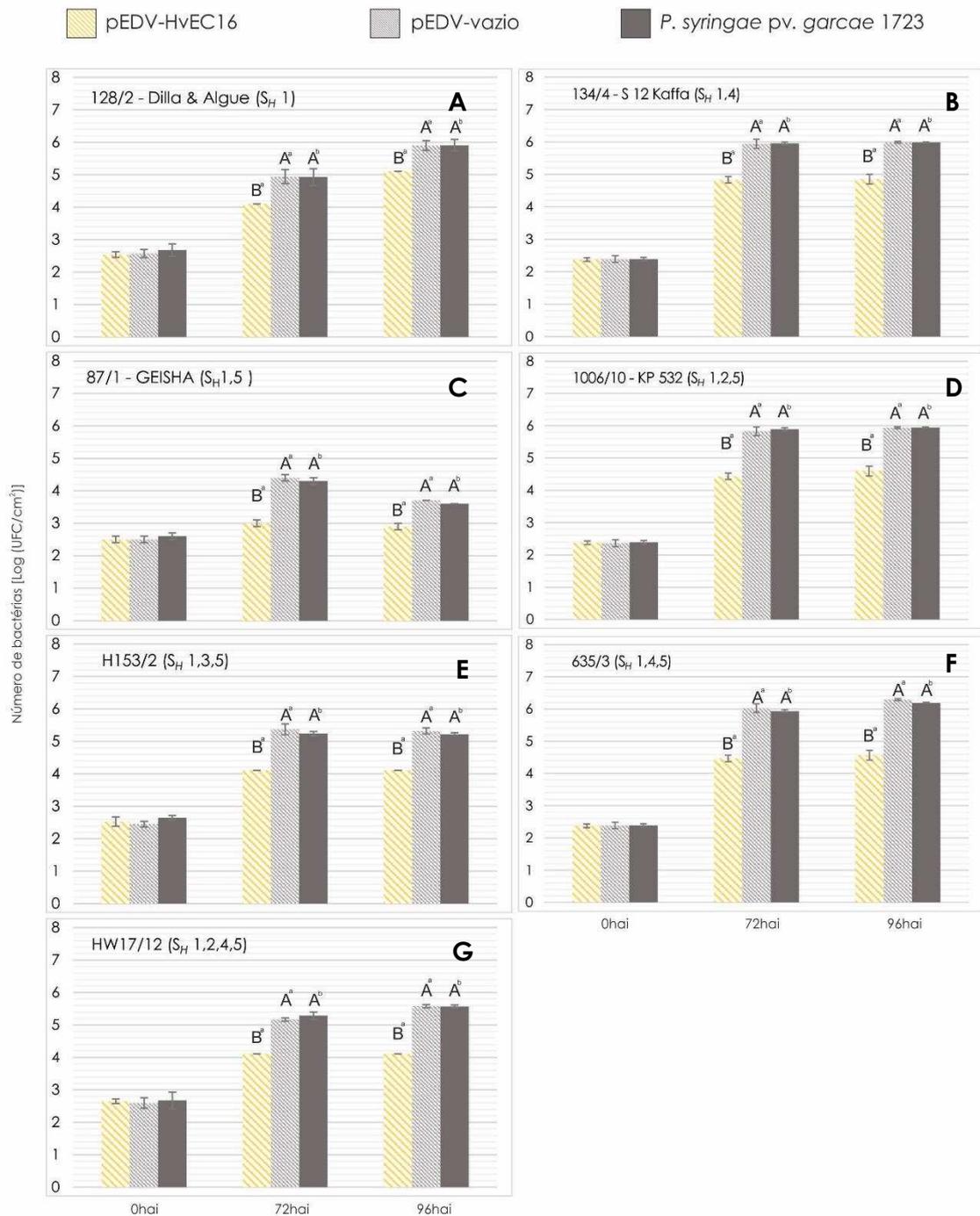


Figura 17. A proteína HvEC_016 restringe o crescimento de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, estirpe 1723, em folhas de sete genótipos de cafeeiro portadores do gene S_H1 . **(A)** 128/2 *Dilla & Algue* (S_H1), **(B)** 134/4 - S12 Kaffa ($S_H 1,4$), **(C)** 87/1 *Geisha* ($S_H1,5$), **(D)** 1006/10 - KP 532 ($S_H 1,2,5$), **(E)** H153/2 ($S_H 1,3,5$), **(F)** 635/3 ($S_H 1,4,5$), **(G)** Hw17/12 ($S_H 1,2,4,5$). As folhas foram infiltradas com uma suspensão bacteriana ajustada a uma densidade ótica $OD_{600} = 0,0001$ (aproximadamente 1×10^5 UFC/mL). As populações dos clones (*Psg* 1723 pEDV::HvEC_016, *Psg* 1723 pEDV::vazio e *Psg* 1723 selvagem) foram avaliados em 0, 72 e 96 horas após a infiltração. Cada barra representa a média do número de colônias de bactéria recuperadas em meio King B contendo os antibióticos (a Rif 100 +Gen 25 ; b Rif 100), a partir de três réplicas biológicas. Médias dos clones bacterianos seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste t ($\alpha=0,05$).

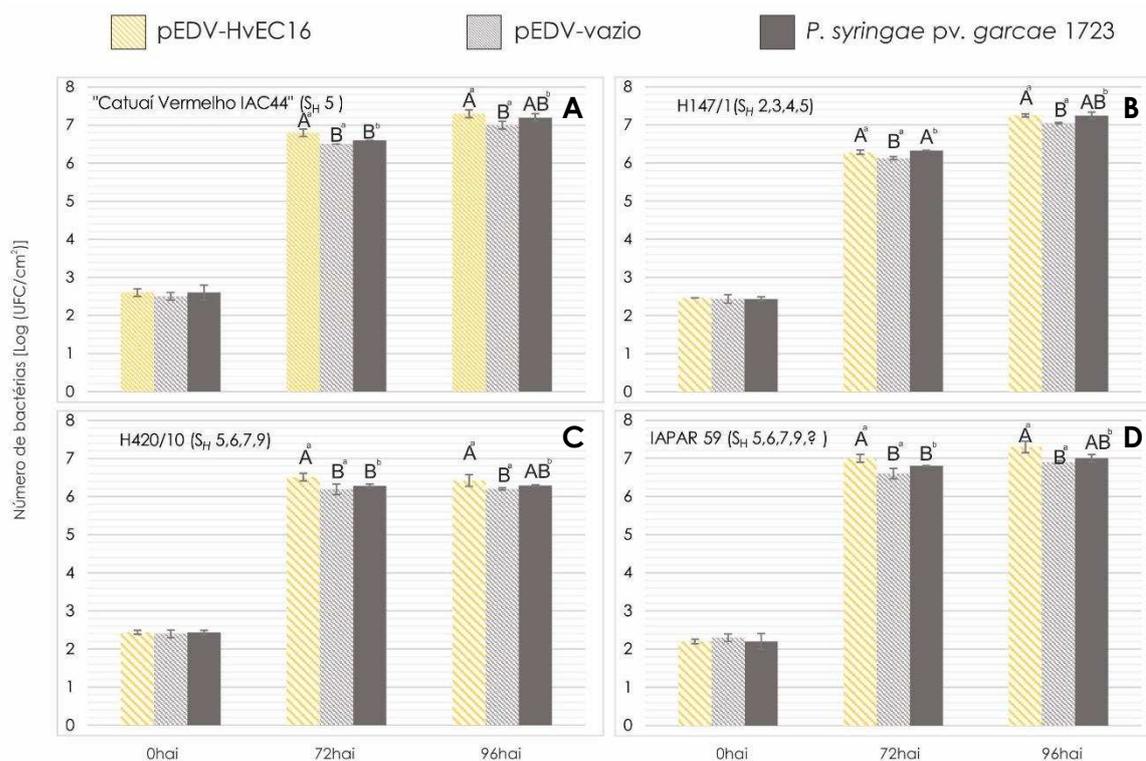


Figura 18. A proteína HvEC_016 contribui para o crescimento de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, estirpe 1723, em folhas de genótipos de cafeeiro sem o gene *S_H1*. **(A)** Catuaí Vermelho "IAC-44" (*S_H5*), **(B)** H147/1(*S_H 2,3,4,5*), **(C)** H420/10 (*S_H 5,6,7,9*), **(D)** IAPAR 59 (*S_H 5,6,7,8,9,?*) As folhas foram infiltradas com uma suspensão bacteriana ajustada a uma densidade ótica OD₆₀₀ = 0, 0001 (aproximadamente 1 x 10⁵ UFC/mL). As populações dos clones (*Psg* 1723 pEDV::HvEC_016, *Psg* 1723 pEDV::vazio e *Psg* 1723 selvagem) foram avaliados em 0, 72 e 96 horas após a infiltração. Cada barra representa a média do número de colônias de bactéria recuperadas em meio King B contendo os antibióticos (^aRif¹⁰⁰+Gen²⁵; ^bRif¹⁰⁰), a partir de três réplicas biológicas. Médias dos clones bacterianos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste t ($\alpha=0, 05$).

4.2.3- Estabilidade dos construções pEDV::HvECs em *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. (*Psg* 1723).

Houve a amplificação dos genes *HvECs*, por meio da utilização dos iniciadores EDV-universais, nas colônias selecionadas em meio King B contendo os antibióticos Rif¹⁰⁰+Gen²⁵ ou Rif¹⁰⁰, indicando a estabilidade do plasmídeo pEDV6 nas células bacterianas durante a multiplicação dos clones *Psg* 1723 nas plantas (Figura 19).

Os amplicons de cada *HvECs* apresentaram tamanho esperado no gel de agarose, quando somados à 749 pb que são amplificadas a partir do vetor pEDV6. Os tamanhos esperados das sequências nucleotídicas são: pEDV::*HvEC_016* (aprox. 1.424 pb), pEDV::*HvEC_006* (aprox. 1.142 pb), pEDV::*HvEC_057* (aprox. 1,186 pb), pEDV::*HvEC_081* (aprox. 1.109 pb), pEDV::*HvEC_101* (aprox. 1.061 pb) e pEDV::*HvEC_054* (aprox. 1.220 pb). O amplicon referente ao vetor pEDV::vazio apresenta tamanho de aprox. 2.467 pb (Figura 19).

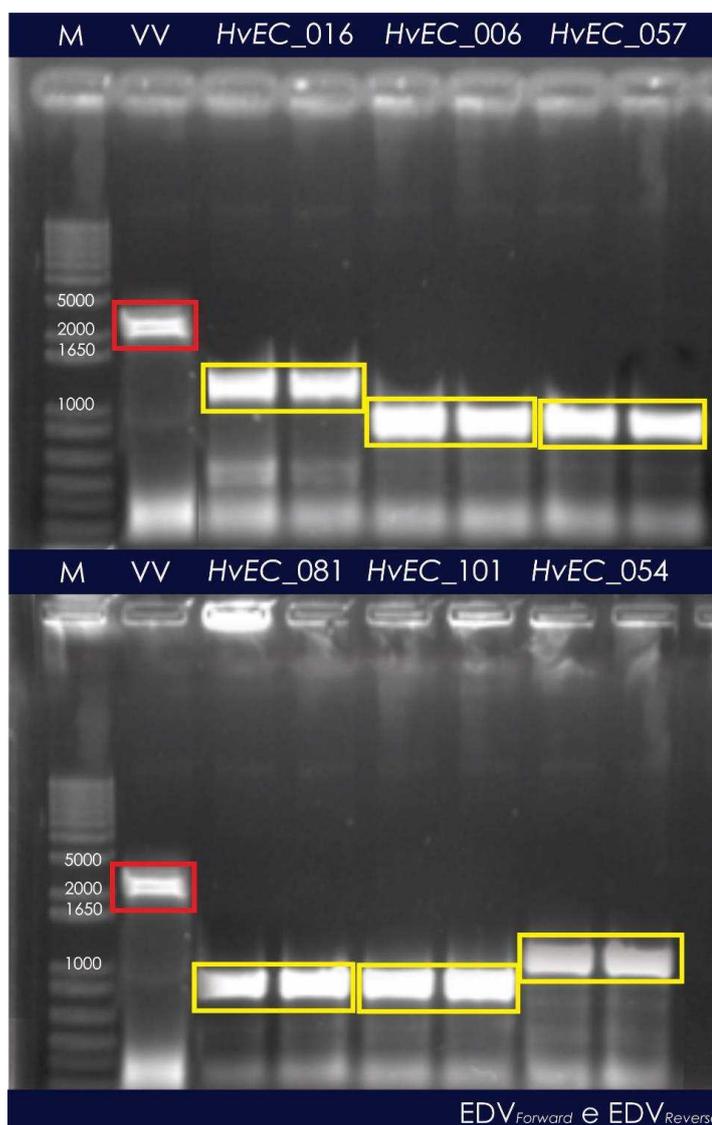


Figura 19. Amplificação por PCR dos genes efetores clonados no vetor pEDV6 a partir de colônias dos clones Psg 1723 (pEDV::*HvEC_016*, pEDV::*HvEC_006*, pEDV::*HvEC_054*, pEDV::*HvEC_057*, pEDV::*HvEC_081*, pEDV::*HvEC_101*; Marcador 1Kb (M) e pEDV::Vazio (VV).

4.3 Determinação do crescimento de populações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. (Psg 1723) *in vitro*.

Para verificar se os clones Psg 1723 (pEDV::vazio e pEDV::HVEC_016) apresentam comportamento similar ao clone Psg 1723 selvagem, avaliou-se o crescimento das populações bacterianas *in vitro*.

Com base na curva de crescimento *in vitro*, os clones apresentaram padrões de propagação muito semelhantes. O início da multiplicação dos clones Psg 1723 foi observado às três horas após a transferência para o meio de cultura. Do mesmo modo, para todos os clones em estudo, o ponto de saturação das culturas, que representam o crescimento máximo, ocorreu em 48 horas após incubação. (Figura 20).

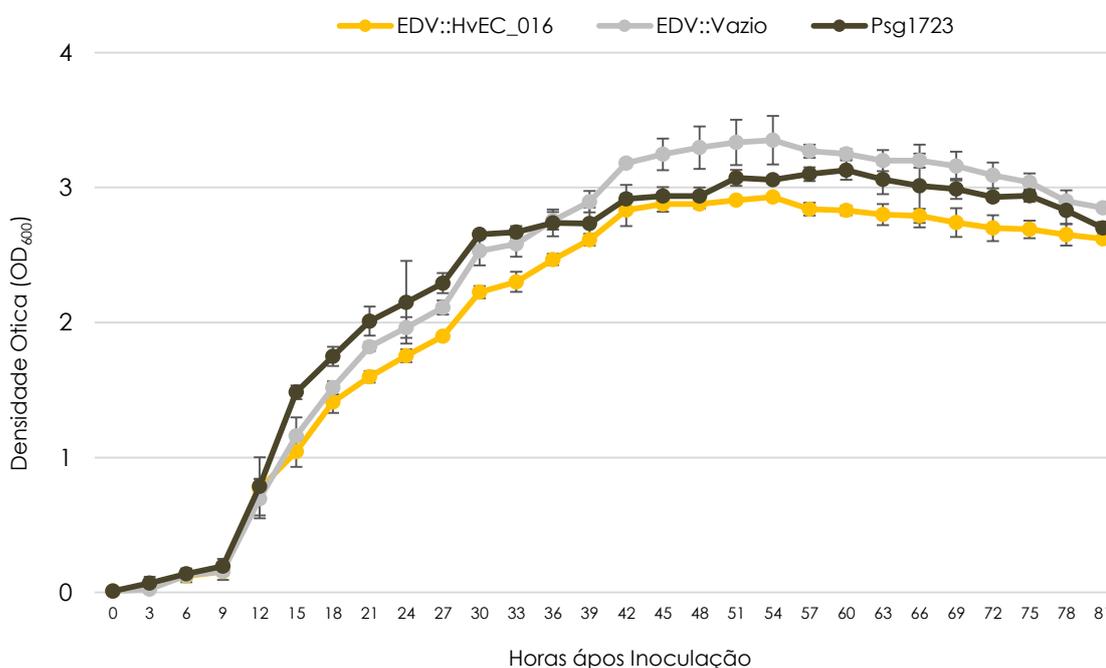


Figura 20. Curva de crescimento de populações bacterianas *in vitro*. Os clones de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Psg 1723 pEDV::Vazio, Psg1723 pEDV::HVEC_016 e Psg1723 selvagem) foram cultivados em meio King B líquido contendo os antibióticos Rif¹⁰⁰+Gen²⁵ ou Rif¹⁰⁰, e a OD₆₀₀ foi mensurada ao longo do tempo.

4.4 Reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco infiltradas com diferentes concentrações de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (*Psg* 1723) contendo as construções com os genes candidatos a efetores de *H. vastatrix*.

Os clones foram avaliados quanto a capacidade de indução de HR em tabaco (Figura 21). Observou-se o desenvolvimento de HR em todas as folhas infiltradas com *Psg* 1723 selvagem ou transformada com pEDV::vazio, pEDV:: HVEC_006, pEDV:: HVEC_016 e pEDV:: HVEC_101 e nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos em relação ao colapso de tecidos foliares e no tempo do desenvolvimento dos sintomas, que foram observados a partir de 24 horas após as infiltrações.

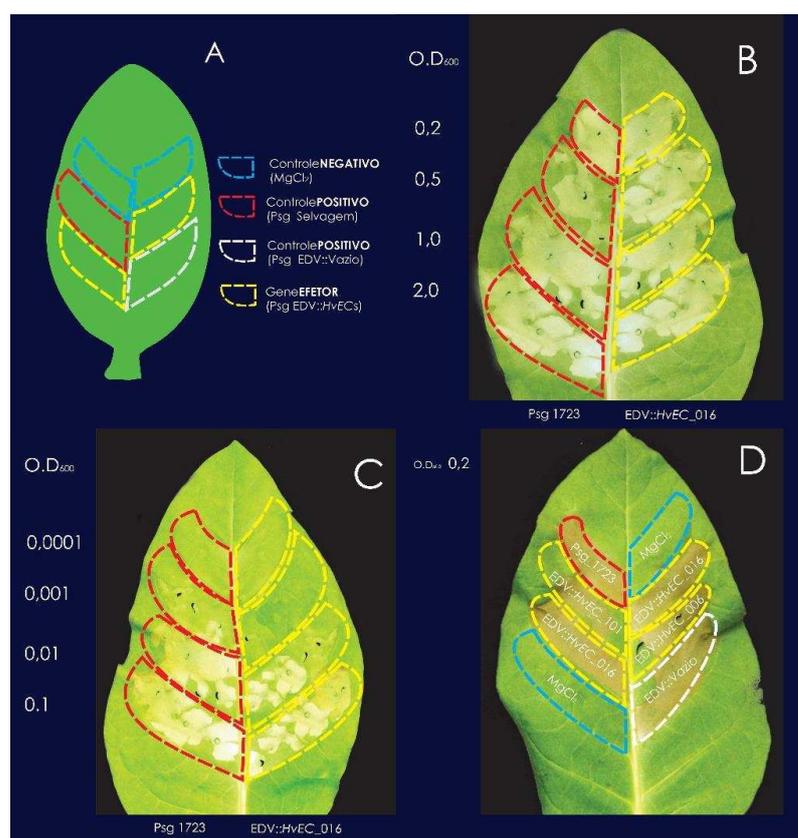


Figura 21. Sintomas observados em folhas de tabaco infiltrados com suspensões dos diferentes clones bacterianos . (A) esquema representativo da folha de tabaco mostrando as regiões do limbo foliar que foram infiltradas com MgCl₂ 10 mM, controle negativo (azul); *Psg* 1723 selvagem, controle positivo (vermelho); *Psg* 1723 pEDV::vazio, controle positivo (branco); e *Psg* 1723 pEDV::HvECs (amarelo); **(B e C)** folhas de tabaco infiltradas com diferentes densidade de inóculo dos clones *Psg* 1723 selvagem e *Psg* 1723 pEDV::HvEC_016; **(D)** folhas de tabaco infiltradas com suspensões bacterianas de 2×10^7 UFC/mL dos clones *Psg* 1723 pEDV (HVEC_006, HVEC_016, HVEC_101), *Psg* 1723 pEDV:: vazio e *Psg* selvagem. MgCl₂ 10 mM foi infiltrado como controle negativo.

DISCUSSÃO

As proteínas efetoras secretadas por fungos fitopatogênicos podem suprimir as respostas de defesa da planta, aumentando a severidade da doença, ou desencadear uma resposta de defesa por meio do seu reconhecimento pelo sistema imune vegetal. Maia (2013) identificou vários genes que codificam proteínas secretadas pelo isolado monopustular da raça II de *H. vastatrix* (Hv-01). Este isolado é virulento somente em genótipos de cafeeiro contendo o gene *S_{H5}*. Assim, de acordo com a teoria *gene-a-gene* de Flor (1942), é possível que alguns dos genes identificados por Maia (2013) sejam genes de avirulência, ou seja, genes que codificam proteínas efetoras reconhecidas pelas proteínas de resistência codificadas pelos genes *S_H* em genótipos de cafeeiro.

Estudos funcionais em *H. vastatrix* são difíceis de ser realizados, por vários motivos. Em primeiro lugar, esse fungo não possui o ciclo de vida completo (Fernandes *et al.*, 2009), o que dificulta estudos genéticos de associação para estabelecer a ligação gênica entre candidatos a efetores e genes *Avr*. Em segundo lugar, a falta de um sistema de transformação estável dificulta a manipulação genética requerida para análise molecular da patogenicidade e virulência desse fungo por meio da geração de mutantes ou transformantes. Além disso, por se tratar de um parasita obrigatório, tanto a transformação quanto a seleção dos transformantes devem ser efetuados *in vivo*, no próprio hospedeiro. Em terceiro lugar, estudos com base na inativação gênica são dificultados pela natureza dicariótica predominante no ciclo de vida do fungo. Para minimizar essas dificuldades, Maia (2013) usou o sistema EDV que têm sido amplamente utilizado para a caracterização funcional de proteínas efetoras de patógenos filamentosos (Badel *et al.*, 2013; Cabral *et al.*, 2011; Fabro *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2013; Sohn *et al.*, 2007; Upadhyaya *et al.*, 2014) e estabeleceu um protocolo de expressão transiente de genes que codificam proteínas secretadas de *H. vastatrix* em tecidos foliares de cafeeiro com base no SST3 de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e no vetor pEDV6.

Estudos funcionais com o gene candidato a efector *HvEC_016* foram realizados anteriormente por Maia (2013), e os ensaios de infiltração neste estudo confirmaram que cafeeiros portadores do gene *S_{H1}*, isolado ou associado com outros genes *S_H*, não

desenvolvem sintomas de necrose quando desafiados com o clone *Psg 1723 pEDV::HvEC-016*. Por outro lado, observaram-se sintomas de doença, caracterizado por necrose, em folhas de cafeeiros contendo o gene *S_{H1}* quando as plantas foram infiltradas com os controles positivos (clone *Psg 1723 pEDV::vazio* e a *Psg 1723 selvagem*). A supressão dos sintomas foi associada a uma significativa redução do crescimento populacional bacteriano nos tecidos foliares de genótipos de cafeeiro portadores do gene *S_{H1}*. Esses resultados sugerem que *HvEV_016* pode ser reconhecido pelo sistema imune dos genótipos de cafeeiro de uma maneira *S_{H1}*-dependente, demonstrando que *HvEV_016* pode ser uma proteína de avirulência.

Uma interpretação alternativa para a supressão dos sintomas da doença nos cafeeiros portadores do gene *S_{H1}* seria o bloqueio parcial da secreção dos efetores bacterianos via *SST3*, em decorrência da expressão da proteína *HvEC_016*. Esta possibilidade foi descartada uma vez que a funcionalidade do *SST3* foi confirmada pela infiltração dos clones em folhas de tabaco com diferentes concentrações de suspensões bacterianas e não houve diferença entre os tratamentos em termos de desenvolvimento de HR, que foi observada a partir de 24 horas após as infiltrações. Também, não se verificou diferença no padrão de crescimento populacional em meio de cultura King B líquido (*in vitro*) entre os clones *Psg 1723 pEDV::HvEC_016*, *Psg 1723 pEDV::vazio* e *Psg 1723 selvagem*. Isso indica que a mobilização das construções *pEDV::HvEC_016* e *pEDV::vazio* para *Psg 1723* não causou nenhum efeito deletério para a fisiologia das células bacterianas. Este resultados corroboram para demonstrar que a supressão da virulência do clone *Psg 1723 pEDV::HvEC_016* em genótipos de cafeeiro com *S_{H1}* foi devido a expressão da proteína efetora de origem fúngica.

Genes de avirulência contribuem para a virulência na ausência do gene de resistência cognato (Grant *et al.*, 2006; Jones e Dangl, 2006). Desta forma, investigou-se a hipótese que a proteína *HvEC-016* poderia aumentar a virulência de *Psg 1723* em tecidos foliares de café que não possuem o gene de resistência *S_{H1}*. Determinou-se a curva de crescimento bacteriano do clone *Psg 1723 pEDV::HvEC_016* em quatro genótipos de cafeeiro, dois genótipos da série diferenciadora do CIFC H147/1 (*S_H 2,3,4,5*) e H420/10 (*S_H 5,6,7,9*) e duas cultivares comerciais Catuaí Vermelho "IAC-44" (*S_H5*), e IAPAR 59 (*S_H 5,6,7,8,9,?*) que não possuem o gene *S_{H1}*. Em relação ao controle positivo *Psg 1723* não transformada, houve um aumento significativo do crescimento populacional do clone *pEDV::HvEC_016* em todos os genótipos avaliados. Também,

detectou-se um crescimento significativo do clone *Psg 1723 pEDV::HvEC_016* em relação ao clone *Psg 1723 pEDV::vazio* às 72 e 96 h. Sendo assim, demonstrou-se que a proteína *HvEC_016* também contribui para o crescimento bacteriano em genótipos de cafeeiros sem o gene *S_{H1}*.

De modo geral, observou-se que os crescimentos das populações dos clones *Psg 1723* em genótipos de cafeeiros com ausência do gene *S_{H1}* foram cerca de 100 vezes maiores que as observadas para os cafeeiros com genes *S_{H1}*, indicando que os backgrounds genéticos dos cafeeiros com o gene *S_{H1}* podem estar influenciando no crescimento bacteriano. Embora o background genético dos cafeeiros portadores do gene *S_{H1}* possa ter interferido no crescimento bacteriano, a possibilidade desses cafeeiros serem imunes a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* foi descartada, pois no ensaio funcional demonstrou-se que os clones *Psg 1723 pEDV::vazio* e *Psg 1723 selvagem* foram virulentos, desenvolvendo sintomas de necrose nas folhas a partir de três dias após a infiltração. Também verificou-se a presença da construção *pEDV::HvEC_016* nas células bacterianas, provenientes das folhas infiltradas, que foram recuperadas em meio de cultura, demonstrando a estabilidade do vetor *pEDV6* nos clones estudados. Sendo assim, conclui-se que a abordagem experimental de translocação de candidatos a efetores através do SST3 de *Psg 1723* foi eficiente para a identificação de efetores com potencial atividade de avirulência, embora os ensaios de curva de crescimento em genótipos com ausência do gene *S_{H1}* encontram-se em fase de repetição no Laboratório.

Como o gene *S_{H1}* ainda não foi clonado, estudos de co-expressão transiente por meio da co-infiltração em outras espécies de planta, tais como *Nicotiana benthamiana*, não são possíveis neste momento. No entanto, outros experimentos podem ser realizados para assegurar a atividade de avirulência do gene *HvEC_016*, como a clonagem de variantes alélicas expressos por raças fisiológicas de *H. vastatrix* capazes de suplantam a resistência conferida pelo gene *S_{H1}*, como por exemplo a raça III (*v1*, *v5*), que já foi descrita no Brasil (Cabral *et al.*, 2009; Capucho *et al.*, 2012; Rodrigues e Bettencourt, 1975). Assim, os clones de *Psg 1723* expressando alelos do gene *HvEC_016* poderiam ser incapazes de ativar a imunidade conferida pelo gene *S_{H1}*. Além disso, ensaios de Western Blot poderiam ser utilizados para confirmar a translocação da proteína *HvEC_016* para dentro da célula vegetal do cafeeiro via SST3 de *Psg 1723*.

Nos estudos funcionais de infiltração com os novos *HvECs*, resultados similares ao clone *Psg 1723 pEDV::HvEC_016* foram observados para os clones *Psg 1723 (HvEC_006, HvEC_054, HvEC_057, HvEC_081 e HvEC_101)*. É possível que a supressão de necrose observada em genótipos portadores do gene *SH1*, isolado ou associado com outros genes *SH*, seja resultado do possível reconhecimento dos efetores por proteínas R codificadas pelos genes *SH*. Todavia, essas interações devem ser também confirmadas futuramente pela análise de crescimento bacteriano *in planta*. Portanto, os resultados obtidos ainda são preliminares. O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução das ORFs pelo programa ClustalW demonstrou que os efetores putativos *HvECs* analisados não apresentam similaridade de sequência (dados não-mostrados). Portanto, não se detectou nenhum motivo conservado entre os *HvECs*. A existência de um agrupamento gênico localizado no loco *SH1* com diferentes especificidades de reconhecimento pode ser postulada caso seja confirmada que a supressão do desenvolvimento da necrose em plantas de café causado pelos novos clones *Psg 1723 pEDV::HvECs* é dependente do fator *SH1*.

É importante destacar que a aplicação do sistema pEDV pode auxiliar as análises da atividade de avirulência dos *HvECs* em acessos/linhagens de cafeeiro disponíveis nos bancos de germoplasma dos principais programas de melhoramento que visam resistência à ferrugem no Brasil. Além disso, essa abordagem poderá acelerar a identificação de novos genes de resistência em genótipos de cafeeiro, bem como diminuir o tempo de realização dos ensaios de fenotipagem em populações de plantas segregantes, pela praticidade e rapidez de trabalhar com fitobactérias em relação a *H. vastatrix*.

CONCLUSÕES

1. Foram analisados funcionalmente seis *HvECs* de *H. Vastatrix* que codificam proteínas secretadas utilizando o sistema pEDV e o SSTT3 de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* 1723. Essa análise confirmou a capacidade efetora da proteína codificada pelo gene *HvEC_016*, e permitiu selecionar os genes *HvEC_006*, *HvEC_054*, *HvEC_057*, *HvEC_081* e *HvEC_101*, que apresentaram comportamento similar ao gene *HvEC-016* para uma análise funcional mais detalhada.
2. A supressão de sintomas da doença nos genótipos com *S_{H1}* pela proteína *HvEC_016* foi associada com uma diminuição no crescimento bacteriano. Estes resultados sugerem o reconhecimento da proteína *HVEC_016* pelo sistema imune da planta de café de uma forma dependente de *S_{H1}*, sendo essa proteína uma provável proteína de avirulência de *H. vastatrix*.
3. A análise do crescimento populacional *in vivo* demonstrou que a transformação de *Psg* 1723 com as construções pEDV::vazio e pEDV::*HvEC_016* não teve efeitos deletérios no crescimento da bactéria em cafeeiro.
4. A expressão transiente de proteínas efetoras candidatas no citoplasma mediante a aplicação do sistema pEDV pode auxiliar as análises da atividade de avirulência dos *HvECs*, uma vez que o vetor pEDV6 apresenta estabilidade e não altera a capacidade de multiplicação da bactéria *in planta*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avelino, J. ; Cristancho, M. ; Georgiou, S. ; Imbach, P. ; Aguilar, L. ; Bornemann, G.; Läderach, P. ; Anzueto, F.; Hruska, A. J. and Morales, C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. **Food Security**. 19 p.
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology: 5ª edição, Elsevier. Pp 562-580.
- Alfano, J.R.; Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review of Phytopathology** 42: 385-414.
- Badel, J.L. ; Piquerez, S.J.M. ; Greenshields, D. ; Rallapalli, G. ; Fabro, G. ; Ishaque, N. ; Jones, J.D.G. 2013. In planta effector, competition assays detect *Hyaloperonospora arabidopsidis* effectors that contribute to virulence and localize to different plant subcellular compartments. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 26 (07) 745-757.
- Becker, S.; Morales W.; Quijano RM. 1991. La roya del cafeto conocimiento y control. Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ) Alemania. 281 p.
- Bettencourt, A.J. 1981. Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de factores de resistência à *H. vastatrix* para as principais cultivares de *Coffea arabica*. Centro de Investigação das ferrugens do cafeeiro. Lisboa, Portugal, 93 p.
- Bettencourt, A.J.; Lopes, J. 1982. Factores genéticos que condicionan a Resistencia do Hibrido de Timor a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. Colloque Scientifique Internationale Sur le Café, 10. Salvador, Bahia Brasil, 11 a 14 Outubro de 1982. Rio de Janeiro.
- Bettencourt, A.J.; Rodrigues, C.J. 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: Clarke RJ, Macrae R eds. Coffee: Agronomy. London: **Elsevier Applied Science**. Pp 285-292.
- Boller, T.; Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology** 60: 379-406.
- Bowden, J.; Gregory, P.H.; Johnson, C.G. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. **Nature** 229: 500-501.
- Buttner, D.; He. S.Y. 2009. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. **Plant Physiology** 150(4): 1656-1664.
- Cabral, P.G. ; Zambolim, E.M. ; Zambolim, L. ; Lelis, T.P. ; Capucho, A.S. ; Caixeta, E. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease** 4: 129-130.

- Capucho, A.S.; Zambolim, E.M.; Freitas, R.L.; Haddad, F.; Caixeta, E.T.; Zambolim, L. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease** 7: 189-191.
- Carvalho, C.R.; Fernandes, R.C.; Carvalho, G.M.; Barreto, W.B.; Evans, H.C. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. **Plos One** 6 (11): 263-387.
- Catanzariti, A.M.; Dodds, P.N.; Ellis, J.G. 2007. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters** 269(2): 181-188.
- Chaves, G.M.; Cruz-Filho, J.D.; Carvalho, M.G.; Matsuoka, K.; Coelho, D.T.; Shimoya, C. 1970. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). **Seiva** 30: 1-76.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento.
<http://www.conab.gov.br/busca.php?filtro=cafe>. Acesso: Novembro 2014.
- Coutinho, T.A.; Rijkenberg, F.H.; Van Asch, M.A. 1995. Teliospores of *Hemileia vastatrix*. **Mycological Research** 8: 932-934.
- Cressey, D. 2013. Coffee rust regains foothold. **Nature** 493 (7434): 587.
- Cristancho, M.A.; Rozo, Y.; Escobar, C.; Rivillas, O.C.; Gaitan, B.A. 2012. Razas de Roya, epidemias del 2008 al 2011. Pp 1-8.
- 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. 2014 Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. **Front Plant Sci.** 5:594.
- D'Oliveira, B. 1965. Introduction. Progress Report 1960-65. Centro de Investigação das ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal. Pp. 1-20.
- Del Grossi, L.; Sera, T.; Sera, G.H.; Fonseca, I.; Ito, D.S.; Shigueoka, L.H.; Andreazi, E.; Carvalho, F.G. 2013. Rust resistance in Arabic Coffee cultivars in northern Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 56: 27-33.
- De Wit, P.J.; Mehrabi, R.; Van den Burg, H.A.; Stergiopoulos, I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. **Molecular Plant Pathology** 10 (6): 735-747.
- De Wit, P.J. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences** 64 (21): 2726-2732.
- Dodds, P.N.; Lawrence, G.J.; Catanzariti, A.M.; Ayliffe, M.A.; Ellis, J.G. 2004. The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **Plant Cell** 16 (3): 755-768.
- Dodds, P.N. ; Lawrence, G.J. ; Catanzariti, A.M. ; Teh, T. ; Wang, C.I. ; Ayliffe, M.A. ; Kobe, B. ; Ellis, J.G. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene

specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 103(23): 8888-8893.

- Dodds, P.N.; Rathjen, J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics** 11(8): 539-548.
- Du, J.; Rietman, H.; Vleeshouwers, V.G. 2014. Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*. **Journal of Visualized Experiments**, v.83, p.1-7, 2014. Video Article. Disponível em: < <http://www.jove.com/video/50971>> Acesso em: Jan. 2015.
- Ellis, J.G.; Rafiqi, M.; Gan, P.; Chakrabarti, A.; Dodds, P.N. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4): 399-405.
- Fabro, G. ; Steinbrenner, J. ; Coates, M. ; Ishaque, N. ; Baxter, L. ; Studholme, D.J. ; Korner, E. ; Allen, R.L. ; Piquerez, S. J. ; Rougon-Cardoso, A. ; Greenshields, D. ; Lei, R. ; Badel, J.L. ; Caillaud, M.C. ; Sohn, K.H. ; Van den Ackerveken, G. ; Parker, J.E. ; Beynon, J. ; Jones, J.D. 2011. Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity. **PLoS Pathogens** 7(11): e1002348. doi:10.1371/journal.ppat.1002348
- Fernandes, R.C.; Evans, H.C.; Barreto, R.W. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. **Tropical Plant Pathology** 34 (2): 108-113.
- Fernandez, D.; Tisserant, E.; Talhinhos, P.; Azinheira, H.; Vieira, A.; Petitot, A.S.; Loureiro, A.; Poulain, J.; Da Silva, C.; Silva, M.D.; Duplessis, S. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. **Molecular Plant Pathology** 13(1): 17-37.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9: 275-296.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United States. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s0v.htm>. Acesso: Novembro, 2014.
- Grant, S. R. ; Fisher, E. J. ; Chang, J. H. ; Mole, B. M. ; Dangl, J. L. 2006. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology** 60:425–449.
- Gouveia, M. M.; Ribeiro, A.; Várzea, V.M., Rodrigues, C. J. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. **Mycology** 97 (2): 396-404.
- Hacquard, S. ; Joly, D.L. ; Lin, Y.C. ; Tisserant, E. ; Feau, N. ; Delaruelle, C. ; Legue, V. ; Kohler, A., ; Tanguay, P. ; Petre, B. ; Frey, P. ; Van de Peer, Y. ; Rouze, P. , Martin, F. ; Hamelin, R.C. ; Duplessis, S. 2012. A comprehensive analysis of

genes encoding small-secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). **Molecular Plant-Microbe Interactions** 25(3): 279-293.

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

Hogenhout, S.A.; Van der Hoorn, R.A.; Terauchi, R.; Kamoun, S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 22(2): 115-122.

Hoyos, C.; Gil, V. ; Valencia, A. 2003. Estudio de las interacciones de *Hemileia vastatrix* – *Coffea* spp: proteínas tempranas. **Cenicafé** 54(4):278-285.

ICO. International Coffee Organization. Disponível em http://www.ico.org/ES/trade_statistics.asp?section=Estad%EDstica. Acesso: Novembro, 2104.

Jones, J.D.; Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. **Nature** 444(7117): 323-329.

Kamoun, S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**. 44: 41-60.

Kamoun, S. 2009. The Secretome of Plant-Associated Fungi and Oomycetes Plant Relationships. **The Mycota**. 5: 173-180.

Kleemann, J. ; Rincon-Rivera, L.J. ; Takahara, H. ; Neumann, U. ; Ver Loren van Themaat, E. ; Van der Does, H.C. ; Hacquard, S. ; Stuber, K. ; Will, I. ; Schmalenbach, W. ; Schmelzer, E. ; O'Connell, R.J. 2012. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. **PLoS Pathogens** 8(4): e1002643.

Kushalappa, A.C. 1989. Biology and Epidemiology. In: Kushalappa AC, Eskes AB eds. Coffee rust: epidemiology, resistance and management. Boca Raton: CRC Press, 13-43.

Lindgren, P.B. 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. **Annual Review Phytopathology**, 35: 129–152

Maia, T.A. 2013. Identificação e análise funcional de efetores de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro. Tese doutoral. Universidade Federal de Viçosa. Pp 124.

Maia, T.A.; Zambolim, E.M.; Caixeta, E.T.; Mizubuti, E. S.; Zambolim, L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathology**. 42:533-542.

McDonald; B.A.; Linde, C. 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica** 124: 163–180.

- Mendgen, K.; Hahn, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science** 7(8): 352-356.
- MAPA. Ministerio da Agricultura, Abastecimento e Pecuaria. Disponivel em <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>. Acesso: Novembro, 2014.
- Mayne, W.W. 1932. Physiological specialization of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Nature* 129: 510.
- Moreno, R.; Alvarado, A.G. 2000. La variedad Colombia; veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. *Boletín Técnico* (22): 1-32.
- Noronha-Wagner, M.; Bettencourt, A. 1967. Genetic study of the resistance of *coffea* spp. to leaf rust: identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany** 45: 2021-2131.
- Nunes, C.C. ; Maffia, L.A. ; Mizubuti, E.S. ; Brommonschenkel, S.H. ; Silva, J.C. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and convencional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology** 38: 445-452.
- Oliveira, J.R.; Romeiro, R.S.; Muchovej, J.J. 1991. Population tendencies of *Pseudomonas cichorii* and *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in young and mature coffee leaves. **Journal Phytopathology** 131: 210-214.
- Panstruga, R.; Dodds, P.N. 2009. Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. **Science** 324(5928): 748-750.
- Petre, B.; Kamoun, S. 2014. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? **PLoS Biology** 12 (2) 1-7.
- Plantwise. Plantwise Knowledge Bank Disponivel em <http://www.plantwise.org/>. Acesso: Novembro, 2014.
- Rajendren, R.B. 1967. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. **Nature** 213: 105-106.
- Ramiro, D.A.; Escoube, J.; Petitot, A.S.; Nicole, M.; Maluf, M.P.; Fernandez, D. 2009. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology** 58: 944-955.
- Richter, T.E.; Ronald, P.C. 2000. The evolution of disease resistance. **Plant Molecular Biology** 42: 195-204.
- Rodrigues, C.J.; Bettencourt, A.J. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology** 13: 49-70.

- Rodrigues, C.J. 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. **Fitopatologia Brasileira** 15: 5-9.
- Romero, G.; Vásquez, L.M.; Lashermes, P.; Herrera, J.C. 2014. Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). **Plant Breeding**, 133(1): 121-129.
- Schieber, E.; Zentmyer, G.A. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. **Plant Disease** 68: 89-93.
- Sera, G.H.; Sera, T.; Ito, D.S.; Azevedo, J. A.; Mata, J.S.; Doi, D.S.; Ribeiro, C. 2007. Resistance to leaf rust in coffee carrying SH3 gene and others SH genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50: 753-757.
- Sera, T.; Sera, G.H.; Cardoso, R.M.; Androcioli filho, A.; Ito, D.S. 2008. IPR 98: Rust-resistant dwarf arabica coffee cultivar for dense spacing. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. 8: 242-244.
- Sera, T.; Sera, G.H. 2013. IPR 107 Dwarf arabic coffee cultivar with resistance to coffee leaf rust. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 13: 215-217.
- Sharma, T.R.; Alok Das, S.P.; Kumar, M.L. 2009. Lodha Resistance Gene Analogues as a Tool for Rapid Identification and Cloning of Disease Resistance Genes in Plants 3 A **Review Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology** 18 (1): 1-11.
- Sharma, S. ; Sharma, S. ; Hirabuchi, A. ; Yoshida, K. ; Fujisaki, K. ; Ito, A. ; Uemura, A. ; Terauchi, R.; Kamoun, S. ; Sohn, K.H. ; Jones, J.D.G. ; Saitoh, H. 2013. Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells. **The Plant Journal** 74: 701-712.
- SIECA. Secretaria de Integración Económica Centroamericana. Disponível em <http://www.sieca.int/Portal/PortalBusqueda.aspx?q=cafe>. Acesso: Novembro 2014.
- Silva, M.C.; Nicole, M.; Guerra-Guimarães, L.; Rodrigues Jr, C.J. 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistance coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60: 169-183.
- Silva, M.C.; Várzea, M.P.; Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H.G.; Fernandes, D.; Petitot, A.S.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Nicole, M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal Plant Physiology** 18: 119-147.
- Sohn, K.H.; Lei, R.; Nemri, A.; Jones, J.D. 2007. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 19: 4077- 4090.

- Stergiopoulos, I.; De Wit, P.J. 2009. Fungal effector proteins. **Annual Review of Phytopathology** 47: 233-263.
- Talhinhas, P.; Azinheira, H.; Vieira, B.; Loureiro, A.; Tavares, S.; Batista, D. 2014. Overview of the functional virulent genome of the coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* with an emphasis on early stages of infection. **Front Plant Sci.** 5:88. doi:10.3389/fpls.2014.00088
- Thomas, W.J.; Thireault, C.A.; Kimbrel, J.A.; Chang, J.H. 2009. Recombineering and stable integration of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp/hrc cluster into the genome of the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. **The Plant Journal** 60(5): 919-928.
- Upadhyaya, N.M. ; Mago, R. ; Staskawicz, B.J. ; Ayliffe, M.A. ; Ellis, J.G. ; Dodds, P.N. 2014. A Bacterial Type III Secretion Assay for Delivery of Fungal Effector Proteins into Wheat. **Molecular Plant Microbe Interactions** 27 (3): 255–264.
- Van der Plank, J.E. 1968. Disease Resistance in Plants. **Academic Press**, New York, 1968. 210 p.
- Van der Vossen, H.A. 2005. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. Pp 1-29.
- Várzea, M.P.; Marques, D.V. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim, L.; Zambolim, E.M.; Várzea, M.P. eds. Durable Resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. Pp 53-74.
- Vleeshouwers, V.G.; Driesprong, J.D.; Kamphuis, L.G.; Torto-Alalibo, T.; Van't Slot, K.A.; Govers, F.; Visser, R.G.; Jacobsen, E.; Kamoun, S. 2006. Agroinfection-based high-throughput screening reveals specific recognition of INF elicitors in *Solanum*. **Molecular Plant Pathology** 7(6): 499-510.
- Wellman, F.L. 1961. Coffee. Botany, cultivation and utilization. London, (Inglaterra), **World Crops Books**, 488 p.
- 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. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology** 77: 235-247. doi: 10.1101/sqb.2012.77.015933
- Zambolim, L.; Vale, F.X.; Pereira, A.A.; Chaves, G.M. 1997. Controle de doenças de Plantas. Brasília-DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Pp. 83-179.
- Zambolim, L.; Zambolim, E.M.; Vale, F.X.; Pereira, A.A.; Sakyama, N.S.; Caixeta, E.T. 2005. Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil - Physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim, L.; M, Z.E.; Várzea, M.P. eds.

Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. Pp. 75-98

Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. **Plant Biology*** 12:414-420.

Zipfel, C.; Felix, G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes .Review. *Curr Opin **Plant Biology*** 8(4):353-60.

Van Boxtel, J.; Berthouly, M.; Carasco, C.; Dufuor, M.; Eskes, A. Transient expression of b-glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. ***Plant Cell Reports*** 14: 748-752.