

ROSEMEIRE ALVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE RAÇAS FISIOLÓGICAS E ANÁLISE DE
PROTEÍNAS CANDIDATAS A EFETORAS EM POPULAÇÃO DE *Hemileia*
vastatrix NO BRASIL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

S586c
2017
Silva, Rosemeire Alves, 1984-
Caracterização de raças fisiológicas e análise de proteínas
candidatas a efetoras em população de *Hemileia vastatrix* no
Brasil / Rosemeire Alves Silva. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 75f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Laércio Zambolim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

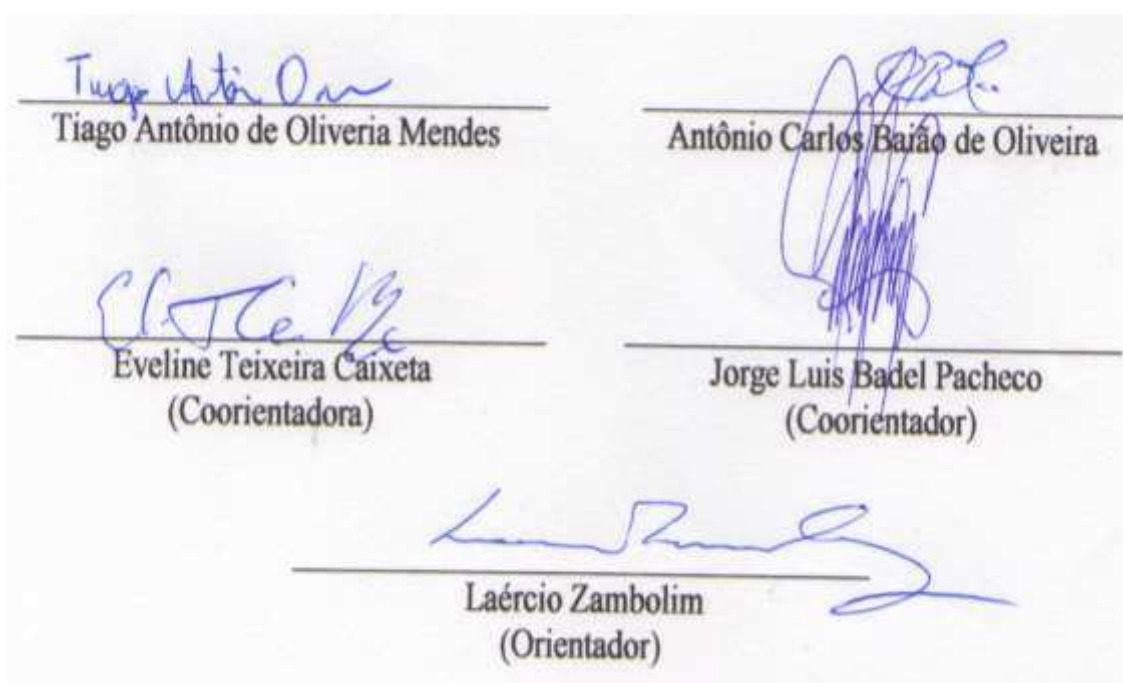
1. Café - Doenças e pragas. 2. *Hemileia vastatrix*. 3. Genes.
4. Fungos fitopatogênicos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22 ed. 633.73

ROSEMEIRE ALVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE RAÇAS FISIOLÓGICAS E ANÁLISE DE
PROTEÍNAS CANDIDATAS A EFETORAS EM POPULAÇÃO DE *Hemileia*
vastatrix NO BRASIL**

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



The image shows the signatures of four members of the thesis committee, each with their name and role printed below a horizontal line. The signatures are in blue ink.

Top left: *Tiago Antônio de Oliveria Mendes*
Tiago Antônio de Oliveria Mendes

Top right: *Antônio Carlos Baião de Oliveira*
Antônio Carlos Baião de Oliveira

Middle left: *Eveline Teixeira Caixeta*
Eveline Teixeira Caixeta
(Coorientadora)

Middle right: *Jorge Luis Badel Pacheco*
Jorge Luis Badel Pacheco
(Coorientador)

Bottom center: *Laércio Zambolim*
Laércio Zambolim
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida e pela força nos momentos mais difíceis da caminhada.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio diários, sem os quais eu não chegaria até aqui, e a meus irmãos, pelo apoio mesmo distante.

À grande amiga Aline Marques, Priscila Alves e Charlene Neves, pelas palavras de incentivo nas horas de angústia e pela companhia e dos conselhos nos momentos mais difíceis.

E a amiga Francine pela paciência, ajuda e compreensão em dividir o mesmo espaço durante esse tempo. Obrigada!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

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

Ao professor Dr. Laércio Zambolim, pela orientação e confiança em mim depositada.

À Dra. Eveline Caixeta, pela valiosa colaboração dada ao trabalho, estando presente a todo momento.

Ao Dr. Jorge Luis Badel Pacheco, cuja ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Antônio Baião, pela disponibilidade em participar da banca.

Ao Dr. Tiago Antonio de Oliveira Mendes, pela disponibilidade em participar da banca

Aos Pós doutorando Hέλvio e Douglas, pela valiosa ajuda.

A todos os funcionários do viveiro do café, em especial ao Sr. Geraldo e Sr. Mario, pelo apoio amizade e pelos valiosos ensinamentos.

Ao meu namorado Luis Roberto da Silva Albino, por estar sempre ao meu lado, me dando a força necessária para não desanimar diante das dificuldades. E compreender minhas preocupações e vibrar com minhas conquistas.

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Rosemeire Alves da Silva, filha de Jesus Alves e Maria Aparecida da Silva Alves, nasceu no dia dezoito de outubro de 1984, em Pitangueiras, SP.

Em março de 2007, ingressou no curso de Ciências Biológicas, na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ituverava-SP, graduando-se em Licenciatura em Ciências Biológicas em janeiro de 2011.

Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular de Plantas. Obteve o título de Magister Scientiae em julho de 2013.

Em agosto de 2013, iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFV, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Hemileia vastatrix</i>	3
2.2. Herança da resistência do cafeeiro	4
2.3. Mecanismo de defesa das plantas.....	5
2.4. Imunidade desencadeada por efetores (ETI).....	7
REFERÊNCIA	9
CAPÍTULO I	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Origem geográfica, armazenamento e inoculação	17
2.2. Caracterização das raças fisiológicas dos isolados de <i>Hemileia vastatrix</i>	20
3. RESULTADOS	21
4. DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO II	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. População de <i>Hemileia vastatrix</i>	37
2.2. Extração DNA genômico	38
2.3. Genes candidatos a efetor selecionados	38
2.4. Reação em Cadeia Polimerase (PCR)	39
2.5. Extração de RNA total de tecido inoculado	39
2.6. Germinação dos urediniósporos de <i>H. vastatrix</i> e extração de RNA.	40
2.7. Amplificação e sequenciamento de candidatos a efetores de <i>H. vastatrix</i>	40
2.8. Análises de expressão gênica	41
3. RESULTADOS	41
4. DISCUSSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	56
CAPÍTULO III	60
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1. População <i>Hemileia vastatrix</i>	63

2.2.	Extração de DNA genômico de isolados de <i>H. vastatrix</i>	64
2.3.	Reação em cadeia Polimerase (PCR).....	65
2.4.	Análises filogenéticas	66
3.	RESULTADOS	66
4.	DISCUSSÃO	71
5.	CONCLUSÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS.....	74

RESUMO

SILVA, Rosemeire Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Caracterização de raças fisiológicas e análise de proteínas candidatas a efetoras em população de *Hemileia vastatrix* no Brasil.** Orientador: Laércio Zambolim. Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Jorge Luis Badel Pacheco.

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, é considerada a principal doença da cultura. O fungo está amplamente distribuído nas regiões produtoras de café, causando severos danos econômicos. Novas raças fisiológicas de *H. vastatrix* tem surgido, com frequência em todo mundo, infectando algumas cultivares de café lançadas comercialmente como resistentes à ferrugem. Dessa forma, a obtenção de cafeeiros resistentes tem sido um desafio devido ao alto potencial adaptativo do fungo e tem se tornado cada vez mais difícil a caracterização dos patótipos por meio da coleção de cafeeiros diferenciadores de raça. Além disso, as informações acerca da interação de cafeeiros com as raças existentes são escassas, embora o processo infeccioso de *H. vastatrix* seja bem estudado. Estudos genômicos estão ajudando no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de interação entre planta e patógeno e no desenvolvimento de técnicas moleculares para a identificação de isolados. Nosso objetivo foi caracterizar as raças de *H. vastatrix* encontradas nas principais regiões produtoras de café do Brasil, e estudar as proteínas candidatas a efetoras preditas para *H. vastatrix* que possam contribuir para patogenicidade nas diferentes raças do fungo. Foram utilizados 56 isolados monopustular coletados de diferentes espécies de café, *Coffea canephora*, *C. arabica* e Híbrido de Timor (*C. canephora* x *C. arabica*) e multiplicados em cafeeiro suscetível *C. arabica* variedade Caturra. Cada isolado foi inoculado em cafeeiros que compõe a série diferenciadora de raças, com três repetições. O DNA dos 56 isolados monopustulares foram extraídos para os estudos genômico. Foram utilizadas 47 combinações de *primer* para amplificar genes de candidatos a efetores. Sete genes foram amplificados, sequenciados e tiveram sua expressão validada em cafeeiros resistente e suscetível. As sequências obtidas foram alinhadas para os 46 isolados, usando o programa DNA Baser. Estudo de domínio conservado foram realizados no programa Pfam e a categorização das proteínas no Blast2GO. O alinhamento das sequências de nucleotídeos, proteínas e agrupamento dos isolados foi feito no programa Clustalw e as diferença de nucleotídeo foi analisada no Weblogo. Os dados obtidos foram usados para o estudo de diversidade. Por meio da inoculação na série diferenciada, foram identificadas sete raças,

sendo cinco já descritas no Brasil e duas pela primeira vez (raça XXIX e XXX). Não foi possível caracterizar 15 combinações dos genes de virulência, sendo assim consideradas novas raças. A análise da coleção de isolados permitiu inferir a presença de pelo menos seis novos genes na série diferenciadora, o que possibilitou diferenciar dois isolados descritos como raças III. Na análise genômica, os 47 genes candidatos a efetores estudados se mostraram conservados em todos os isolados e estão ligados a 15 processos biológicos do desenvolvimento do fungo. Foram identificados 14 domínios nas proteínas provenientes desses genes. Para os sete genes sequenciados nos diferentes isolados, observou-se diferença na sequência dos nucleotídeos e presença de indivíduos heterozigoto e homozigoto. Com análise de diversidade foi possível discriminar os indivíduos, sendo o isolado Hv-09 o mais divergente. As informações geradas nesta pesquisa poderão ampliar o entendimento da interação entre *H. vastatrix* e o cafeeiro. O conhecimento dos genes que estão envolvidos no processo infeccioso auxiliará o entendimento dos mecanismos moleculares que levam à suplantação da resistência por novas raças do fungo.

ABSTRACT

SILVA, Rosemeire Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Characterization of physiological races and analysis of effector candidate proteins in the population of *Hemileia vastatrix* in Brazil.** Adviser: Laércio Zambolim. Co-Advisers: Eveline Teixeira Caixeta and Jorge Luis Badel Pacheco.

Coffee rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, is considered the main disease of the crop. The fungus is widely distributed in the coffee producing regions, causing severe economic damage. New physiological races of *H. vastatrix* have arisen, often all over the world, infecting some commercially released coffee cultivars as resistant to rust. Thus, obtaining resistant *coffee* trees has been a challenge due to the high adaptive potential of the fungus and it has become increasingly difficult to characterize the pathotypes through the collection of coffee races. In addition, information on the interaction of coffee trees with the existing races is scarce, although the infectious process of *H. vastatrix* is well studied. Genomic studies are helping to understand the molecular mechanisms involved in the process of interaction between plant and pathogen and in the development of molecular techniques for the identification of isolates. Our objective was to characterize the *H. vastatrix* race found in the main coffee producing regions of Brazil and to study the effector candidate proteins predicted for *H. vastatrix* that may contribute to pathogenicity in the different fungus races. Fifty six monopustular isolates collected from different coffee species, *Coffea canephora*, *C. arabica* and Hybrid of Timor (*C. canephora* x *C. arabica*) were used and multiplied in susceptible coffee *C. arabica* variety Caturra. Each isolate was inoculated in coffee plants that make up the differentiating series of races, with three replicates. The DNA of the 56 monopustular isolates were extracted for genomic studies. We used 47 primer combinations to amplify effector candidate genes. Seven genes were amplified, sequenced and had their validated expression in resistant and susceptible coffee trees. The sequences obtained were aligned for the 46 isolates using the DNA Baser program. A conserved domain study was performed on the Pfam program and the protein categorization in Blast2GO. The alignment of the nucleotide sequences, proteins and clustering of the isolates was done in the Clustalw program and the nucleotide differences were analyzed in Weblogo. The data obtained were used for the study of diversity. Through inoculation in the differentiated series, seven races were identified, five of which were already described in Brazil and two for the first time (races XXIX and XXX). It was not possible to characterize 15

combinations of the virulence genes, thus being considered new races. The analysis of the collection of isolates allowed to infer the presence of at least six new genes in the differentiator series, which made it possible to differentiate two isolates described as breeds III. In genomic analysis, the 47 candidate effector genes studied have been conserved in all isolates and are linked to 15 biological processes of fungus development. 14 domains were identified in proteins from these genes. For the seven genes sequenced in the different isolates, we observed a difference in nucleotide sequence and presence of heterozygous and homozygous individuals. With diversity analysis it was possible to discriminate individuals, being the Hv-09 isolate the most divergent. The information generated in this research may broaden the understanding of the interaction between *H. vastatrix* and the *coffee* tree. The knowledge of the genes that are involved in the infectious process will help the understanding of the molecular mechanisms that lead to the supplanting of resistance by new races of the fungus.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O parasita obrigatório *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br., pertence a classe Pucciniomycete, sendo responsável por causar a ferrugem alaranjada do cafeeiro. A estrutura de infecção do patógeno é o urediniósporo que após germinar produz tubo germinativo que penetra nos tecidos foliares através dos estômatos (Rayner., 1961). Os sintomas e sinais da doença são observados na face inferior das folhas, iniciando-se com manchas pequenas, de 1 a 3 mm de diâmetro, e coloração amarelo-pálida, que pode atingir 2 a 3 cm. Essa coloração pode evoluir para amarelo-alaranjado com aspecto pulverulento devido à produção de urediniosporos. A ferrugem pode ocasionar queda prematura de folhas, prejudicando o desenvolvimento das plantas jovens e comprometendo a produção (Matiello et al., 2002; Fazuoli et al., 2007). Dentre as doenças que infectam o cafeeiro, a ferrugem é considerada o principal problema da cultura, podendo, em condições favoráveis e na ausência de controle químico, causar perdas na ordem de 35 a 50% da produção (Zambolim et al., 2005).

A principal medida de controle da ferrugem do cafeeiro é o emprego de cultivares resistentes, um dos principais desafios para os programas de melhoramento do cafeeiro visando a resistência a ferrugem é a alta variabilidade genética do patógeno. O surgimento de novas raças de *H. vastatrix*, assim como a ocorrência de raças com genes de virulência complexos revelam o grande potencial evolutivo das populações do fungo (Várzea & Marques, 2005). Desse modo, a medida mais eficaz e ambientalmente correta para o controle de doenças, de modo geral, é o desenvolvimento de plantas resistentes. Esta prática tem sido utilizada pelos melhoristas há mais de 100 anos, e sua eficácia despertou o interesse em estudos genéticos que definiram a teoria gene-a-gene em relação aos genes de resistência do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno (Flor., 1971).

Em fungos de um modo geral, raças fisiológicas ou patótipos são comuns, ou seja, variantes do patógeno com diferentes combinações de genes de virulência e, conseqüentemente, diferentes capacidades para infectar distintos genótipos de uma determinada espécie hospedeira (Rodrigues Jr., 2002). Tradicionalmente, a variabilidade fisiológica em *H. vastatrix* tem sido determinada pelo padrão de infecção composta por 24 clones de cafeeiros diferenciadores de raças (Várzea & Marques., 2005).

Os primeiros estudos sobre a especialização fisiológica do patógeno foram realizados na Índia, na década de 1930 onde foram identificadas quatro raças fisiológicas do fungo (Mayne 1932). Após a criação do Centro de Investigação das Ferrugens do

Cafeeiro (CIFC) em Oeiras, Portugal, em 1955, essas pesquisas foram intensificadas com a análise de amostras de urediniosporos provenientes de diferentes países (Rodrigues & Bettencourt., 1975). No mundo até o momento já foram caracterizadas, mais 50 raças de *H. vastatrix* (Gichuru et al., 2012; Várzea & Marques., 2005, Talhinhos et al., 20017). No Brasil, 15 raças fisiológicas do fungo (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII, XXXVII) foram identificadas (Zambolim., 2016), sendo a raça II a de maior frequência (Zambolim et al., 2005). A ocorrência de raças com amplo espectro de virulência, como a raça XXXVII (v2,5,6,7,9) (Cabral et al., 2009), e a alta diversidade genética das populações do patógeno (Nunes et al., 2009; Maia et al., 2013) representam um grande desafio aos melhoristas na busca por cultivares com resistência durável.

O surgimento de novas raças e isolados mais agressivos em patógenos de plantas ameaçam a agricultura em todo o mundo. Como se observou com o fungo causador da ferrugem da haste do trigo e as novas epidemias da ferrugem do cafeeiro principalmente na América Latina e Central, que nos últimos anos tem enfrentado fortes epidemias da doença (Aime et al., 2006; Avelino et al., 2015). Devido à variabilidade fisiológica de *H. vastatrix* ser determinada pelo padrão de infecção em clones de cafeeiros diferenciadores de raças, o número de séries diferenciadores existentes não está sendo suficiente para a caracterização de alguns patótipos com amplo espectro de virulência. Pelo menos mais de 10 isolado não foram diferenciados pelas plantas diferenciadoras do CIFC, e outras raças desconhecidas também foram detectados em vários países produtores de café (Gouveia et al., 2005).

O estudo da biologia de patógenos obrigatórios como fungos causadores de ferrugem é particularmente desafiador e precisa de investimentos substanciais, dado ao fato de que um grande conjunto de plantas diferenciadoras tem que ser empregado para a classificação das raças. O desenvolvimento de novas ferramentas para a identificação de isolados é fundamental para estudar a biologia destes importantes agentes patogênicos de plantas, e a genômica pode oferecer tais ferramentas. Genes de *Hemileia vastatrix* diferencialmente expressos em urediniosporos, apressórios e haustórios já foram identificados, mas apenas o gene HVEC-016 foi identificado até o momento (Fernandez et al., 2012; Talhinhos et al., 2014; Maia et al., 2016).

A descoberta dos produtos determinantes de virulência secretados por patógenos de plantas foi possível através da análise genômica. Proteínas secretadas têm sido associadas com a virulência de fungos fitopatogênicos (Spanu., 2012) e muitos têm sido

descritos em *Melampsora ssp.* (Joly et al., 2010; Hacquard et al., 2012), *Puccinia striiformis* (Cantu et al., 2011, 2013), *P. graminis* (Duplessis et al., 2011), e *Hemileia vastatrix* (Fernandes et al., 2012). Assim, a descoberta dos genes de proteínas secretadas é fundamental para desvendar os mecanismos de patogenicidade anteriormente desconhecido e demonstrar a sua função no papel decisivo do processo infeccioso, que operam em fungos biotróficos (Sauders et al., 2012). Portanto, tais genes poderiam ser utilizados para distinguir as raças existentes de *Hemileia vastatrix* e também fornecer informações para serem utilizadas pelos programas de melhoramento do cafeeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Hemileia vastatrix*

O gênero *Hemileia* foi descrito pela primeira vez por Berkeley e Broome, no Ceilão (atualmente Sri Lanka), em 1869, recebendo esta denominação devido à morfologia dos urediniosporos, que apresentam uma face lisa e outra equinulada (Rodrigues., 1990). O gênero engloba cerca de 50 espécies, provenientes de zonas tropicais, que infectam predominantemente rubiáceas (Rodrigues Jr., 1990). São apenas duas as espécies com importância econômica, *Hemileia coffeicola* e *H. vastatrix*, ambas infectando plantas do gênero *Coffea* de elevado valor econômico (Rodrigues Jr. & Bettencourt., 1975; McGrain & Hennen., 1984).

Das duas espécies referidas, a mais importante é *H. vastatrix*, uma vez que se encontra disseminada por todos os países produtores de café e causa grandes prejuízos. Nas Américas, o primeiro relato da doença foi no Brasil, em janeiro de 1970, no Estado da Bahia (Chaves et al., 1970). Dez anos após a sua descoberta no Brasil, a ferrugem do cafeeiro já havia se disseminado por quase todos os países produtores de café da América Latina (Schieber & Zentmyer., 1984). Acredita-se que os urediniosporos do fungo foram trazidos para o Hemisfério oeste por correntes de ventos vindos da Angola (Bowden et al., 1971), ou introduzidos acidentalmente em plantas, bagagens ou roupas contaminadas (Kushalappa., 1989).

H vastatrix é classificado no filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Incertae sedis (indexfungorum, 2017). Os fungos causadores de ferrugens produzem até cinco tipos de estruturas de frutificação, cada uma delas correspondendo a uma fase do ciclo de vida do patógeno (Kolmer et al., 2007). A ferrugem do cafeeiro é classificada como microcíclica, pois seu ciclo biológico apresenta apenas as fases de urédia, télia e basídia (Coutinho et al., 1995; Fernandes et al., 2009).

Na fase uredinial ocorre a produção dos urediniósporos dicarióticos, que representam a fase repetitiva da ferrugem, responsáveis pelo aumento da doença em condições de ambiente favoráveis (Agrios., 2005). Os teliósporos são formados ocasionalmente, aparecendo excepcionalmente em condições de chuva moderada e baixas temperaturas (Coutinho et al., 1995; Fernandes et al., 2009). Nos teliósporos ocorre a cariogamia, e o núcleo diplóide migra para o promicélio, onde a meiose é completada. Em seguida, ocorre a formação de quatro células no promicélio, cada uma sustentando terminalmente um basidiósporo. O núcleo haplóide de cada célula do promicélio migra para dentro dos basidiósporos (Vishveshwara & Nag Raj., 1960). Todas as tentativas envolvendo inoculação de cafeeiros com basidiósporos não resultaram em infecção, e nenhum hospedeiro alternativo suscetível para este tipo de propágulo sustentou as fases de pécnio e écio no ciclo de vida da ferrugem do cafeeiro (Gopalkrishnan., 1951).

Teoricamente, *H. vastatrix* seria um fungo estritamente clonal, pois as combinações alélicas formadas durante a meiose, por recombinação gênica, não se estabelecem na população do patógeno, uma vez que os basidiósporos não são infectivos. Porém, estudos sobre o comportamento nuclear, realizados na década de 1960, levantaram a possibilidade de ocorrência da cariogamia e meiose nos urediniósporos (Rajendren., 1967). Esse fenômeno, que faz com que os urediniósporos se comportem geneticamente como teliósporo, levou Rajendren (1967) a denominar o urediniósporo de *H. vastatrix* como “teliósporo-uredinióide”, e este fenômeno ficou conhecido como “fenômeno-Kamat” (Rajendren., 1967). Apesar de muitos pesquisadores terem ignorado essa descoberta por vários anos, um estudo no Brasil, de citometria de imagem do conteúdo de DNA revelou a presença de um tipo inédito de reprodução sexual oculta dentro dos esporos assexuais de *H. vastatrix*, onde comprovam a hipótese de que cariogamia, seguida de haploidização, pode ocorrer nos urediniósporos e este evento foi denominado de criptossexualidade (Carvalho et al., 2011). Segundo os autores, esse tipo de reprodução poderia explicar o surgimento frequente e rápido de novas raças fisiológicas de *H. vastatrix*.

2.2. Herança da resistência do cafeeiro

As duas espécies de café exploradas comercialmente são *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta), representando, respectivamente, 75 e 25% da produção nacional (MAPA., 2017). *C. arabica* é uma espécie tetraploide, com 90% de autofecundação, enquanto as demais espécies são diploides, autoincompatíveis e de fecundação cruzada (Fazuoli., 2006). Até o momento, foram identificados nove genes

dominantes de resistência em plantas de café de diferentes espécies, caracterizados pela sigla S_H (Noronha et al., 1967; Bettencourt et al., 1971; Bettencourt et al., 1988). Esses genes de resistência foram encontrados em *C. arabica* (S_{H1} , 2, 4, 5), *C. canephora* (S_{H6} , 7, 8 e 9) e *C. liberica* (S_{H3}). Os genes S_{H6} , 7, 8 e 9 também foram encontrados em derivados do Híbrido de Timor, um híbrido natural proveniente do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora*, o que indica que esses genes são originados do café Robusta (*C. canephora*) (Rodrigues et al., 1975; Bettencourt et al., 1988). Além desses, foram detectados pelo menos mais dois genes de resistência ainda não caracterizados, que, isoladamente ou associados aos genes S_{H1} - S_{H9} , condicionam resistência a mais de 40 raças fisiológicas de ferrugem (Várzea et al., 2005).

Estudos realizados no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, têm mostrado que a teoria gene-a-gene também se aplica à interação *Hemileia-Coffea* (Noronha et al., 1967), onde a resistência à ferrugem é condicionada por pelo menos nove genes dominantes (S_{H1} - S_{H9}), sozinhos ou associados (Rodrigues & Bettencourt., 1975; Bettencourt & Rodrigues., 1988). Assim, pode-se inferir a existência de pelo menos nove genes de avirulência em *H. vastatrix*.

2.3. Mecanismo de defesa das plantas

Fitopatógenos possuem diversas estratégias para infectar o hospedeiro. Independentemente da estratégia adaptativa do patógeno, ele secreta proteínas efetoras com a função de suprimir as repostas de defesa da planta, para promover sua virulência e assim possibilitar a colonização dos tecidos. Por outro lado, em resposta à infecção, as plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, mecanismos de defesa inato para restringir a proliferação de patógenos em seus tecidos (Jones et al., 2006; Dodds et al., 2010).

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

Na primeira linha de defesa das plantas (PTI) utiliza proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática que reconhecem padrões moleculares conservados associados a patógenos, denominados PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) (Zipfel., 2008). Os PAMPs geralmente possuem funções estruturais, como a quitina e a flagelina (Jones & Dangl., 2006; de Wit., 2007). A quitina é o principal componente estrutural de parede celular de fungos (de Wit et al., 2009; Stergiopoulos & de Wit.,

2009). Embora a PTI seja suficiente para impedir a infecção, muitos patógenos adquiriram habilidade de produzir efetores que a suprimem e, portanto, contribuem para a virulência do patógeno, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (Win et al., 2012). Em contrapartida, uma segunda linha de defesa (ETI) foi desenvolvida pelas plantas para detectar esses efetores produzidos pelos patógenos (Jones et al., 2006; Dodds et al., 2010).

A imunidade desencadeada por efetores (ETI) utiliza receptores intracelulares com domínios NB (*nucleotide-binding*) e LRR (*leucine-rich repeat*), que reconhecem efetores (proteínas *Avr*) do patógeno. As proteínas NB-LRR são codificadas por genes de resistência (*R*), sendo, conseqüentemente, denominadas proteínas *R*, o reconhecimento dos efetores do patógeno pelas proteínas *R* ativa vias de sinalização celular que desencadeiam a morte celular programada no sítio de infecção, o que conduz ao colapso do tecido e à inibição completa da proliferação do patógeno. Esta forma especializada de morte celular é conhecida como reação de hipersensibilidade (HR) (Heath., 2000).

As proteínas NB-LRR podem reconhecer efetores diretamente pela associação física, ou indiretamente por meio de uma proteína acessória, que é o alvo do efector no hospedeiro. Em geral, o reconhecimento direto, também é denominado modelo ligante-receptor (Stergiopoulos & de Wit., 2009). Um segundo modelo de reconhecimento é conhecido como “modelo guarda”, que propõe um reconhecimento indireto entre as proteínas codificadas pelo gene *R* e *avr* (Stergiopoulos & de Wit., 2009). De acordo com este modelo, as proteínas *R* atuam monitorando modificações nas proteínas-alvos dos efetores do patógeno. Estudos mostram que este modelo se aplica à maioria dos estudos de interação já descritos (Rooney et al., 2005).

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

2.4. Imunidade desencadeada por efetores (ETI)

Efetores são definidos como moléculas secretadas por organismos associados às plantas que modificam a estrutura e função da célula do hospedeiro (Hogenhout et al., 2009). São moléculas produzidas pelo patógeno que têm um efeito específico sobre um ou mais genótipos de uma planta hospedeira. No entanto, efetores têm sido mostrados como indutores ou supressores da resposta de defesa. Dessa forma, a utilização do termo estende-se para englobar os padrões moleculares associado ao patógeno (PAMPs), e outros indutores, como os produtos do gene de avirulência (Avr) de patógenos biotróficos, e as toxinas específicas de patógenos necrotróficos (Vleeshouwers et al., 2014).

Devido a capacidade adaptativa dos patógenos, que são capazes de secretar um arsenal de proteínas que podem suprimir PTI, resultando em suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS, *effector-triggered susceptibility*) (Birch et al., 2008). No entanto, plantas podem apresentar proteínas de resistência (NB-LRR) que reconhecem estes efetores resultando em defesa (Howden & Huitema, 2012). Enquanto patógenos desenvolvem novos efetores para manipular os processos de defesa das plantas, estas desenvolvem novas proteínas *R*, o que sugere uma constante e indefinida “corrida armamentista” na interação planta-patógeno (Coll et al., 2011).

Uma das estratégias do patógeno em superar a segunda linha de defesa do hospedeiro (ETI) podem ser devidos as mutações e aquisição de novos efetores, seja pela perda ou pela diversificação do seu sítio de reconhecimento pela proteína *R*.

Efetores são fatores de virulência, mas cada um contribuindo parcialmente para a virulência final. Efetores independentes podem atuar de forma redundante, podendo alterar uma mesma via de sinalização do hospedeiro. Portanto, os genes efetores podem ser perdidos sem causar impacto significativo na virulência do patógeno. Exceções a este princípio são os “efetores fundamentais”, definidos operacionalmente por sua ampla distribuição na população de um determinado patógeno e sua contribuição para a virulência do mesmo (Dangl *et al.*, 2013).

As ferrugens, assim como os outros patógenos biotróficos, formam haustórios no mesófilo das células de seus hospedeiros durante o processo de infecção. Os haustórios facilitam a entrega dos efetores na matriz extra-haustorial de onde muitos serão translocados para outros compartimentos subcelulares (Win et al., 2012).

De acordo com o local de atuação, os efetores podem ser divididos em dois grupos: efetores extracelulares e efetores citoplasmáticos. Os efetores extracelulares, também, conhecidos como efetores apoplásticos são secretados pelos patógenos, durante a

infecção e acumulam nos espaços intercelulares. Os efetores citoplasmáticos são os que podem se translocar através da membrana celular e têm contato direto com compartimentos subcelulares ou organelas (DE Wit et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre como ocorre esse processo de translocação, sendo necessários métodos que permitam a detecção e visualização desse tráfego dos efetores até o local de atuação (Petre et al., 2014)

Até o momento, seis proteínas efetoras foram caracterizadas em fungos causadores de ferrugem, são todas proteínas secretadas, expressas em haustórios e sem função bioquímica claramente identificada (Petre et al., 2014). Quatro proteínas efetoras com atividade de avirulência em *M. lini* (AvrL567, AvrM, AvrP123 e AvrP4) (Dodds et al., 2004; Catanzariti et al., 2006). A expressão e secreção dessas proteínas no haustório do fungo concomitantemente com a indução de HR nas plantas indicam que os haustórios possuem papel crucial na liberação de proteínas efetoras dentro da célula da planta (Catanzariti et al., 2007). A proteína AvrP123 possui similaridade a inibidores de proteases, o que evidencia o papel dessa proteína na patogênese de *M. lini*, por meio da inibição de proteases do hospedeiro (Catanzariti et al., 2006). Segundo Rafiqi et al. (2012), a proteína AvrP123 acumula-se no núcleo da célula, podendo manipular a expressão gênica do hospedeiro durante a infecção. A proteína RTP1 (*Rust Transferred Protein*) de *Uromyces fabae* (Uf-RTP1) e seu homólogo em *Uromyces striatus* (Us-RTP1) são expressos nos haustórios e translocados para o citoplasma da célula vegetal (Pretsch et al., 2013).

Até recentemente, muito pouco se sabia sobre a biologia dos efetores e principalmente sobre as bases moleculares da interação planta-patógeno. O conhecimento era limitado a estruturas de infecção especializadas, sintomatologia, secreção de enzimas hidrolíticas e toxinas. Com o avanço de técnicas moleculares e sequenciamento, muita informação tem sido gerada e a fitopatologia está avançando no entendimento das estratégias de infecção dos patógenos e mecanismos de defesa das plantas

REFERÊNCIA

- AGRIOS GN. 2005. **Plant Pathology**: 5ª edição, Elsevier pp 562-580.
- AS-SADI F, CARRERE S, GASCUEL Q, HOURLIER T, RENGEL D, LE PASLIER MC, BORDAT A, BONIFACE MC, BRUNEL D, GOUZY J, GODIARD L, VINCOURT P. 2011. Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. **BMC Genomics** 12:498.
- AVELINO, J., CRISTANCHO, M., GEORGIU, S., IMBACH, P., AGUILAR, L., BORNEMANN, G., LADERACH, 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 Sec.** 7, 303–321.
- AIME, C., MATHENY, PB., HENK, D. A., FRIEDERS, EM., NILSON, RH., PIEPENGRING, M. 2006. An overview of the higher-level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. **Mycologia** 98:896-905.
- BENSON, DA., KARCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, DJ., OSTELL, J., WHEELER, DL. 2007. GenBank. **Nucleic Acids Research**. v.35, p.21-25.
- BETTENCOURT AJ., RODRIGUES CJ 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. eds. *Coffee: Agronomy*. London: **Elsevier Applied Science** pp 285-292.
- BIRCH, PRJ., BOEVINK, PC., GILROY, EM., HEIN, I., PRITCHARD, L., WHISSON, SC. 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. **Curr. Opin. Plant Biol.** 11: 373–379.
- BITTNER-EDDY PD., ALLEN RL., REHMANY AP., BIRCH P., BEYNON JL. 2003. Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology** 4(6): 501-507
- BOWDEN J., GREGORY PH., JONHSON CG. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. **Nature** 229: 500-501.
- CABRAL A., STASSEN JHM., SEIDL MF., BAUTOR J., PARKER JE., VAN DEN ACKERVEKEN G. 2011. Identification of *Hyaloperonospora arabidopsidis* transcript sequences expressed during infection reveals isolate-specific effectors. **PloS One** 6(5): e19328.
- CABRAL, PGC., ZAMBOLIM, EM., ZAMBOLIM, L., LELIS, TP., CAPUCHO, AS., CAIXETA, ET. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes** 4:129-130.
- CARVALHO CR, FERNANDES RC, CARVALHO GMA, BARRETO WB, EVANS HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. **PloS One** 6(11): e26387
- CATANZARITI AM, DODDS PN, LAWRENCE GJ, AYLIFFE MA, ELLIS JG. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **Plant Cell** 18(1): 243-256.

- CATANZARITI, AM., DODDS, PN., ELLIS, JG. 2007. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters** 269(2): 181-188.
- CANTU, D., SEGOVIA, V., MACLEAN, D., BAYLES, R., CHEN, X., KAMOUN, S. 2013. Genome analyses of the wheat yellow (stripe) rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveal polymorphic and haustorial expressed secreted proteins as candidate effectors. **BMC Genomics**. 14:270
- CANTU, D., GOVINDARAJULU, M., KOZIK, A., WANG, M., CHEN, X., KOJIMA, K. 2011. Next generation sequencing provides rapid access to the genome of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*, the causal agente of wheat stripe rust. **PLoS ONE** 6:e24230.
- CRAMER, RA., LA ROTA CM., CHO Y., THON M., CRAVEN KD., KNUDSON DL., MITCHELL TK., LAWRENCE CB. 2006. Bioinformatic analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Alternaria brassicicola* –Brassicaoleracea interaction. **Molecular Plant Pathology** 7(2): 113-124.
- COUTINHO TA, RIJKENBERG FHJ, VAN ASCH MAJ. 1995. Teliospores of *Hemileia vastatrix*. **Mycological Research** 8: 932-934.
- COLL, NS., EPPLE P., DANGL, JL. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation* 18(8): 1247-1256.
- CHAVES, GM., CRUZ-FILHO, JD., CARVALHO, MG., MATSUOKA, K., COELHO, DT., SHIMOYA, C., 1970. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). **Seiva** 30: 1-76.
- DANGL, JL., HORVATH, DM., STASKAWICZ, BJ. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, n. 6147, p. 746-751, Aug
- DE WIT PJ. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (21): 2726-2732.
- DE WIT PJ., MEHRABI R., VAN DEN BURG HÁ., STERGIOPOULOS I. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. **Molecular Plant Pathology** 10 (6): 735-747.
- DODDS PN., RATHJEN JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics** 11: 539-548.
- DODDS, PN., LAWRENCE, GJ., CATANZARITI, AM., AYLIFFE, MA., ELLIS, JG. 2004. The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **Plant Cell** 16(3): 755-768.
- DUPLESSIS, S., CUOMO, CA., LIN, YC., AERTS, A., TISSERANT, E., VENEAULT-FOURREY, C. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 108, 9166-9171.
- ELLIS JG., RAFIQI M., GAN P., CHAKRABARTI A., DODDS PN. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4): 399-405.
- FAZUOLI, LC., SILVAROLA, MB., SALVA, T J., G. 2007. Cultivares de café arábica do IAC: Um patrimônio da cafeicultura brasileira. **O Agrônômico**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 12-15.

- FERNANDES RC., EVANS HC., BARRETO RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. **Tropical Plant Pathology** 34 (2): 108-113.
- FERNANDES, D., TISSERANT, E. TALHINHAS, P., AZINHEIRA, H., VIEIRA, A., PETITOT, A. 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. **Mol. Plant Pathol.** 13, 17-37.
- FLOR, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9: 275-296.
- GICHURU, E.K., ITHIRU, J.M., SILVA, M.C., PEREIRA, A.P., VÁRZEA, V.M.P. 2012. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology** 37:424-427.
- GOPALKRISHNAN, K.S. 1951. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. **Mycologia** 43: 271-283.
- GOUVEIA, M.M.C., RIBEIRO, A., VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES JR, C.J. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. **Mycologia** 97:396-404.
- HACQUARD, S., JOLY, DL., LIN, YC., TISSERANT E., FEAU, N., DELARUELLE, C., LEGUE, V., KOHLER, A., TANGUAY, P., PETRE, B., FREY, P., VAN DE PEER, Y., ROUZE, P., MARTIN, F., HAMELIN, 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, MC. 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.
- HOWDEN, A.J. & HUITEMA, E. 2012. Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity. **Front Plant Sci.** 3: 160. doi: 10.3389/fpls.2012.00160.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em <<http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em 19 mai. 2017.
- JONES JD, DANGL JL. 2006. The plant immune system. **Nature** 444: 323-329.
- KAMPER, J., KAHMANN, R., BOLKER, M., MA, LJ., BREFORT, T., SAVILLE, BJ., BANUETT, F., KRONSTAD, JW., et al. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 18(11): 1130-1139.
- KOLMER, J.A., ORDONEZ, M.E. 2007. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. **Phytopathology** 97:1141-1149.

- KUSHALAPPA, AC 1989. Biology and Epidemiology. In: KUSHALAPPA, A.C.; ESKES, A.B. eds. Coffee rust: epidemiology, resistance and management. Boca Raton: **CRC Press**, 13-43.
- MAIA, T. M., BADEL, J. L., RAMIREZ, G. M., ROCHA, C. DE M., FERNANDES, M. B., SILVA J. C. F., JUNIOR, G. M. DE A., BROMMONSCHENKEL, S. H. 2016. The *Hemileia vastatrix* effector HvEC-016 suppresses bacterial blight symptoms in coffee genotypes with the SH1 rust resistance gene. **New Phytologist**. doi: 10.1111/nph.14334
- MAIA, T. A., MACIEL-ZAMBOLIM, E., CAIXETA, E. T., MIZUBUTI, E. S. G., ZAMBOLIM L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP **Australasian Plant Pathol.** 42:533–542.
- MAYNE, W.W. 1932. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* Berk & Br. **Nature** 129: 510.
- MATIELLO, JB., SANTINATO, R., GARCIA, AWR., ALMEIDA, SR., FERNANDES, DR. (2002) Cultura do Café no Brasil: Novo Manual de Recomendações. **MAPA/PROCAFÉ**, Fundação Procafé. Varginha, MG. 387p.
- MOSQUERA. G., GIRALDO, MC., KHANG, CH., COUGHLAN, S., VALENT, B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. **Plant Cell** 21(4): 1273-1290.
- MCGRAIN, JW., HENNEN JF. 1984. Development of the uredinial thallus and sorus in the Orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. **Phytopathology** 74: 714-72
- NORONHA-WAGNER, M., BETTENCOURT, A., 1967. Genetic study of the resistance of *coffea* spp. to leaf rust: i. identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany** 45: 2021-2131.
- NUNES, CC., MAFFIA, LA., MIZUBUTI, ESG., BROMMONSCHENKEL, SH., SILVA, JC. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology** 38:445-452.
- RAYNER RW. 1961 Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. and Br.). **Ann Appl Biol** 49:497–505.
- PETRE, B., JOLY, DL., DUPLESSIS, S. 2014 Effector proteins of rust fungi. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 415-416.
- PRETSCH, K., KEMEN, A., KEMEN, E., GEIGER, M., MENDGEN, K., VOEGELE, R. 2013. The rust transferred proteinase new family of effector proteins exhibiting protease inhibitor function. **Molecular Plant Pathology** 14(1): 96-107.
- PRUITT, K.D., TATUSOVA, T., MAGLOTT, D.R. 2005. NCBI reference sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, v.33, p.501-504.
- RAJENDREN, RB. 1967. New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. **Nature** 213: 105-106.

- RAFIQI, M., ELLIS, JG, LUDOWICI, VA, HARDHAM, AR., DODDS, PN. 2012. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 15(4): 477-482.
- RODRIGUES, CJ., BETTENCOURT, AJ. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology** 13: 49-70.
- RODRIGUES, CJ. 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. **Fitopatologia Brasileira** 15: 5-9.
- RODRIGUES JR, C.J. 2002. Centro de investigação das ferrugens do cafeeiro: Estudos e ensaios. Oeiras, Portugal, 55p.
- ROOS, DS. 2001. Bioinformatics- trying to swim in a sea of data. **Science**, v.291, p.1260-1261.
- ROONEY, HC., VAN'T KLOOSTER, JW., VAN DER HOORN, RA., JOOSTEN, MH., JONES, JD., DE WIT, PJ. 2005. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. **Science** 308(5729): 1783-1786.
- SAUDERS, DGO., WIN, J., CANO, LM., SZABO, LJ., KAMOUN, S., RAFAELLE, S. 2012. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. **PLoS ONE** 7:e29807
- SCHIEBER, E., ZENTMYER, GA. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. **Plant Disease** 68: 89-93.
- SPANU, PD., ABBOTT, JC., AMSELEM, J., BURGIS, TA., SOANES, DM., STUBER, K., VER LOREN VAN THEMAAT, E., BROWN, JK., et al. 2010. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. **Science** 330(6010): 1543-1546.
- STERGIOPOULOS, I., DE WIT, PJ. 2009. Fungal effector proteins. **Annual Review of Phytopathology** 47: 233-263.
- TALHINHAS, P., BATISTA, D., DINIZ, I., VIEIRA, A., SILVA, D. N., LOUREIRO, A., TAVARES, S., PEREIRA, A. P., AZINHEIRA, H. G., GUIMARAES, L. G., VARZEA, V., SILVA, M. D. C. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular plant pathology** DOI: 10.1111/mpp.12512
- TORTO-ALALIBO, TA., TRIPATHY, S., SMITH, BM., ARREDONDO, FD., ZHOU, L., LI, H., CHIBUCOS, MC., QUTOB, D., GIJZEN, M., MAO, C., SOBRAL, BW., WAUGH, ME., MITCHELL, TK., DEAN, RA., TYLER, BM. 2007. Expressed sequence tags from *Phytophthora sojae* reveal genes specific to development and infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 20: 781-793.
- VÁRZEA, VMP., MARQUES, DV. 2005 Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, EM., VÁRZEA, VMP. (Ed.). Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa: UFV. p.53-74.
- VISHVESHWARA, S., NAG RAJ, TR. 1960. Nuclear status in basidiospores of *Hemileia vastatrix* B. & Br. **Indian Coffee** 24(3): 118-119.

VLEESHOUWERS, VGAA., OLIVER, RP. 2014. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 27, n. 3. pg 196-206.

WIN, J., CHAPARRO-GARCIA, A., BELHAJ, K., SAUNDERS, DG., YOSHIDA, K., DONG, S., SCHORNACK. S., ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., HOGENHOUT, SA., KAMOUN, S. 2012. Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. **Cold Spring Harb Symposiaon Quantitave Biology** pp. 1-13.

ZAMBOLIM, L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Trop. plant pathol.** v41: p1–8.

ZIPFEL, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology**20(1): 10-16.

CAPÍTULO I

Primeiro relato das raças XXIX e XXX de *Hemileia vastatrix* no Brasil e variação de resposta em genótipos diferenciadores inoculados com isolados da raça III

Primeiro relato das raças XXIX e XXX de *Hemileia vastatrix* no Brasil e variação de resposta em genótipos diferenciadores inoculados com isolados da raça III

Silva, R.A., Caixeta, E.T., Badel, J.L., Zambolim, L.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que infectam o cafeeiro, a ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. é a doença mais importante, foi encontrada no Brasil pela primeira vez em *Coffea arabica* em janeiro de 1970, no sul do estado da Bahia, e quatro meses depois, foi observada em quase todas as plantações de café no país (Chaves et al., 1970). Atualmente, a doença pode ser encontrada em todas as regiões onde o café de Arabica (*C. arabica*) e Conilon (*C. canephora*) são cultivados. (Rodrigues, 1990; Avelino et al., 2015). Desde 2012, houve uma onda de epidemia de ferrugem do café na América Central e do Sul, particularmente na Nicarágua, Equador, El Salvador, Panamá e Honduras, onde as perdas foram estimadas na faixa de 30 a 90%. Fatores climáticos foram apontados como o causador do surto da ferrugem, especialmente em temperaturas mais elevadas (Avelino et al, 2015).

Nas regiões de clima quente produtoras de café do Brasil o café conilon, em sua maioria susceptível é cultivado, neste caso a doença pode reduzir os rendimentos em 30 a 50% dependendo do nível de resistência do genótipo (Capucho et al. 2013). A importância da ferrugem deve-se ao surgimento de novas raças de *H. vastatrix*, assim como a ocorrência de raças com genes de virulência complexos que mostram um grande potencial evolutivo das populações do fungo (Várzea & Marques, 2005). De um modo geral, nos fungos, raças fisiológicas ou patótipos são comuns, ou seja, variantes do patógeno com diferentes combinações de genes de virulência e, conseqüentemente, diferentes capacidades para infectar distintos genótipos de uma dada espécie hospedeira (Rodrigues Jr., 2002).

O primeiro estudo sobre a diversidade fisiológica de *H. vastatrix* foi realizado por Mayne (1932), na Índia, onde foram identificadas quatro raças fisiológicas do fungo. O CIFIC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro) em Oeiras, Portugal, caracterizou, até o momento, mais 50 raças de *H. vastatrix* (Gichuru et al., 2012; Várzea, et al., 2005; Talhinhos et al., 2017). No Brasil, 15 dessas raças foram identificadas em *C. arabica* L.: I(v2v5),II(v5),III(v1v5),VII(v3v5), X (v1v4v5), XIII (v5v?), XV (v4v5), XVI (v1v2v3v4v5), XVII (v1v2v5), XXII (v5v6), XXIII (v1v2v4v5), XXIV (v2v4v5), XXV

(v2v5v6), XXXIII (v5v7 ou v5v7v9) e XXXVII (v2v5v6v7v9), sendo a raça II (v5) a mais frequente (Chaves e Pereira 1980; Cardoso et al., 1986, 1988; Zambolim et al., 2005; Fazuoli et al., 2005, Cabral et al., Capucho et al., 2012). Em *Coffea canephora* var. Conilon três raças fisiológicas foram identificadas: I (v2v5), II (v5) e III (v1v5) (Zambolim., 2016).

As raças de *H. vastatrix* são determinadas pelo padrão de infecção em clones de cafeeiros diferenciadores de raças. Entretanto, a série diferenciadora é restrita, o que impossibilita a caracterização de alguns patótipos com amplo espectro de virulência. Pelo menos mais de 10 isolado não foram diferenciados pelas plantas diferenciadoras do CIFC, e outros isolados também não foram caracterizados em vários países produtores de café (Gouveia et al., 2005). Os mecanismos que levam ao surgimento de novas raças em *H. vastatrix* não são bem compreendidos. Como o estágio sexual do fungo não foi encontrado, a hipótese de mutação é o principal mecanismo que leva à variabilidade na população de patógenos (Varzea e Marques., 2005). Mas, um estudo no Brasil, de citometria de imagem do conteúdo de DNA revelou a presença de um tipo inédito de reprodução sexual oculta dentro dos esporos assexuais de *H. vastatrix*, onde comprovam a hipótese de que cariogamia, seguida de haploidização, pode ocorrer nos uredinósporos e este evento foi denominado de criptossexualidade, este tipo de reprodução pode explicar o surgimento frequente e rápido de novas raças fisiológicas do fungo (Carvalho et al., 2011). O objetivo deste trabalho foi caracterizar as raças existentes no Brasil até o momento, e entender o rápido surgimento de novas raças que estão sendo capazes de suplantam a resistência dos cafeeiros no Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem geográfica, armazenamento e inoculação

Um total de 56 isolados de *H. vastatrix* foram utilizados no estudo. Os isolados foram coletados em diferentes genótipos de cafeeiro, em municípios dos cinco principais estados brasileiros produtores de café (Tabela 1). Na figura 1 as regiões geográficas os estados, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Bahia. A amostragem consistiu de aproximadamente 20 folhas, apresentando sinais do patógeno, coletadas ao acaso em uma mesma planta em cada propriedade visitada. As folhas foram acondicionadas em sacos individuais e transportadas em caixas de isopor para o laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé) da Universidade Federal de Viçosa.

No laboratório, os urediniósporos foram coletados com o auxílio de uma cápsula de gelatina. Os urediniósporos coletados em folhas de uma mesmo genótipo de cafeeiro dentro de uma mesma lavoura em uma mesma propriedade foram considerados como um isolado. O local de coleta de cada isolado foi georeferenciado e os dados necessários para a identificação da amostra foram anotados em um caderno de campo. Os urediniósporos contidos em cápsulas de gelatina foram armazenados dentro de um dessecador com 50% de umidade relativa do ar, a 4°C, visando preservação até a inoculação para multiplicação (Zambolim & Chaves., 1974).

A inoculação das mudas de café com até 5 pares de folhas, com os isolados foi realizada com o auxílio de um pincel de pêlo de camelo, depositando-se os urediniósporos na face abaxial de folhas jovens e completamente desenvolvidas do cultivar caturra CIFC 19/1 (hospedeiro de multiplicação). Em seguida, água destilada foi aspergida sobre as folhas com um borrifador sem atingir o ponto de escorrimento. Após esse procedimento, as plantas foram cobertas com saco plástico e transferidas para uma câmara de nevoeiro a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro por 48 horas e umidade relativa próxima a 100%. As plantas foram mantidas em câmaras de crescimento com repartições individualizadas, a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, até a manifestação dos sinais do patógeno. Para a obtenção de isolados monopustulares, a metodologia utilizada foi a mesma descrita por Capucho et al. (2009) e semelhante à descrita para outros patógenos causadores de ferrugem, como *Puccinia coronata* (Leonard et al., 2005), *P. recondita* (Elyasi et al., 2006) e *P. tritici* (Kolmer et al., 2007). Os isolados monopustulares foram multiplicados em plantas de caturra até a obtenção de quantidade suficiente de urediniósporos para caracterização das raças fisiológicas.

Tabela 1: Descrição e origem geográfica dos isolados de *Hemileia vastatrix* utilizados no trabalho.

ISOLADO	GENÓTIPO/ CULTIVAR	MUNICÍPIO	UF	GEOREFERENCIAMENTO
1M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	20°44'84"S/ 42°51'10"W
2M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	20°44'94"S/42°51'10W
3M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	20°44'86"S/42°51'13W
4M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	20°44'86"S/42°51'13W
5M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	20°44'87"S/42°51'13W
6M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	20°44'88"S/42°51'14W
7M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	20°44'79"S/42°50'94W
9M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	20°44'84"S/42°50'95W
10M	Catuaí vermelho UFV	Viçosa	MG	20°44'57"S/42°50'86W
11M	Catuaí vermelho	Viçosa	MG	20°44'23"S/42°46'06W
12M	Pé Franco Conilon	Jaguare	ES	20°44'23"S/42°46'01W
13M	Conilon	Jaguare	ES	20°44'23"S/42°46'01W

14M	Pé Franco Conilon	Jaguaré	ES	20°44'23''S/42°46'01W
15M	Conilon (Crespin)	Jaguaré	ES	20°44'23''S/42°46'15W
16M	Bamburral (Conilon)	Jaguaré	ES	20°44'24''S/42°46'16W
18M	Conilon Clone 03	Jaguaré	ES	20°44'24''S/42°46'15W
19M	Conilon Mistura de clones	Jaguaré	ES	20°44'23''S/42°46'15W
20M	Conilon Mistura de Clones	Jaguaré	ES	20°44'23''S/42°46'15W
21M	Conilon LB1	Soretama	ES	20°44'24''S/42°46'15W
22M	Conilon	Jaguaré	ES	20°44'23''S/42°46'16W
23M	Conilon Clone 02	Jaguaré	ES	20°44'23''S/42°46'15W
24M	Conilon Clone 120	Jaguaré	ES	20°44'23''S/42°46'16W
25M	Conilon (Mistura)	Soretama	ES	20°44'23''S/42°46'16W
26M	Conilon (ALB1, 02, 16)	Soretama	ES	20°44'23''S/42°46'16W
28M	Conilon clone 02	Linhares	ES	19°31'88''S/ 40° 10'89W
29M	Conilon	Linhares	ES	19°31'88''S/ 40° 10'89W
30M	Conilon (02, 153, G35)	Linhares	ES	19°31'97''S/ 40° 10'91W
31M	Conilon	Linhares	ES	19°32'49''S/ 40° 08'16W
33M	Conilon (Mistura de clone)	Linhares	ES	19°22'37''S/ 40° 87'03W
36M	Conilon (Mistura de clone)	Rio Bananal	ES	19°13'79''S/ 40° 21'35W
37M	Conilon	Rio Bananal	ES	19°06'50''S/ 40° 21'46W
38M	Conilon (mistura de clone)	Vila Valério	ES	18°59'88''S/ 40° 23'35W
39M	Conilon (153, A21, verdinho)	Vila Valério	ES	18°58'19''S/ 40° 21'89W
40M	Conilon	Vila Valério	ES	18°58'19''S/ 40° 21'80W
41M	Conilon (mistura de clone)	Marilândia	ES	19°24'15''S/ 40° 32'73W
44M	Conilon	Marilândia	ES	19°23'70''S/ 40° 33'30W
45M	Conilon	Marilândia	ES	19°23'49''S/ 40° 33'27W
46M	Conilon (53,03,02) clones vitória	Marilândia	ES	19°21'93''S/ 40° 34'65W
47M	Conilon (P1, P2, G35, G18, 153, 02,76)	Marilândia	ES	19°25'49''S/ 40° 32'68W
51M	Conilon 18 Clones	Marilândia	ES	19°24'31''S/ 40° 32'33W
52M	Conilon 18 Clones	Marilândia	ES	19°24'37''S/ 40° 32'33W
53M	Robusta	Marilândia	ES	19°24'38''S/ 40° 32'45W
54M	Mistura de clones	Itabela	BA	16°34'30''S/39°33'10''W
55M	Conilon clone 03	Itabela	BA	16°34'30''S/39°33'10''W
56M	Conilon clone 03	Itabela	BA	16°34'30''S/39°33'10''W
58M	Conilon (G35, BJ1, Biji)	Itabela	BA	16°34'30''S/39°33'10''W
60M	Mistura de clones	Itabela	BA	16°34'30''S/39°33'10''W
62M	Mundo Novo (407)	Cambará	PR	
63M	Catuaí vermelho (429)	Batatais	SP	
64M	(449)	Eunápolis	BA	
65M	Conilon (mistura de Clones) (459)	Jaguaré	ES	
66M	Oeiras MR	Viçosa	MG	
67M	(7963/117)	Viçosa	MG	
68M	<i>C. arábica</i>	Viçosa	MG	
69M	<i>C. arábica</i>	Viçosa	MG	
70M	<i>C. arábica</i>	Viçosa	MG	

MG- Minas gerais, ES-Espírito Santo, BA- Bahia, SP- São Paulo, PR- Paraná

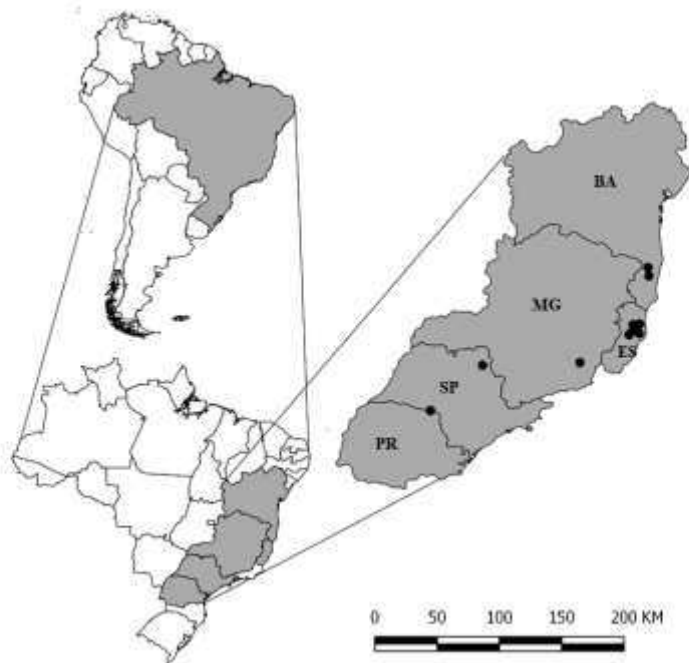


Figura 1: Origem geográfica dos isolados de *Hemileia vastatrix* coletado para este estudo, nos estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia.

2.2. Caracterização das raças fisiológicas dos isolados de *Hemileia vastatrix*

A metodologia de disco de folhas foi utilizada para a caracterização de raças dos isolados de *H. vastatrix* (Eskes., 1982), sendo utilizados 16 discos de folhas (1,5 cm de diâmetro) de cada um dos 24 clones diferenciadores de raças de *H. vastatrix* mantidos pelo BioCafé/UFV. Cada disco de folha foi inoculado na face abaxial com urediniosporos do patógeno com o auxílio de pincel de pêlo de camelo. Após a inoculação, os discos foram colocados sobre uma tela de nylon e espuma, saturada com água, no interior de um gerbox, e então atomizados com água destilada. Os gerbox contendo os discos de folhas foram fechados e mantidos na ausência de luz durante 48 horas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida, os gerbox foram transferidos para uma câmara com condições controladas de temperatura e luminosidade ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de luz). Os discos de folhas inoculados foram limpos com o auxílio de algodão, 48 horas após a inoculação. A caracterização fisiológica de raças foi determinada de acordo com a reação de resistência (ausência de urediniosporos) ou suscetibilidade (presença de urediniosporos), manifestada em cada clone diferenciador de raças. Oito avaliações foram realizadas em intervalos de sete dias e os resultados foram consultados na literatura para determinar a qual raça pertencia cada isolado (Várzea & Marques., 2005). Os testes foram repetidos três vezes, em épocas diferentes do ano para

a confirmação dos resultados, cada procedimento com três repetições. E os isolados 5M e 40M foram confirmados os resultados em plantas.

3. RESULTADOS

As raças II, III, XIII, XXII XXIX, XXX e XXXIII de *H. vastatrix* foram identificadas. Sendo possível a caracterização de sete raças e 15 patótipos em 56 isolados caracterizados. Na tabela 2, segue as descrições e a frequência de cada raça e patótipo. A raça II foi a predominante, encontrada em 17 dos isolados originários de *C. arabica*, *C. canephora* e derivados de híbridos de Timor (HdT) coletados nos cinco estados de MG, SP, ES, BA e PR. Quatro isolados foram identificados como pertencentes a raça XIII, todos foram coletados em *C. canephora* no clone 120 no Espírito Santo, e em cultivo com mistura de clones. Dois isolados foram caracterizados pelo padrão de resposta na série diferenciadora como pertencentes as raças III, um foi obtido de pústulas em folhas de HdT e o outro em *C. canephora*. Três isolados foram caracterizados como pertencente a raça XXII, obtidos em plantas de *C. canephora* nos clones 03 e 18 de conilon cultivado em mistura de clones. Um isolado obtido de *C. arabica* foi caracterizado como pertencente a raça XXIX, este é o primeiro relato da ocorrência desta raça fisiológica em cafezais brasileiros. Foi também encontrado pela primeira vez no Brasil um isolado pertencente a raça XXX em plantas de HdT e um isolado foi caracterizado como raça XXXIII, coletado de pústulas em plantas de *C. canephora*. Para alguns isolados não foi possível sua caracterização em raças já descritas até o momento (Tabela 2), estes foram obtidos tanto de plantas de *C. canephora* como em *C. arabica*. As raças mencionadas acima foram caracterizadas com base no conhecimento dos genes de resistência (S_H) em cafeeiros da série diferenciadora. O padrão de inoculação na série diferenciadora de raça de *H. vastatrix*, obtido permitiu a identificação de 15 novas raças do patógeno para 27 isolados (Tabelas 2 e 3). Estas novas raças de *H. vastatrix* foram nomeadas como as raças Hv01, Hv02, Hv03, Hv04, Hv05, Hv06, Hv07, Hv08, Hv09, Hv10 e Hv11, Hv12, Hv13, Hv14 e Hv15. Cinco isolados foram caracterizados como raça Hv01 obtidos em plantas *C. arabica* coletados nos Estados do Paraná e São Paulo. Como pertencente as novas raças Hv02, Hv03 e Hv04 foram caracterizados apenas um isolado de cada em plantas de Catuaí no Paraná, em clones de *C. canephora* no ES e em plantas de Catuaí em Minas Gerais, respectivamente. Quatro isolados foram caracterizados como a raça Hv05 obtidas em plantas de *C. canephora* e HdT no ES e MG respectivamente. Dois isodado como

pertencente a raça Hv06, Hv07, Hv08, Hv11 e Hv12 cada, para a raça Hv06 derivados *C. canephora* e *C. arábica* no ES e BA. Pertencente a raça Hv07 obtidos de *C. Canephora* no ES e BA, Hv08 obtidos de *C. canephora* e HdT coletados dos estados ES, MG. O Hv11 ambos derivados de HdT coletados no estado de MG, e o Hv12 ambos os isolados derivados de *C. canephora* coletados no ES. Pertencente as raças Hv09, Hv10, Hv13, Hv14 e Hv15 foram encontradas em um isolado cada, Hv09 obtidos de plantas de *C. arábica* e a Hv10 e Hv14 obtidos de HdT coletados em MG. Hv13 obtido de *C. canephora*, e o Hv15 derivado de *C. canephora* ambos coletados no estado ES.

Tabela 2: Reação dos isolados de *Hemileia vastatrix* em clones diferenciadores de raças com os respectivos genes de virulência do patógeno de resistência do hospedeiro e a frequência encontrada para cada uma das raças.

Genes de Virulência inferidos	Raças Fisiológicas de <i>H. vastatrix</i>	Genes de Resistências											Frequência	
		S _{H6}	S _{H 5,6,7,9}	S _{H4,5}	S _{H5,6,9}	S _{H1,5}	S _{H1,2,5}	S _{H5,7 ou S_{H5,7,9}}	S _{H1}	S _{H5,8}	S _{H?}	S _{H5}		S _{H2,5}
		Coffee spp e Híbrido Interespecífico												
		1343/269	420/10	110/5	419/20	87/1	1006/10	7963/117	128/2	420/2	644/18	19/1		32/1
		a	y	E	R	D	G	M	3	2	1	J	L	
v5	II											S		30,3
v1,5	III					S						S		3,5
v5,?	XIII										S	S		7,1
v5,6	XXII	S										S		5,3
v5, 6,7,8,9	XXIX	S	S							S		S		1,7
v5,8	XXX									S		S		1,7
v5,7,9 ou 5,7	XXXIII							S				S		1,7
v1,5,6,7,8,9,?	Hv01	S	S		S	S			S	S	S	S		8,9
v1,5,8,?	Hv02								S	S	S	S		1,7
v5,6,7,9	Hv03	S						S				S		1,7
v5,6,8	Hv04	S								S		S		1,7
v5,6,?	Hv05	S									S	S		7,14
v1,5,6,7,9	Hv06	S	S			S						S		3,5
v1,5,6,7,8,9	Hv07	S	S		S			S	S	S		S		3,5
v1,5,6,?	Hv08	S				S					S	S		3,5
v1,5,6	Hv09	S				S						S		1,78
v1,2,5,6,7,8,9,?	Hv10	S					S	S	S	S	S	S	S	1,78
v1,5,6,8,?	Hv11	S							S	S	S	S		3,5
v5,6,7,9,?	Hv12	S	S								S	S		3,5
v1,4,5,?	Hv13			S					S		S	S		1,78
v1,2,5,7,8,9,?	Hv14						S	S		S	S	S		1,78
v1,5,6,8,9,?	Hv015	S			S	S			S	S	S	S		1,78

S = suscetibilidade (reação compatível)

Anteriormente a este trabalho haviam sido identificadas quinze raças de *H. vastatrix* no Brasil, sendo estas, Raça I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXXIII e XXXVII (Zambolim, 2016). No presente trabalho, identificamos as raças XXIX e XXX relatada no mundo, mas pela primeira vez relatadas no Brasil (Tabela 2) encontradas em Catuaí e HdT em Minas Gerais. Com relação às raças já relatadas no Brasil, neste trabalho foram encontradas sete das quinze com relato. E quinze caracterizadas como novas raças e conseqüentemente o aparecimento de mais um gene de virulência antes não relatado, o gene v8 que foi encontrado em isolados oriundos de *C. canephora*, *C. arábica* e HdT. E também o aparecimento do gene v? em isolados que são capazes de causar doença em genótipo diferenciador que têm o gene v? que podem ser fatores de virulência diferentes. Foi encontrado em isolados oriundos das duas espécies de cafeeiro e em HdT (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação de genes de virulência que existem nas raças anteriormente descritas e novas de *H. vastatrix* no Brasil

Raças anteriormente descritas	Raças atuais	Novas Raças		Presença Gene v
I (v2,5)	II(v5)	v1,5,6,7,8,9,?	Hv01	v8,?
II (v5)	III(v1, 5)	v1,5,8,?	Hv02	v8,?
III (v1, 5)	XIII(v5,?)	v5,6,7,9	Hv03	
VII (v3,5)	XXII(5,6)	v5,6,8	Hv04	v8
X (v1,4,5)	XXIX (v5,6,7,8,9)	v5,6,?	Hv05	v?
XIII (v5,?)	XXX (v5,8)	v1,5,6,7,9	Hv06	
XV (v4,5)	XXXIII(v5,7 ou 5,7,9)	v1,5,6,7,8,9	Hv07	v8
XVI (v1,2,3,4,5)		v1,5,6,?	Hv08	v?
XVII (v1,2,5)		v1,5,6	Hv09	
XXII (5,6)		v1,2,5,6,7,8,9,?	Hv10	v8,?
XXIII (v1,2,3,4,5)		v1,5,6,8,?	Hv11	v8,?
XXIV (v2,4,5)		v5,6,7,9,?	Hv12	v?
XXV (v2,5,6)		v1,4.5,?	Hv13	v?
XXXIII (v5,7 ou 5,7,9)		v1,2,5,7,8,9,?	Hv14	V8,?
XXXVII (v2,5,6,7,9)		v1,5,6,8,9,?	Hv15	v8,?

v = virulência

A caracterização de raças só é possível por meio da série diferenciadoras compostas por 24 genótipos de Café, que possuem os genes de resistência do S_{H1} - S_{H9} (Noronha et al., 1967). A tabela 4, mostra padrão de infecção para a caracterização das raças e novas raças, em relação aos genótipos diferenciadores. Onde está sendo mostrado apenas os diferenciadores que tiveram reação compatível e incompatível para os isolados estudados. Apenas os isolados destacados em amarelo apresentaram o mesmo padrão de infecção, com reação de compatibilidade nos mesmos genótipos da série diferenciadora. Para os demais isolados os padrões de reação são contrastantes com genótipo. Dois

isolados previamente caracterizados como a raça III que já foi relatada no Brasil e em outros países produtores de café, apresentaram padrões de infecção contrastantes com genótipos que compõem a série diferenciadora, sendo estes os isolados 5M e 40M com reação diferencial para o genótipo 128/2 diferindo do que já foi descrito para raça III. Os isolados caracterizados como novas raças 51M, 64M, tiveram reações contrastantes com os genótipos 420/10, 7963/117, 128/3, os isolados 38M, 60M tiveram reação contrastante com genótipo 419/20, 87/1, 128/2, 7963/117, os isolados 1M, 6M contrastante com genótipo diferenciador 87/1, isolados 12M, 26M tiveram reação diferencial com genótipo 7963/117, e os isolados 62M, 65M, 66M, 67M, 70M com reação diferencial para os genótipos 1343/269, 420/10, 419/20, 7963/117, 87/1, 128/2. Todos os isolados que compõem uma raça que tiveram reação contrastante com genótipos da série diferenciadora, são derivados tanto de *Coffea canephora*, *C. arábica* e HdT e independe da sua origem geográfica.

Tabelas 4: Padrão de Resposta diferencial em 11 genótipos da coleção de série diferenciadoras de raças para *Hemileia vastatrix*.

Isolados/Série Diferenciadora	1343/269 SH6	420/10 SH5,6,7,9	110/5 SH4,5	419/20 SH5,6,9	87/1 SH1,5	1006/10 SH1,2,5	7963/117 SH5,7,9 ou 5,7	128/2 SH1	420/2 SH5,8	644/18 SH?	19/1 SH5	32/1 SH2,5
33M II												S
40M III					S							S
5M III					S			S				S
24M XIII											S	S
54M XIII											S	S
13M XIII											S	S
29M XIII											S	S
18M XXII	S											S
41M XXII	S											S
52M XXII	S											S
68M XXIX	S	S							S			S
3M XXX									S			S
28M XXXIII							S					S
44M v5,6,?	S										S	S
4M v5,6,?	S										S	S
31M v5,6,?	S										S	S
21M v5,6,?	S										S	S
47M v5,6,7,9	S						S					S
63M v5,6,8	S								S			S
53M v1,4,5,?			S					S		S		S
39M v1,5,6,8,9?	S			S	S			S	S	S		S
51M v1,5,6,7,9	S	S			S							S
64M v1,5,6,7,9	S				S		S	S				S
10M v1,5,6	S				S							S
38M v1,5,6,7,8,9	S	S			S				S			S

60M	v1,5,6,7,8,9	S	S	S	S	S	S	S	S	
45M	v1,5,6,?	S			S			S	S	
2M	v1,5,6?	S			S			S	S	
9M	v1,2,5,6,7,8,9,?	S			S	S	S	S	S	S
1M	v1,5,6,8,?	S					S	S	S	S
6M	v1,5,6,8?	S			S		S	S	S	S
12M	v5,6,7,9,?	S	S					S	S	
26M	v5,6,7,9,?	S	S			S		S	S	
7M	v1,2,5,7,8,9,?				S	S		S	S	S
66M	v1,5,6,7,8,9,?	S			S	S		S	S	S
62M	v1,5,6,7,8,9,?		S	S	S	S		S	S	S
70M	v1,5,6,7,8,9,?	S	S	S			S	S	S	S
67M	v1,5,6,7,8,9,?	S	S		S		S	S	S	S
65M	v1,5,6,7,8,9,?	S	S	S	S		S	S	S	S
11M	v1,5,8?						S	S	S	S

S= Suscetibilidade

Os resultados obtidos com esta coleção de isolados nos leva a um indicativo que as séries diferenciadoras contêm genes S_H adicionais aqueles que já foram descritos, o que pode estar levando a reações tão diferenciais daquelas que já foram descritas e não sendo possível a identificação das novas raças. Recentemente foi identificado por Dugassa (2017), um gene de resistência que foi chamado S_{H10} de acordo com seus estudos é um gene que codifica a uma proteína NB-LRR, que esta presente nos diferenciadores 832/1, 1343/269, 420/10, 128/2, 419/20,644/18 e 832/2. Com esses resultados podemos inferir os genes de virulência para os isolados em estudo, e propomos a adição do gene de virulência para as raças existentes. (Tabela 5)

Tabela 5 - Adição do gene S_{H10} , identificação de possíveis seis genes de Resistência a *Hemileia vastatrix*

Série diferenciadora	Genes (S_{H1}- S_{H9})	Genes de Resistência Proposto
19/1 – Matari	S_H 5	S_H 5
128/2 - Dilla & Alghe	S_H 1	S_H 1, 10,F
635/2 - S 12 Kaffa	S_H 4	S_H 4, ?
63/1 – Bourbon	S_H 5	S_H 5
1343/269 - H. Timor	S_H 6	S_H 6, 10,A
32/1 - DK 1/6	SH 2,5	SH2,5
33/1 - S. 288-23	S_H 3,5	S_H 3,5
644/18 H. Kawisari	S_H ?	SH 10 ,
H 419/20	S_H 5,6,9	S_H 5,6,9, 10,C
H 420/2	S_H 5,8	S_H 5,8
H 420/10	S_H 5,6,7,9	S_H 5,6,7,9, 10,B
7960/15 = 7963/117 – Catimor	S_H 5,7 ou SH 5,7,9	S_H 5,7,9, D ou 5,7, D
829/1	S_H ?	S_H ?
110/5 - S 4 Agaro	S_H 4,5	S_H 4,5, ?
1006/10 - KP 532 (pl 31)	S_H 1,2,5	S_H 1,2,5
H 153/2	S_H 1,3,5	S_H 1,3,5
635/3 - S 12 Kaffa	S_H 1,4,5	S_H 1,4,5, ?
H 152/3	S_H 2,4,5	S_H 2,4,5
H 151/1	S_H 3,4,5	S_H 3,4,5
HW 17/12	S_H 1,2,4,5	S_H 1,2,4,5
H 147/1	S_H 2,3,4,5	S_H 2,3,4,5
832/1 - H. Timor	S_H 6,7,8,9,?	S_H 6,7,8,9, 10,?
134/4 - S 12 Kaffa	S_H 1,4	S_H 1,4
87/1 – Geisha	S_H 1,5	S_H 1,5, E

Os Clones em amarelo são os candidatos a possuírem um gene de resistência, diferente dos genes A,B,C,D,E e F, podendo ser o mesmo gene ou genes diferentes.

4. DISCUSSÃO

A possível mudança na composição de raças em *Hemileia vastatrix* foi reconhecida e associado à suplantação da resistência do hospedeiro, levando aos primeiros estudos sobre especialização fisiológica de *Hemileia vastatrix*, descrita por Mayne (1932), que identificou quatro raças de *H. vastatrix* desde então, estudos sobre a variabilidade de *Hemileia vastatrix* tem se intensificado, primeiramente pelo Centro de Investigação da Ferrugem do Cafeeiro (CIFC) e outras instituições, como Cenicafé (colômbia), IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e UFV. Atualmente, está sendo um grande desafio o desenvolvimento de variedades de café com resistência duradoura à ferrugem, devido à alta variabilidade genética em populações de *H.vastatrix* que vem sendo detectado nos últimos anos. Estudos da diversidade de raças mostraram até o momento mais de 50 raças caracterizadas, bem como a ocorrência de raças complexas que sugerem um forte potencial evolutivo dentro da população do fungo *H. vastatrix* (Cabral et al., 2009).

No momento, a variabilidade de *H. vastatrix* é determinada pelo seu padrão de infecção em uma série de clones de café diferenciadoras (Várzea et al., 2005). Isso é possível devido a interação entre o cafeeiro e *H. vastatrix* ser de acordo com a teoria gene-a-gene proposta por Flor (1971), na qual existe o reconhecimento dos genes de avirulência das diferentes raças do fungo, por parte dos fatores de resistência do cafeeiro (Bettencourt, 1981). Raças ou patótipos distintos foram identificados através da virulência de isolados nestes clones diferenciais que possuem diferentes combinações de genes de resistência identificados que vão desde S_H1 - S_H9 . Entretanto, a série diferenciadora é restrita, o que impossibilita a caracterização de alguns patótipos com amplo espectro de virulência. Com base na teoria gene-a-gene as raças são inferidas de acordo com as combinações distintas e exclusivas de genes de virulência como números romanos sequenciais em ordem de identificação (Noronha-Wagner e Bettencourt., 1967).

Até o momento, a inferência dos genes de virulência foi possível e restrita aos genes de virulência do v1-v9. Recentemente foi identificado por Dugassa (2017) um novo gene de resistência chamado de S_H10 presente em seis clones diferenciais, aumentando assim a identificação e o entendimento do rápido surgimento de raças e patótipos com amplo espectro de virulência. No Brasil, ao longo dos anos o cenário de novas raças existentes vem mudando, até o momento foram caracterizadas 15 raças, a mais recente caracterizada foi a raça XXXIII (Capucho et al., 2012).

O presente trabalho mostra que houve uma mudança em relação as raças encontradas até o momento. Nas regiões em estudo foi possível a identificação de sete raças, com destaque do primeiro relato das raças XXIX (v5,6,7,8,9) e XXX(v5,8), e o relato de quinze novas raças, com amplo espectro de virulência que não foi possível caracterizar em raças já descritas. Isso mostra que o surgimento dessas raças complexas podem ser devido a base do melhoramento genético do cafeeiro utilizar como fonte de resistência o cafeeiro Híbridos de Timor 832/1 com os genes de resistência $S_{H6,7,8,9,?}$. Mas, que até o momento diferentemente da Índia, no Brasil a resistência do Híbrido de Timor 832/1 não foi suplantada, já que há presença dos genes de virulência v1,v2,v4,v5,v6,v7,v8, v9 e v?.

A raça II é encontrada com maior frequência no Brasil (Zambolim et al., 2005) e apresenta apenas o gene de virulência v5. Acreditava-se que a alta frequência se dava pelo fato da maioria dos cultivares plantados serem de *C. arábica*, e a adaptabilidade do fungo mostrou-se bastante alta, sendo também encontrado com maior frequência nos isolados de hospedeiro *C. canephora* e HdT.

O gene v8, não tinha sido relatado antes no Brasil e o genótipo que contém o gene v? apresentou resposta diferencial, provando que se trata possíveis genes diferentes. Segundo Dugassa (2017) a presença de um novo gene em seis clones diferenciais, que foi chamado de SH10, pode explicar o aumento no número de novos patótipos não caracterizados em raças. Os resultados confirmam que a resposta do genótipo diferencial para raça III, onde dois isolados da mesma raça tem padrões de infecções diferentes, e estas contém o gene S_{H10} , podem explicar que a série diferenciadora podem ter mais genes de resistência ainda não identificados. Utilizando com base as reações de resistência/susceptibilidade ao inocular os isolados na coleção de plantas diferenciadoras foi possível detectar a presença de sete possíveis novos genes de resistência (A,B,C,D,E,F) ainda não descritos, o que não significa que não possam estar presentes em mais genótipos de café e que não existam mais genes distintos presentes nos genótipos.

A raça III, identificada para os isolados 5M e 40M derivados de HdT e *Coffea canephora*, mostrou resposta diferencial no clone 128/2 com gene S_{H1} . Acrescentando o gene S_{H10} nessa diferenciadora foi possível diferenciar esses dois isolados. O mesmo ocorreu com algumas das novas raças propostas no trabalho que apresentaram raças distintas. As raças Hv01, Hv06, Hv07, Hv012, mostrou que há uma diferença entre os isolados de cada, pois existem genes de resistência ainda não identificados na coleção de

planta diferenciadora. Quanto mais genes de resistência do hospedeiro forem identificados maior o número de combinações dos genes de virulência inferidos e melhor elucidada será a determinação e a diferenciação das raças. Como até o momento é a única ferramenta utilizada para estudar a virulência dos isolados de *H vastatrix*. E a coleção de clones diferenciais, precisa-se conhecer melhor a sua base genética, e utiliza-la junto a técnicas moleculares para elucidar o patossistema *Coffea – H vastatrix*. Com o avanço da genômica, transcriptoma e proteômica, acredita-se que em um futuro próximo estas muitas perguntas serão respondidas. Mesmo a ferrugem presente a mais de 150 anos, ainda continua sendo um patossistema desafiador, e muito ainda deve ser feito para entender o sucesso evolutivo de *H vastatrix* que é capaz de suplantar com certa facilidade a resposta de defesa do hospedeiro.

Os resultados apontam os prováveis riscos, de uma população tão diversificada do fungo, quando se trata do desenvolvimento de cafeeiros resistentes à ferrugem que utiliza o Híbrido de Timor (HdT 832/1) como a principal fonte de resistência. No Brasil o HdT continua sendo resistente a todas as raças e patótipos encontrados, sendo ainda uma boa fonte de resistência a ferrugem para serem utilizados nos programas de melhoramento. A série diferenciadora deve ser trabalhada visando a obtenção de materiais com os genes de resistência separados. Os materiais como o HdT 832/1 devem ser cruzados com materiais susceptíveis para a segregação de seus genes, contribuindo com a melhoria na identificação das raças e dos genes de resistência envolvidos. A coleção de isolados (raças) é tão importante quanto a própria série diferenciadora, pois através dela podemos identificar a presença de possíveis genes de virulência, como ocorreu no trabalho com a identificação de seis candidatos (A,B,C,D,E,F). O estudo mostra ocorrência de novas raças e a complexidade do patossistema, e propõe que a série diferenciadora e o estudo dos isolados ao longo dos anos devem ser feitos, para melhor esclarecer a rápida suplantação da resistência do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- AVELINO, J., CRISTANCHO, M., GEORGIU, S., IMBACH, P., AGUILAR, L., BORNEMANN, G., LEADERACH, 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 Sec.** 7, 303–321
- CABRAL, PGC., ZAMBOLIM, EM., ZAMBOLIM, L., LELIS, TP., CAPUCHO, AS., CAIXETA, ET. 2009 Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australas Plant Dis Notes** 4:129–130.
- CARDOSO, RML., ZAMBOLIM, L., CHAVES, GM. 1988 Ocorrência no Brasil da raça XVI de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. coletada de germoplasma de *Coffea arabica* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatol Bras** 5:393–394
- CARDOSO, RML., ZAMBOLIM, L., CHAVES, GM. 1986 Novas raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. identificadas em cafeeiros de genótipos complexos. **Fitopatol Bras** 11:318
- CARVALHO, CR., FERNANDES, RC., CARVALHO, GMA., BARRETO, WB., EVANS HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. **Plos One** 6(11): e26387
- CAPUCHO, AS., CAIXETA, ET., ZAMBOLIM, EM., ZAMBOLIM, L. 2009. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV443-03 à ferrugem-docafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 44:276-282.
- CAPUCHO, AS., MACIEL-ZAMBOLIM E., FREITAS, RL., HADDAD, F., CAIXETA, ET., ZAMBOLIM, L. 2012 Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Austral Plant Dis Notes** 7:189–191
- CAPUCHO, AS., ZAMBOLIM, L., CABRAL, PGC., MACIEL-ZAMBOLIM, E., CAIXETA, ET. 2013 Climate favorability to leaf rust in Conilon coffee. **Austral Plant Pathol** 24:511–514
- CHAVES, GM. et al. 1970. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). **Seiva**, Viçosa, MG, v. 30, p. 1-76. Edição especial.
- CHAVES, GM., PEREIRA, AA. 1980 Presença de nova raça de *Hemileia vastatrix* em Minas Gerais. **Fitopatol Bras** 5:393–394
- DINIZ, I., TALHINHAS, P., AZINHEIRA, HG., VÁRZEA, V., MEDEIRA, C., MAIA, I., PETITOT, A., NICOLE, M., FERNANDEZ, D., SILVA, MC. 2012 “Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2”, **European Journal of Plant Pathology**, 133, 141-157, DOI 10.1007/s10658-011-9925- 9
- DUGASSA, GB. 2017. Identification, molecular characterization and differential expression studies of genes activated during *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.

- ESKES, AB. 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88:127-141.
- ELYASI-GOMARI, S., PANTELEEV, VK. 2006. Virulence polymorphism of *Puccinia recondita f.sp. tritici* and effectiveness of Lr genes for leaf rust resistance of wheat in Ukraine. **Plant Disease** 90:853-857.
- FAZUOLI, LC., OLIVEIRA, ACB., TOMA-BRAGUINI, M., SILVAROLLA, MB. 2005 Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at the IAC. In: Zambolim L, Maciel-Zambolim E, Várzea VMP (eds) **Durable resistance to coffee leaf rust**. UFV, Viçosa, pp 137–185.
- GICHURU, EK., ITHIRU, JM., SILVA, MC., PEREIRA, AP., VÁRZEA, VMP. 2012. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology** 37:424-427.
- GOUVEIA, MMC., RIBEIRO, A., VÁRZEA, VMP., RODRIGUES JR, CJ. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. **Mycologia** 97:396-404.
- LEONARD, KJ., ANIKSTER, Y., MANISTERSKI, J. 2005. Virulence associations in oat crown rust. **Phytopathology** 95:53-61.
- MAIA, TM., BADEL, JL., RAMIREZ, GM., ROCHA, CDM., FERNANDES, MB., SILVA JCF., JUNIOR, GMA., BROMMONSCHENKEL, SH. 2016. The *Hemileia vastatrix* effector HvEC-016 suppresses bacterial blight symptoms in coffee genotypes with the SH1 rust resistance gene. **New Phytologist**. doi: 10.1111/nph.14334
- MAYNE, WW. 1932. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* Berk & Br. **Nature** 129: 510.
- NORONHA-WAGNER, M., BETTENCOURT, A., 1967. Genetic study of the resistance of *coffea spp.* to leaf rust: i. identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. **Canadian Journal of Botany** 45: 2021-2131.
- RODRIGUES, C J. 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and 4 host resistances. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 5-9, Mar..
- RODRIGUES, JR, CJ. 2002. Centro de investigação das ferrugens do cafeeiro: Estudos e ensaios. Oeiras, Portugal, 55p.
- VÁRZEA, VMP., MARQUES, DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M.; VÁRZEA, V.M.P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa: UFV, p.53-74.
- ZAMBOLIM, L., MACIEL-ZAMBOLIM, E., VALE, FXR., PEREIRA, AA., SAKYIAMA, NS., CAIXETA, ET. 2005 Physiologic races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim L, Maciel-Zambolim E, Várzea VMP (eds) **Durable resistance to coffee leaf rust**. UFV, Viçosa, pp 53–74

ZAMBOLIM, L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Trop. plant pathol.** v41: p1–8.

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

CAPÍTULO II

ANÁLISE DE PROTEÍNAS CANDIDATAS A EFETORAS EM POPULAÇÃO DE *Hemileia vastatrix* NO BRASIL

ANÁLISE DE PROTEÍNAS CANDIDATAS A EFETORAS EM POPULAÇÃO DE *Hemileia vastatrix* NO BRASIL

Silva, R.A., Caixeta, E.T., Badel, J.L., Mendes, T.A., Zambolim, L.

1. INTRODUÇÃO

Uma das doenças mais importantes do cafeeiro é a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, um parasita obrigatório, cuja presença foi identificada pela primeira vez em 1861, na zona leste de África (Rodrigues, 1990; Silva et al., 2006; McCook, 2008). O fungo pertence ao filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Incertae sedis (Index fungorum 2017) É a doença mais importante em todos os países produtores de café, levando a sérios problemas sociais e econômicos (Vieira et al, 2011). Os sintomas da ferrugem alaranjada do café são observados na face inferior das folhas, onde aparecem pequenas manchas amarelo-pálidas, as quais evoluem para lesões maiores de aspecto pulverulento (urediniósporos) e de coloração amarelo-alaranjada. Na face superior, observam-se manchas cloróticas amareladas que correspondem aos limites da pústula na face inferior, a qual necrosa e causa a queda da folha infectada (Fazuoli et al., 2007; Godoy; Bergamin Filho et al., 1997; Zambolim et al., 1999)

A interação cafeeiro-*Hemileia* é governada pela teoria gene-a-gene, sendo a resistência condicionada por pelo menos nove genes dominantes (S_{H1} a S_{H9}) isolados ou em associação (Rodrigues Jr et al., 1975; Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988). Proteínas codificadas por estes genes são capazes de reconhecer, direta ou indiretamente, efetores específicos codificados pelos genes de avirulência (*Avr*) do patógeno, ativando os mecanismos de defesa da planta. Neste caso, o fungo não consegue causar uma infecção estável nos tecidos do hospedeiro, caracterizando uma interação incompatível. Por outro lado, o fungo pode secretar proteínas efetoras, que são capazes de impedir o reconhecimento pela planta e suprimir suas respostas de defesa, além de promover o parasitismo resultando em uma interação compatível (Ellis et al., 2009). Portanto, o conhecimento dos genes expressos pelo fungo e pela planta durante a interação pode facilitar o entendimento dos eventos moleculares que levam ao desenvolvimento da doença ou à resistência da planta. Com base nos genes de resistência do cafeeiro identificados, foram caracterizadas mais de 50 raças de *H. vastatrix* em todo o mundo, sendo 15 delas presentes no Brasil (Gichuru et al., 2012, Zambolim et al., 2016).

A grande variabilidade genética das populações de *H. vastatrix*, tem sido determinada pelo padrão de infecção observado em uma série de 24 variedades diferenciadoras de cafeeiros (Zambolim et al., 2005). As raças mais recentemente descobertas têm sido capazes de infectar derivados de Híbrido de Timor (HdT), a principal fonte de resistência utilizada nos programas de melhoramento genético (Gichuru et al., 2012). Como exemplo podemos citar a raça XXXIII de *H. vastatrix*, identificada no Brasil infectando plantas da cultivar Oeiras MG 6851,40 originada do cruzamento entre *C. arabica* cv. Caturra (CIFC 19/1) e HdT (CIFC 832/1) (Pereira et al., 2000; Capucho et al., 2012).

Embora a fase sexuada de *H. vastatrix* seja desconhecida, algumas evidências têm demonstrado a ocorrência de eventos de recombinação no urediniósporo, sugerindo que uma reprodução sexuada oculta (criptossexualidade), disfarçada na fase assexuada, pode ser uma das responsáveis pela alta variabilidade genética do patógeno (Carvalho et al., 2011). Além disso, a grande proporção de elementos repetitivos encontrados no genoma de *H. vastatrix* (Cristancho et al., 2014) e de outros fungos causadores de ferrugens (Duplessis et al., 2014), pode explicar a alta variabilidade encontrada nestes organismos. Esta alta variabilidade genética favorece o surgimento de novas raças do patógeno que, ao longo do tempo, pode levar à suplantação da resistência no campo (Várzea et al., 2005). Portanto, identificar os mecanismos moleculares utilizados pelo fungo para infectar seu hospedeiro é fundamental para compreender a suplantação da resistência pelas novas raças fisiológicas de *H. vastatrix* e, também, para o desenvolvimento de formas alternativas de controle da doença.

Embora *H. vastatrix* tenha polimorfismo genético limitado, o seu grande genoma de aproximadamente 797 Mbp esconde uma grande diversidade patológica com a existência de mais 50 raças fisiológicas espalhadas pelo mundo. Estudos da expressão gênica revelaram a ativação precoce da sinalização e a expressão de candidatos a efetores, logo nas primeiras horas do processo infeccioso etapa importante para identificação dos genes Avr (Talhinha et al., 2017).

Sabe-se que os efetores secretados pelos fitopatógenos representam uma das diversas estratégias de ataque ao hospedeiro e que inúmeros efetores têm potencial para manipular a defesa das plantas. Eles são essenciais para a sua virulência, pois promovem a sua aptidão reprodutiva por meio da manipulação e supressão das respostas fisiológicas e do sistema de defesa inato do hospedeiro durante a infecção (Duplessis et al., 2011; Petre et al., 2014). Desta forma, as técnicas moleculares contribuem para elucidar os

complexos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nessa interação planta-patógeno. Alguns estudos da interação cafeeiro-*Hemileia* têm permitido a identificação de genes diferencialmente expressos ao longo do processo infeccioso. Em plantas de cafeeiro infectadas pelo fungo têm sido verificadas a expressão de genes relacionados com os processos de reconhecimento, sinalização, comunicação celular, defesa e metabolismo (Fernandez et al., 2004; Guzzo et al., 2009; Diola et al., 2013). Para o fungo, tem sido demonstrada a expressão de genes envolvidos principalmente nos processos de sinalização, estabelecimento e manutenção da biotrofia (Fernandez et al., 2012; Vieira et al., 2012; Talhinhos et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, efetores são fatores de virulência, mas cada um contribuindo parcialmente para a virulência final. Efetores independentes podem atuar de forma redundante, podendo alterar uma mesma via de sinalização do hospedeiro. Portanto, os genes efetores podem ser perdidos sem causar impacto significativo na virulência do patógeno. Com exceção, dos “efetores fundamentais”, que estão amplamente distribuídos na população de um determinado patógeno, contribuindo para a sua virulência (Dangl et al., 2013). Portanto durante o processo infeccioso com a formação do haustório, proteínas são secretadas na célula do hospedeiro e podem efetuar mudanças na transcrição, metabolismo e defesa da planta. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi encontrar polimorfismo que estão potencialmente envolvidos no processo de infecção que estivessem associadas com as diferentes raças do patógeno existentes no Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. População de *Hemileia vastatrix*

Cinquenta e seis isolados de *Hemileia vastatrix* coletados nas principais regiões produtoras de café no Brasil. Foram coletados dos estados de Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia e caracterizados em raças e patótipos, através de inoculação em plantas diferenciadora de raças. Os isolados foram inoculados em cafeeiro suscetível CIFC 19/1 e coletado uma monopustula e multiplicado para extração de DNA e caracterização. 56 deste isolados se encontra na micoteca do Laboratório Biotecnologia do Cafeeiro (Biocafé) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.2. Extração DNA genômico

Para a extração do DNA genômico do fungo foram utilizados de 30 a 50 mg de urediniósporos utilizando o protocolo de Raeder & Broda, (1985) com modificações. O material foi triturado em nitrogênio líquido em um microtubo de 1,5 mL, com auxílio de um pistilo plástico, e adicionado 600µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM e SDS 2%). Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos e, posteriormente, foi adicionado fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1. As amostras foram agitadas manualmente por 10 minutos, e centrifugadas a 10.000g rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes cuidadosamente transferidos para tubos novos, onde foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram manualmente transferidos para tubos novos, e adicionados um volume igual de isopropanol gelado e 0,1 do volume de acetato de amônia 7M e homogeneizado por inversão para precipitação do DNA. Após a incubação a -20 por 30 minutos, os tubos foram novamente centrifugados a 10.000g por 15 minutos, e os sobrenadantes descartados. O DNA genômico foi lavado com etanol 70% por duas vezes e centrifugado por a 10.000g por 5 minutos entre as lavagens. O precipitado (*pellets*) secos em temperatura ambiente foram ressuspendido em água MilliQ. Em seguida, foi adicionada RNase na concentração de 10 ng/µl, mantendo-se os tubos a 37°C por 30 minutos. A quantificação do DNA de cada isolado foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 e a sua qualidade confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os DNAs foram diluídos para a concentração final de 25 ng/µl e armazenados a - 20°C até o uso.

2.3. Genes candidatos a efetor selecionados

Os genes candidatos a efetores foram obtidos do banco de dados do genoma de *H. vastatrix* pertencente à raça XXXIII (Porto., 2016). Esse banco foi constituído a partir do sequenciamento *de novo* do genoma do fungo, em que, por meio de análises utilizando diferentes algoritmos, obteve-se a predição do secretoma da espécie. Foram obtidos 615 genes que codificam para proteínas potencialmente secretadas, sendo essas consideradas candidatas a efetores (Porto et al., 2016). Para auxiliar a seleção de genes candidatos a serem analisados, as sequências de proteínas secretadas foram, comparadas com bibliotecas de RNASeq da interação compatível do cafeeiro e *H. vastatrix* (raça XXXIII) (Lopes, 2016). Com base nos resultados de um BLASTp, foram selecionados 47 genes

que apresentaram similaridade com sequências expressas às 12h e 24h após infecção. A partir das sequências selecionadas foram desenhados primers utilizando o programa Primer-3, e primer express que foram utilizados nas reações de PCR e RT qPCR. Sete desses genes foram sequenciados pela *Macrogen Advancing throughout Genomics-South Korea*.

2.4. Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

Os 47 genes candidatos foram usados e amplicados nos 56 isolados de *H. vastatrix*. As reações de PCR foram realizadas 20 µl contendo 1x de Tampão da Taq Polimerase, 150µM dNTPS, 0,1 µM de cada *primer*, 1,0 mM de MgCl₂, 0,6U de Taq, 50ng de DNA genômico e água MilliQ para completar a reação. A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial a 94 ° C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 ° C por 1 min, 58° C por 1 min, 72 ° C por 1 min e uma extensão final a 72 ° C por 8 min. O tamanho esperado fragmento amplificado foi confirmado por eletroforese em gel de agarose.

O polimorfismo dos genes candidatos a efetores nos 56 isolados de *Hemileia vastatrix* foi verificada em gel de poliacrilamida desnaturante 6%, corado com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito et al. (2010).

Para sete genes fragmentos do tamanho esperado foram purificados com o kit de PCR GFX DNA e ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent, e sequenciado pela *Macrogen Advancing throughout Genomics-South Korea*.

2.5. Extração de RNA total de tecido inoculado

O padrão de expressão de sete genes candidatos foi verificado por RTq-PCR. Para isso, folhas de café inoculados com *H. vastatrix*, tanto na interação compatível quanto incompatível, foram coletadas 12 e 24 horas após infecção (hai). As folhas foram coletadas maceradas separadamente em N₂ líquido e adicionado polivinilpirrolidona (PVP) para a extração de RNA utilizando-se Concert® (Invitrogen) protocolo de Paula (2012) com modificações. Foram utilizadas três plantas da interação cafeeiro suscetível Caturra e três de HdT CIFC 832/2, considerado resistente. Cerca de 100 mg de material vegetal foi alíquotado em tubos de microcentrífuga de 2,0 mL de capacidade. Em seguida, adicionou-se 600µL de tampão de extração Concert®. A amostra foi homogeneizada com o tampão por 1 min utilizando um vortex e mantida a temperatura ambiente por 5 min. Após da incubação, o material foi centrifugado a 10.000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo de 2,0 mL de capacidade contendo

100µL de NaCl 5M. No mesmo tubo foi adicionado 300µL de Clorofórmio (PA), e então homogeneizado em vortex por 20s. A suspensão foi centrifugada a 10.000g por 10 min a 4°C. O passo anterior foi repetido para que o sobrenadante se tornasse totalmente limpo. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5 ml e adicionou-se igual volume de isopropanol a -20 °C. A mistura foi incubada a -20 °C por 20 min, seguindo-se centrifugação a 10.000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi imediatamente descartado e o *pellet* lavado com 500µL de etanol 80 %, e centrifugado novamente por 2 min a 10.000g a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* seco à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em 30 µL de água tratada com DEPC e armazenado a -80°C até o momento do uso. O RNA total foi quantificado com o auxílio do Qubit RNA BR (Life Technologies) e espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific), e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5 %) corado com 1 µL de brometo de etídio.

2.6. Germinação dos urediniósporos de *H. vastatrix* e extração de RNA.

Foram ressuscitados 10 mg de urediniósporos em 1mL de água destilada, e distribuídos em 250µL da suspensão para tubos falcon de 50mL contendo 50mL de água destilada. Foram distribuídos aproximadamente 20ml da suspensão em placas de petri e levadas a BOD a 22°C por 12h no escuro. Para recuperação dos urediniósporos germinados, um pincel foi utilizado para deslocar o tubo germinativo que se aderiram no fundo da placa. Os urediniósporos foram recuperados em tubos falcon e centrifugados por 20 min a 4.000 rpm para concentrar os esporos em um único tubo. A extração de RNA dos urediniósporos germinados foram feitos utilizando-se o Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen) como extrator, seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado com o auxílio do Qubit RNA BR (Life Technologies) e espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific), e sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio. As amostras de RNA foram armazenadas em ultrafreezer -80 °C até a utilização.

2.7. Amplificação e sequenciamento de candidatos a efetores de *H. vastatrix*

A região do gene dos sete genes candidatos a efetor *Hemileia vastatrix* P-17, P-19, P-34, P-37, P-38, P-42, e P-48 foi amplificada por PCR utilizando iniciadores P-17F (5'ACTGTCCCACCAGCAATAGG-3') e P-17R (3'ACAAGTCTGCTGACCCATCC-5'), P-19F(5'-TTCTATCGTCGCTCCTCCCA-3') e P19R(3'GGGCCACAACATCATA

GCCT-5'), P-34F(5'-ATGGTCCTTTTCGACTCTTCT-3') e P-34R (3'CTGATCCATAA GACCTTTCG-5'), P-37F (5'GGTACCTGTTGTTCTAAGTG-3') e P-37R (3'-CCTGAA ACTTCCAGTAGAG-5'), P-38F (5'-GAGAAACTCCCTTCTTCTC-3') e P38R (3'AGG AAGTAGATGGGGTAGTA-5'), P-42F (5'GATCCTGCTATTCAACTTGC-3') e P42R (3'AATATGCTGAGTCTCCAAGG-5'), P48F (5'CCCCTCTCTAGTACCACCTT-3') e P 48R (3'AGCTATCACCCTTCCACCAC5').

2.8. Análises de expressão gênica

A síntese de cDNA foi realizada com 3 µg de RNA total, pré-tratado com 1 µL de DNase por 15 min (50 U/µL, Amplification Grade DNase I, Invitrogen). A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System Protocol RT-PCR (Promega), segundo as orientações do fabricante. O cDNA foi armazenado a -20 °C, até a utilização. Para a realização do PCR quantitativo em tempo real, em aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), foi utilizado sistemas de detecção de fluorescência SYBR Green I (Applied Biosystems, California, USA). Para cada reação utilizou-se 1µL da diluição da reação de síntese de cDNA de fita simples, 1,5µL de cada iniciador, 5µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 1µL de água estéril, para um volume final de 10µL. As condições térmicas da reação foram: 95°C por 10 minutos para a desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por segundos e finalizando com 95°C por 15 segundos. O nível de expressão dos genes foi calculado pelo $\Delta\Delta C_t$, Log_2 fold change ≥ 0.5 and Log_2 fold change ≤ -0.5 , with q value of 0.1. Sendo utilizados os valores médios de C_t , resultante de três réplicas biológicas e três réplicas técnicas. Para a normalização dos dados foram utilizados genes constitutivos selecionados de *H. vastatrix*, o CytIII (citocromo C oxidase subunidade III) e β tub (β -tubulina) Fator Elongação I (EF1) que já foram validados como normalizadores para análises de expressão de genes de *H. vastatrix* em planta (Vieira et al., 2011).

3. RESULTADOS

Utilizando genes candidatos a efetor preditos do genoma de *Hemileia vastatrix* raça XXXIII por Porto, (2016), quarenta e sete sequências foram utilizadas. A escolha foi feita por meio de comparação com transcriptoma da interação compatível e incompatível temporal de *Hemileia vastatrix* raça XXXIII, em 12hai e 24hai (Lopes, 2015). Foram

escolhidos alguns genes expressos em uma das interações e outros nas duas interações. Utilizando programas como Pfam (Fin, 2016) e Uniprot (Homish, 2013) foram identificados domínio conservados em 17 genes escolhidos, são eles: P-1, P-2, P-4, P-14, P-15, P-19, P-26, P-28, P-33, P-34, P-35, P-37, P-38, P-39, P-40, P-44 e P-47, destes apenas P-19, P-26, P-38, P-39, P-40 e P-47 tiveram sua predição através do Blastp (Tabela 1). Pouco se sabe sobre os genes que estão envolvidos no patossistema *Hemileia vastatrix* e café, no entanto para este estudo foram escolhidos os genes candidatos não caracterizados e os que apresentaram homologia a genes conhecidos de *Melampsora lini* e *Puccinia graminis*. Primer específicos foram desenhados através do site Primer3, as sequências dos primers e amplificação para os 56 isolados. Não foi possível verificar diferença no tamanho do fragmento amplificado nos 56 isolados, para os 47 genes estudados. Esses resultados indicam, que esses genes são conservados no genoma e estão presentes em todos os isolados de *H. vastatrix*, mas não necessariamente com as sequências idênticas.

Tabela 1. Categorização dos 47 genes da predição das proteínas secretadas de *Hemileia vastatrix* e seus iniciadores.

Gene	Pfam	Blastp (uniprot)	Primer forward	Primer Reverse
P-1	Thioredoxin		TTCTTTCCTTCGGATGGCGA	ATGGGCCGTGTACATGGTTG
P-2	DDE endonuclease		GCTTTCCTGGTGCAACTTC	GCGTATGCCGGTTGATTGAA
P-3	-	Proteína não caracterizada	GCTCCTGATGGATGTGGATT	CCATGGAGGCTCAAACATCAT
P-4	DDE endonuclease	Proteínas não caracterizada	TGGCCATCACACTATGTCGT	CCGCCTCCATTTTCAGATTTA
P-5	-	Proteína não caracterizada	TGCCATTCACTTTCTGTTGC	ACTCTTGATTGGGCAAGGTG
P-6	-	Proteína não caracterizada	AAACTGCTGCTGGAGTGGAT	GACATACTTGGCACACCCCT
P-7	-	No hits	ATGGGCCTCTTCCAATTCTT	TTTCCAACATTGCCCTAAC
P-8	-	Proteína Membrana	ATCCTCGTCAACCGTACCACT	GCGGGAAGCCAGAAGACTA
P-9	-	Putative secreted protein (NC)	CGGTCACACGACCTTGGAT	CCATCGGTAATCTTGGCTGT
P-10	-	Putative secreted protein	GTTCCACCCACAGTACCAGG	GCTGCAGGTACAGAGTTGGT
P-12	-	Putative secreted protein	ACCACTTTTGGACGTTCTCG	ATGCAAGCTTACAGCCACCT
P-14	GPI(Ser-Thr-rich)Glycosyl	Putative secreted protein	CCGTTCAATTGATTGGCGGA	TTCGCCGCTGTGTTACTTTC
P-15	DDE endonuclease	Proteína não caracterizada	GAATCCGGAATTTCTGTGGA	CATGATGAAGGGCAGCATT
P-16	-	Proteína não caracterizada	TGCTCTCCCATCCTTGAATC	TTTGAGGGATGTTGGAGGAG
P-17	-	Putative secreted protein (NC)	ACTGTCCCACCAGCAATAGG	ACAAGTCTGCTGACCCATCC
P-18	-	Putative secreted protein	GCCCACTTCACCCAAAGTTA	AATGACGATGGGTCTGGTTT
P-19	Aspartyl protease	Aspartyl protease	TTCTATCGTCGCTCCTCCCA	GGGCCACAACATCATAGCCT
P-20	-	Putative secreted protein	GCCCACTTCACCCAAAGTTA	AATGACGATGGGTCTGGTTT
P-21	-	Copper amine oxidase-like	CACCGTCCACCAAAGCATC	GTGTATCCACCATGAGGGGC
P-22	-	Proteína não caracterizada	TGGGTAAAAAGGCGCTTGGG	CAAAGCAAACCTAGCTGCGG
P-23	-	Proteína não caracterizada	CCTTGCCCCGAAAAACACAC	CTAGGCGCTTCGTTACTGCT
P-24	-	Putative secreted protein	TTCAGACGATTGCACTGGAG	GCCGTTGTAATGGAGGAAAA
P-25	-	Putative secreted protein	CATGGTATACGGGCGAAGAT	CTTTTGGGCCGTAAAGTTCA
P-26	Transglicolase lítica	Expansin	CATTCATGCACGTCCTTTG	TGCAGCAGGAGATAAATCCA
P-27	-	Putative secreted protein	ACCCCACTGCTGGTTTTG	CTCCGCATCATCGCTACCAC
P-28	Thioredoxin	Proteína não caracterizada	TCTCTTTGCTGTTTCTCTTC	ATGGGTGTTGTCAGTTTAGC
P-29	-	Putative secreted protein	GACTCTGATTTGGAAGATGC	GCAGCCAAGTACCATATCC
P-30	-	Proteína não caracterizada	TGTCTTAGCTCCTGATGGAT	GCCCTGAAGATTTGAAGTAG
P-31	-	Proteína não caracterizada	GAAATGGTGCTTCTACGTTT	ACAAAACCTACACAGCAAGG
P-32	-	Proteína transmembrana 14C	CATTGCACTCGGTGTCTAC	GAGAGATAAGAGCGGTGAGA
P-33	Aspartyl Protease	Proteína não caracterizada	GTCCAGATCGAGTCTACTGC	AAGGATCACTATGCAACAGC
P-34	Login Regulatad SNARE	Putative secreted protein	ATGGTCTTTTCGACTCTTCT	CTGATCCATAAGACCTTTTCG
P-35	JmjC, Hydroxylase	Proteína não caracterizada	GTAICTCAAGAGATGGATGG	GCTGGTACATTAAGTCAGG

Tabela 1. Continuação.....

P-36	-	Proteína não caracterizada	TGTCACTCTATGGTATCGTG	CTCCTAGCTGGATCATAAAC
P-37	HECT Ubiquitin-transferase	Proteína não caracterizada	GGTACCTGTTGTTCTAAGTG	CCTGAAACTTCCAGTAGAG
P-38	P21-Rho- binding domain	Proteína serine/threonine Kinase	GAGAAACTCCCTTCTTCTC	AGGAAGTAGATGGGGTAGTA
P-39	FN3- like domain	Subtilisin protease	CTAGAAGATTGGGAACAACG	GAATCCAGAGAAGGGAGAGT
P-40	Superóxido desmutase	Superóxido dismutase	TAGCTGTCCTCTCTCAAAGC	CGGCCAAGTATACTGAAGTC
P-41	-	Proteína não caracterizada	GACTCTGATTTGGAAGATGC	TGAGCCAAAGTGACATAGTG
P-42	-	Proteína Hipotética	GATCCTGCTATTCAACTTGC	AATATGCTGAGTCTCCAAGG
P-43	-	Proteína não caracterizada	ACGGCTACTTCACTCCACTA	ACGGCTACTTCACTCCACTA
P-44	SNF2-N – terminal domain	Proteína não caracterizada	ATGTCCAATCCTGAACTACG	TAACCAGTCTTCTTGCCACT
P-45	-	SCY1 Proteína Kinase	CTTTCTCAGTCCGAATTCAC	CTTTGCGAACACACTCTACA
P-46	-	SCY1 Proteína Kinase	CTTTCTCAGTCCGAATTCAC	CTTTGCGAACACACTCTACA
P-47	P Kinase	CMGC/CDK/CRK7 P Kinase	GCGCCATCTTTCTAGAGTTA	TCTAGTTCATGCCATTCTCC
P-48	-	Proteína não caracterizada	CCCCTCTCTAGTACCACCTT	AGCTATCACCCTTACCAC
P-49	-	Proteína não caracterizada	ACGGCTACTTCACTCCACTA	ATAGAGCAACAGCAAGTTGG

Com as 47 seqüências dos genes candidatos a efetores, foi realizada uma análise de categorização funcional, com o *software* BLAST2GO. Apenas 43 tiveram anotações distribuídas para categoria Processos Biológicos. Nesta categoria o “processo metabólico” e “processo celular”, foram os termos mais representados com 10 e 9 proteínas, respectivamente (Figura 1). Quarenta e três das proteínas categorizadas estão ligadas a pelo menos em um processo biológico, sendo assim essenciais para o seu desenvolvimento e no processo infeccioso do fungo.

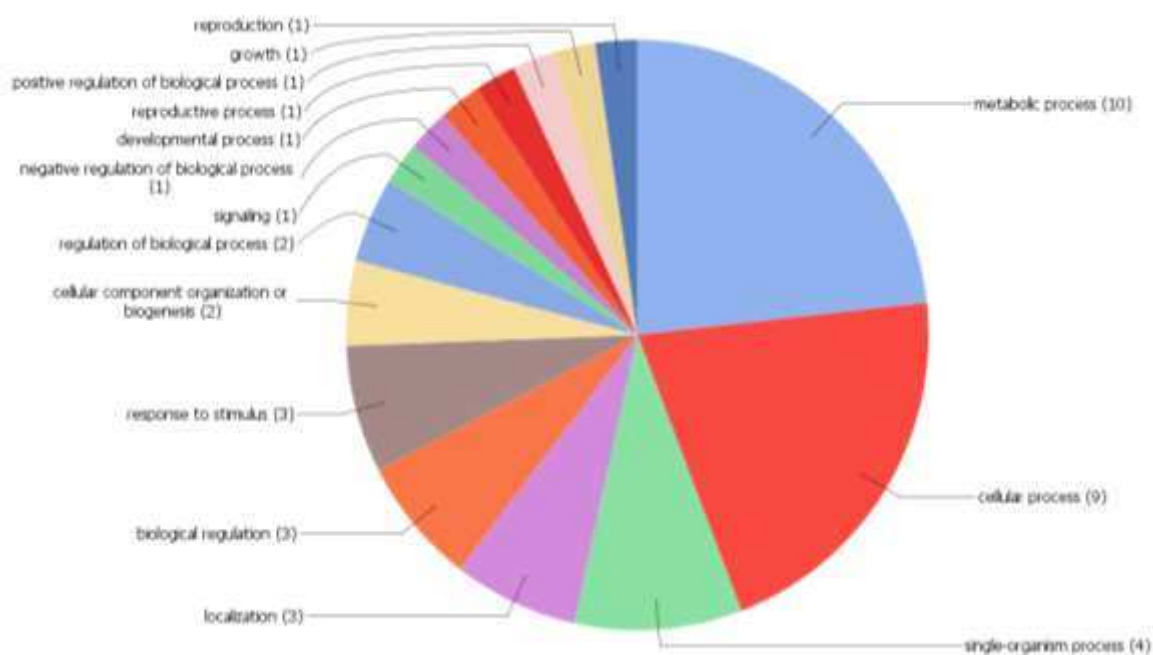


Figura 1. Distribuição da categorização GO para função Processo biológico de 47 candidatas a efetora de *H. vastatrix* raça XXXIII, que apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-5}$) com as seqüências de proteínas depositadas nos bancos de dados (NCBI/UNIPROT), utilizando o *software* BLAST2GO

Sete genes que codificam possíveis proteínas efetoras foram estudados com mais detalhes, sendo estes: P-17, P-19, P-34, P-37, P-38, P-42 e P-48. Foi caracterizada do perfil de expressão desses genes por meio de PCR em tempo real, durante a interação compatível e incompatível com o cafeeiro. Observou-se que os genes P-19, P-34 e P-37 não apresentaram diferença significativa entre tempo e interação (Figura 2).

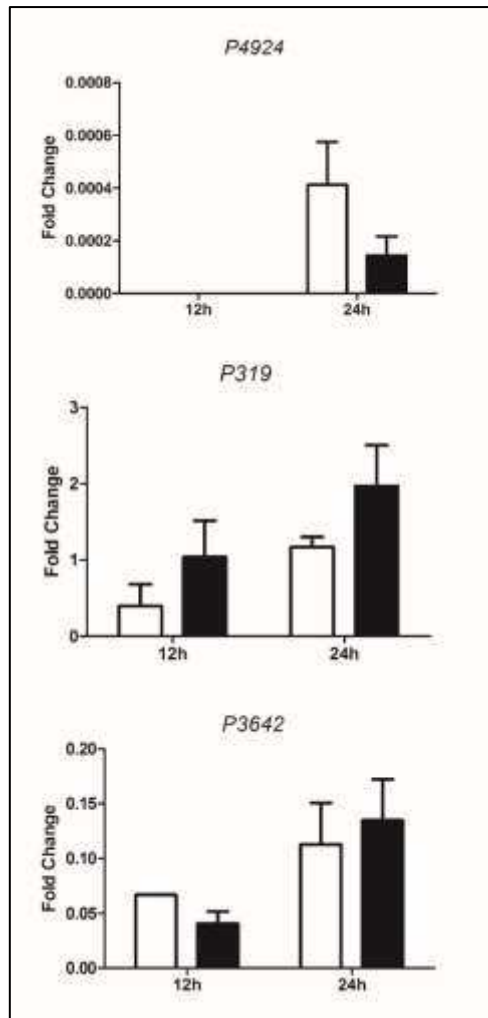


Figura 2. Análise de expressão por RT qPCR genes candidatos a efetores P-19, P-34 e P-37 de *H. vastatrix*. O padrão de expressão foi determinado em 12 hai e 24 hai, após a inoculação das plantas com urediniósporos em reações incompatíveis e compatíveis. A expressão dos genes alvos foi normalizada com três genes endógenos de *H. vastatrix*: CytIII, β -tub e EF1.

Em genótipo de cafeeiros suscetíveis à *H. vastatrix*, o processo de infecção completa com esporulação sobre a superfície externa da folha, via estômatos em torno de 20 dias, após a infecção (Silva et al., 1999). Já, em genótipos de cafeeiros resistentes à doença, o crescimento do fungo é impedido nas primeiras fases do processo infeccioso devido à reação de HR (Silva et al., 2002, 2006). Embora estes eventos sejam bem descritos no patossistema cafeeiro *H.vastatrix*, diferenças temporais no desenvolvimento do fungo e nas respostas de defesa da planta podem ocorrer, dependendo do genótipo de cafeeiro e da raça do patógeno envolvidos. Observações citológicas, realizadas por Lopes (2015), mostraram que a resistência do cafeeiro Híbrido de Timor (CIFC 832/1) à *H.vastatrix* raça XXXIII é uma resistência pré-haustorial, ocorrendo com 17 hai, ao contrário da resistência pós-haustorial que é geralmente descrita para interações cafeeiro

- *H.vastatrix* (Silva et al., 2002). No entanto para este estudo foram utilizadas apenas os tempos 12 h e 24 h após a inoculação. Para os genes P-17, P-38 e P-42 houve uma diferença significativa no tempo entre a interação compatível e incompatível (figura 3). O gene efetor de *H vastatrix* HvEC-016 caracterizado recentemente por Maia, 2016 foi utilizado como referência de perfil de expressão de efetor. O gene HvEC-016 teve sua maior expressão 12 hai. Os genes P-17 e P-42 tiveram sua expressão aumentada significativamente em 24 hai na interação compatível, sendo assim estas proteínas relacionadas com processo infeccioso do fungo. Na interação incompatível houve um aumento significativo da expressão em 12 hai para o gene P-38, gene este caracterizado como sendo uma quinase. Este resultado pode ser, devido a proteínas quinases ser a maior família de proteínas em eucariotos elas são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais, isso pode explicar o seu aumento em uma interação incompatível onde o fungo busca vencer os mecanismos de defesa do hospedeiro.

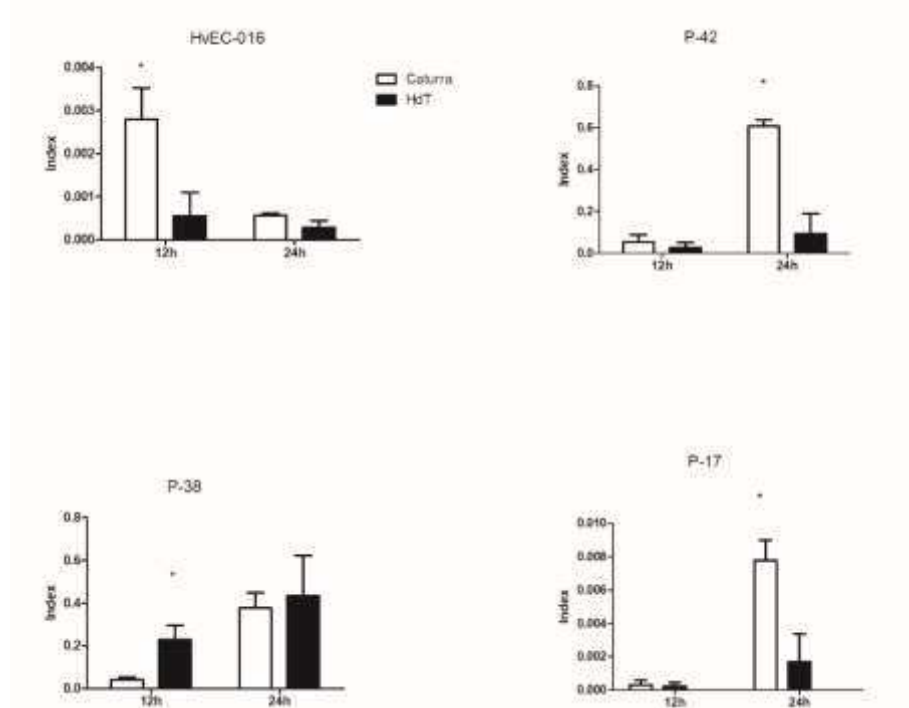


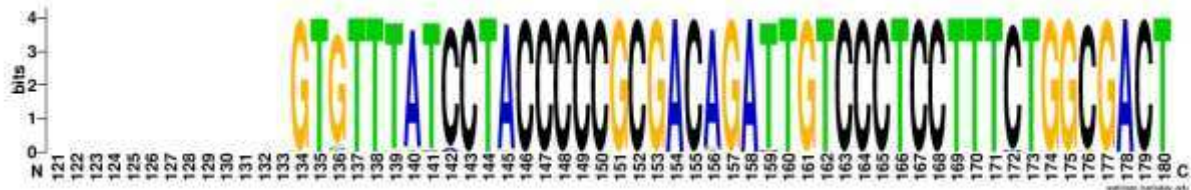
Figura 3. Análise de expressão por RT qPCR de 3 genes candidatos a efetores de proteínas secretadas e do efetor HvEC-016 de *H vastatrix*. O padrão de expressão foi determinado em 12, 24 hai de uredinósporos em plantas com reações incompatível e compatível. A expressão dos genes alvos foi normalizada com três genes endógenos de *H. vastatrix*: CytIII, β -tub e EF1.

Para verificar se os fragmentos de DNA, dos sete genes, amplificados nos diferentes isolados apresentam polimorfismo na sequência, os produtos da amplificação nos diferentes isolados de *H. vastatrix* foram analisados. Foram consideradas apenas as

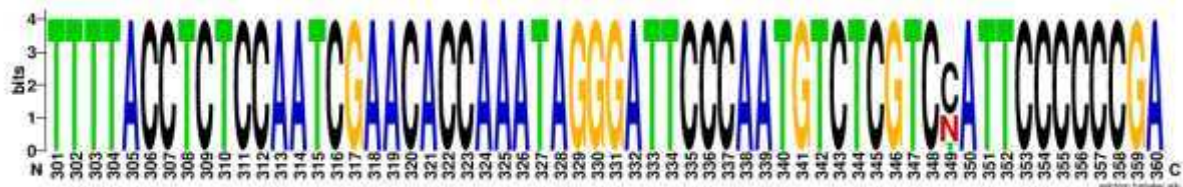
sequências de alta qualidade, de forma que se analisou DNA de 44 isolados. Foram utilizadas para análise apenas as regiões codificantes (exons), a região dos introns das sequências de cada isolado foram removidas de acordo com o gene referência preditos por Porto (2016), usando o programa online ClustalW. Considerando apenas as regiões que foram amplificadas, sendo que não foi possível sequenciar todo o gene. As sequências das regiões codantes das diferentes raças foram comparadas. Utilizando o programa online Weblogo (Crooks et al., 2004) diferenças nas posições das sequências foram destacadas. Posição mostrando o nucleotídeo menor corresponde a variação, e quando não há diferença com frequência de 100% a base representada é maior (Figura 4).

Os resultados mostram que todos os isolados apresentam o gene em estudo, mas, que há diferenças em suas sequências. Posição na sequência com base representada por N, corresponde a indivíduos heterozigotos e foi observado nos genes P-19, P-34, P-38, P-42 e P-48. *Gaps* também foram observados com relação aos genes de referência. Mesmo uma pequena mutação gênica levando a mudança de um único nucleotídeo pode ter efeitos fenotípicos. Algumas alterações no DNA, entretanto, não têm efeito fenotípico, uma translocação ou inversão pode não afetar a transcrição e tradução do gene e pode não ter quaisquer efeitos fenotípicos.

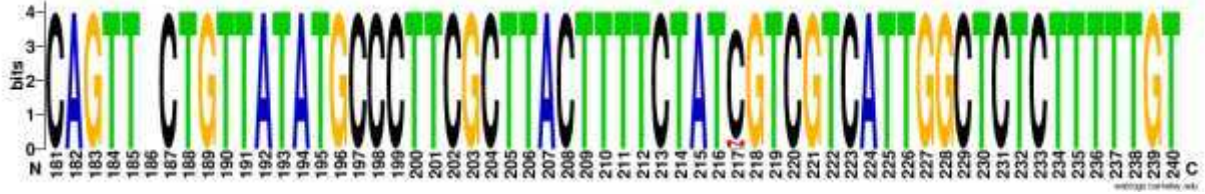
P-17



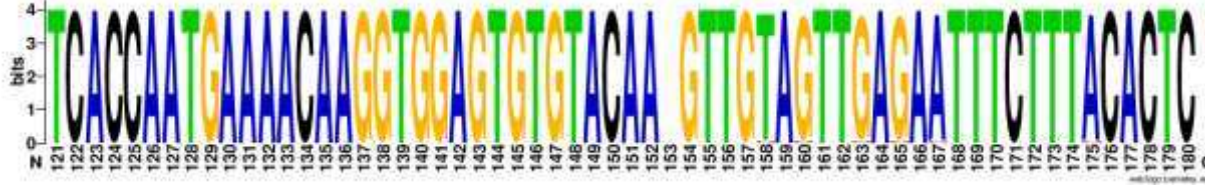
P-19



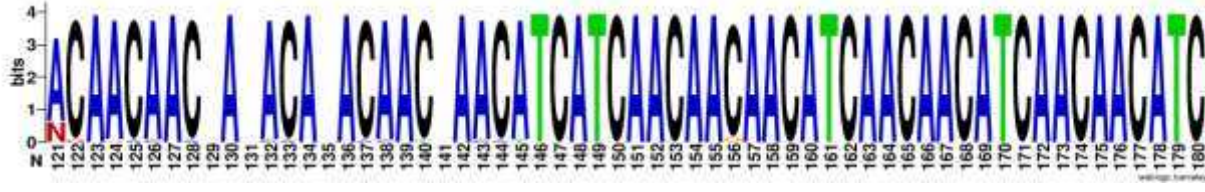
P-34



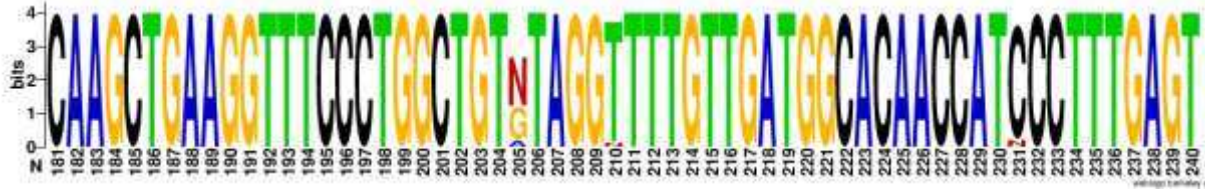
P-37



P-38



P-42



P-48

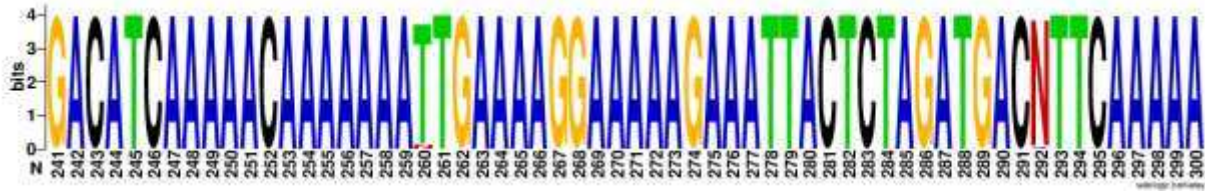


Figura 4. Alinhamento da região dos exons dos sete genes estudados em 44 isolados. Foi apresentado apenas a região onde foram polimorfismos dos exons usando o *software* Webelogo. Posição apresentada como N destacada na posição do alinhamento como heterozigoto.

As variações nas sequências dos isolados foram comparadas com fenótipo da interação com o cafeeiro através do método de agrupamento Neighbour-joining pelo programa ClustalW (Figura 6). Para o gene P-42 Todos os sete genes em estudos foram analisados, a figura 6 representada apenas com gene P-42. O agrupamento mostrou que não há uma correlação das variações na sequência de DNA e o fenótipo, mostrando que as raças e patótipos não se agrupam diversas respostas com o genótipo diferenciador. O mesmo ocorre para os demais genes.

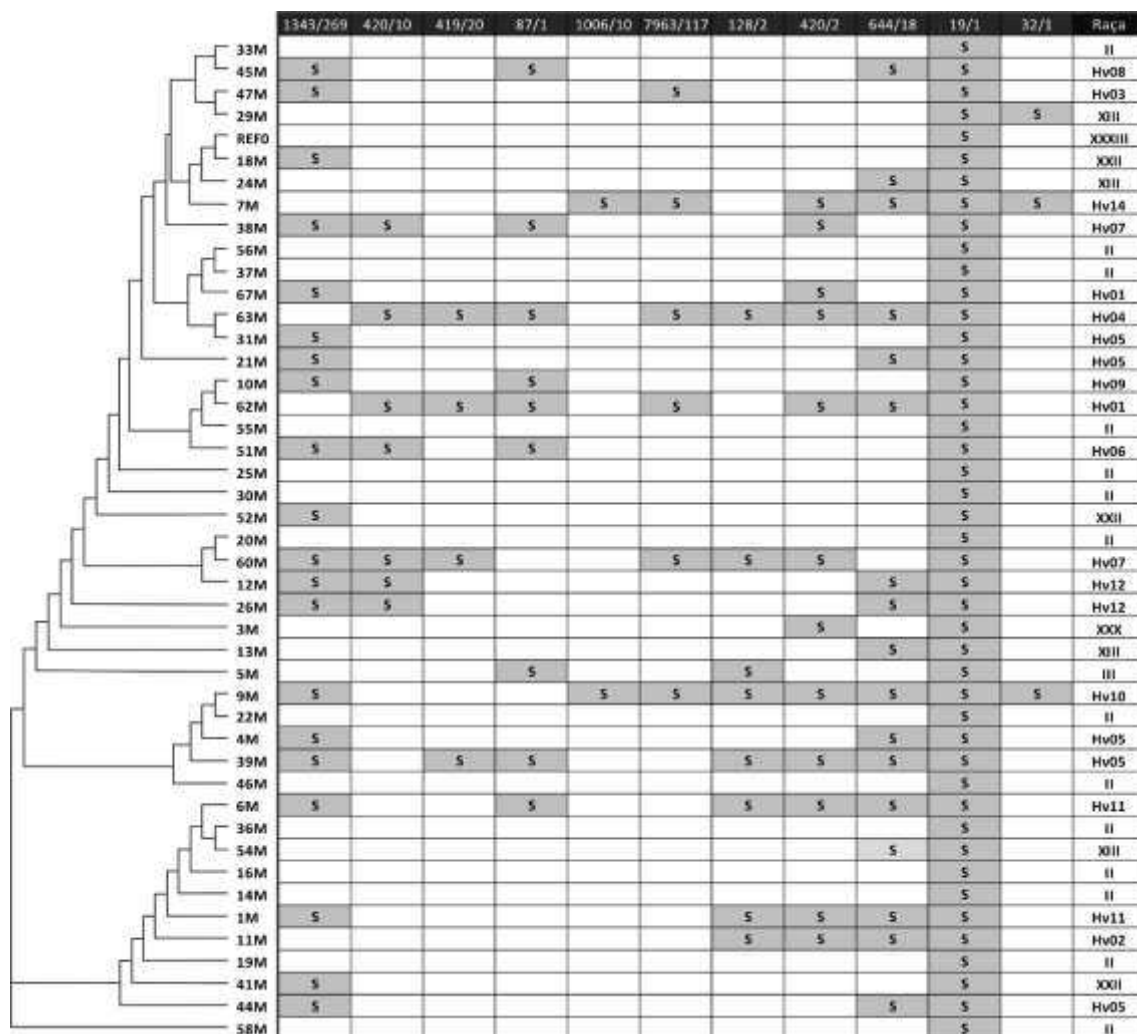


Figura 5. Arvore filogenética Neighbour- joining para o gene P42, considerando a sequência de 44 isolados de *H vastatrix* correlacionado as interações compatíveis das plantas diferenciadoras.

Apesar de anos de pesquisa neste patossistema, os genes Avr de *H. vastatrix* foram pouco estudados. Recentemente Maia et al (2016) publicaram o gene HvEC-016 como codificando uma candidata a proteína efetora reconhecida em genótipos com o gene *SH1*. Como para *H. vastatrix* não temos nenhum efetor caracterizado, o gene HvEC-016 foi utilizado, para elucidar sua resposta em genótipos com interação compatível e

incompatível. Para isso seis isolados foram utilizados, três com interação compatível (5M, 60M e 459) e três com interação incompatível (16M, 45M e 55M). Um par de *primer* foi desenhado a partir da sequência do HvEC-016 depositada em Banco de dados (NCBI) e usado para amplificar os seis isolados. A amplificação resultou em um fragmento de 867 pb observados tanto nos isolados que apresentaram interação compatível quanto incompatível (Figura-6A). Os seis fragmentos foram sequenciados e com base na sequência referência HvEC-016 foram removidas as regiões dos introns. Apenas a região codificadora foram alinhadas com o gene referência. Para os isolados 55M e 459 foram identificados diferença com presença das bases citosina e timina mostrado pelo código Y na mesma posição (Figura-6B). O alinhamento das sequências traduzidas em aminoácidos mostrou que tanto em uma interação compatível e incompatível as sequências são conservadas, e a diferença para 55M e 459 não explica o fenótipo da planta diferenciadora 128/2. (Figura-6C). Isso nos mostra que patossistema de *H. vastatrix* e o cafeeiro é muito complexo, mostrando não estar apenas ligado a uma única mutação na sequência que esta sendo reconhecida pelo fator de R do hospedeiro.

4. DISCUSSÃO

Apesar de muitos anos de pesquisa no patossistema cafeeiro x *H.vastatrix*, os genes *Avr* do fungo foram pouco estudados e ainda não há nenhum gene *Avr* caracterizado. Há muitas dificuldades para estudar este patossistema como: por se tratar de um fungo biotrófico, ainda há a dificuldade de se obter isolados puros, são utilizadas culturas a partir de urediniósporo, apenas monopustular. Até o momento, poucos efetores para o grupo das ferrugens foram identificados ou caracterizados. Mas com os avanços no sequenciamento completo de genoma tanto do cafeeiro como do fungo, a predição de genes candidatos a efetores tem tornado o caminho mais fácil. Um dos aspectos mais importantes na busca de informações biológicas em um contexto genômico é a associação das sequências de DNA com as suas respectivas funções biológicas. Visando entender melhor a interação do cafeeiro x *H. vastatrix*, alguns genes preditos por Porto, (2016), foram estudados no presente trabalho.

Quarenta e sete genes candidatos a efetores foram analisados em 56 isolados de *H. vastatrix*, tais genes mostraram ser altamente conservados no genoma de todos os isolados. Estima-se que o tamanho do genoma de *H. vastatrix* seja em torno de 800 Mbp (Talhinhas et al., 2017). Em comparação com o tamanho do genoma de outras ferrugens, apenas *Gymnosporangium confusum* com 893,2 Mb e *Puccinia chrysanthemi* com 806,5 Mb (Tavares et al., 2014) possuem genomas maiores. As demais ferrugens de grande importância econômica, como *P. graminis f. sp. tritici* (88,6 Mb), *P. striiformis f. sp. tritici* (64,8 Mb), *M. larici-populina* (101,1 Mb) e *M. lini* (189 Mb), apresentam genomas relativamente pequenos (Cantu et al., 2011; Duplessis et al., 2011; Nemri et al., 2014). Talvez isso explique a presença de todos os genes candidatos a efetores presentes em todos os isolados em estudo, que podem estar relacionadas, muitas vezes, com os estágios iniciais da infecção, onde encontram-se, também, as proteínas envolvidas nos “processos metabólicos” “processos celular” que foram encontradas em maior número no genoma de *H. vastatrix*. Durante a interação com o cafeeiro, o fungo secreta proteínas efetoras que modificam a estrutura e função da célula hospedeira, permitindo o estabelecimento da colonização parasitária, estas proteínas podem ser uma *Avr* efetores que são reconhecidos pela proteína correspondente R e levam ao reconhecimento específico das raças existentes do fungo (Zhang et al., 2014), ao passo que alguma mudança no gene *Avr* poderia levar ao não reconhecimento pela proteína R do hospedeiro.

No entanto, sete proteínas candidatas a efetoras foram validadas e a uma predição que todas estão envolvidas diretamente no processo infeccioso do fungo, sendo expressas nas primeiras horas da interação, sendo expressos tanto em cafeeiro suscetível como resistente. Mas, com diferença significativa para os genes P-42 e P-17, que teve um aumento significativo as 24h. O aumento da expressão pode ser resultado do sucesso da infecção e aumento da colonização do hospedeiro pelo fungo. Buscando intender se há uma interação de reconhecimento direto, os sete genes que foram sequenciados, e foi possível identificar diferenças na sequências, principalmente nas regiões codificadoras.

Esses polimorfismos poderiam levar a mudanças dos aminoácidos e conseqüentemente o não reconhecimento pela proteína R do hospedeiro. No entanto, as mudanças não se correlacionaram com o fenótipos nas series diferenciadoras das raças e patótipos. Isto não significa que estas proteínas não sejam proteínas efetoras. Elas podem não estar ligadas diretamente ao reconhecimento específico, mas podem exercer papel importante ainda desconhecido no processo de infecção do fungo. Segundo Maia et al, (2017), observou resposta de HR quando infiltrou cafeeiro com bacterias patogênica clonadas com gene candidato a efetor Hv-016 de *H. vastatrix* no genótipo 128/2 que contém o gene de resistencia S_{H1}, mostrando evidência que o gene HVEC-016 modificou a resposta da bactéria patogênica ao cafeeiro. O mesmo foi sequenciado em isolados de interação compatível e incompatível para o genótipo 128/2, ao passo de verificar se há alguma alteração na sequência que possa explicar o fenótipo.

No entanto, dois isolados de interações diferentes, apresentaram diferença em suas sequências, indivíduos que se comportaram como reconhecimento de heterozigotos com a base C-T, e os demais como homozigotos para base C. Mas, que também não diferiram em relação ao fenótipo do diferenciador 128/2. Nossa compreensão da evolução adaptativa de *H. vastatrix* é pequena, pouco se conhece dos mecanismos geradores da diversidade que tornam muito bem-sucedido e adaptável capaz de suplantar fatores de resistência com certa facilidade. Recentemente foi descoberto em *Puccinia striiformis f.sp. titici* um microRNA como um importante fator de patogenicidade envolvidos na suplantação da resistência em trigo, mostrando que há outros mecanismos de virulência para suplantar a resistência do hospedeiro (Wang et al., 2017).

Como pouco se sabe dos mecanismos de infecção para o excelente sucesso evolutivo de *H. vastatrix*, uma vez que se desconhece o hospedeiro alternativo. No entanto, pode ser que as sete proteínas secretadas não estejam ligadas diretamente ao reconhecimento específico, mas, vale ressaltar que outras proteínas candidatas a efetora

do secretoma de *H. vastatrix*, devem ser estudadas. Por tanto, tais observações como o polimorfismo das sequências, e dificuldade de correlacionar com o fenótipo podem ter um papel importante para esclarecer o que pode estar envolvido nesse patossistema tão complexo. Atualmente a exploração de dados disponíveis, bem como a combinação de diferentes ferramentas, de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica podem ajudar a entender melhor este patossistema. Espera-se que os dados apresentados forneçam um maior entendimento dos possíveis candidatos efetores e que possam auxiliar trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- BETTENCOURT, AJ., RODRIGUES JR. CJ., 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Eds). Coffee Agronomy, **Elsevier Applied Science Publishers LTD**, London and New York, v. 4, p. 199-234.
- BRITO, GG., CAIXETA, ET., GALLINA, AP., MACIEL-ZAMBOLIM, E., ZAMBOLIM, L., DIOLA, V., LOUREIRO, ME. 2010. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica** 173:255-264.
- CARVALHO, CR., FERNANDES, RC., CARVALHO, GMA., BARRETO, WB., EVANS, HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. **Plos One** 6(11): e26387
- CRISTANCHO, MA. et al. 2014. Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-11.
- CAPUCHO, AS., MACIEL-ZAMBOLIM E., FREITAS, RL., HADDAD, F., CAIXETA, ET., ZAMBOLIM, L. 2012 Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. **Austral Plant Dis Notes** 7:189–191
- CROOKS, GE., HON, G., CHANDONIA, JM., BRENNER, SE. 2004 WebLogo: A sequence logo generator, **Genome Research**, 14:1188-1190, (2004)
- DANGL, JL., HORVATH, DM., STASKAWICZ, BJ. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science, New York**, v. 341, n. 6147, p. 746-751, Aug..
- DIOLA, V. et al. 2013. A new set of differentially expressed signaling genes is early expressed in coffee leaf rust race II incompatible interaction. **Functional & Integrative Genomics**, v. 13, n. 3, p. 379-389.
- DUPLESSIS, S., BAKKEREN, G., HAMELIN, R. 2014. Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics. **Advances in Botanical Research**, v. 70, p. 173-209.
- DNA Sequence Assembler v4. 2013, Heracle BioSoft, www.DnaBaser.com
- ELLIS, JG et al. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 399-405.

FAZUOLI, LC., SILVAROLA, MB., SALVA, TJG. 2007. Cultivares de café arábica do IAC: Um patrimônio da cafeicultura brasileira. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 12-15.

FAZUOLI, LC. et al. Café robusta: uma nova opção para a cafeicultura paulista. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 71-74, 2007.

FINN, RD., COGGILL, P., EBERHARDT, RY., EDDY, SR., MISTRY, J., MITCHELL, AL., POTTER, SC., PUNTA, M., QURESHI, M., SANGRADOR-VEGAS, A., SALAZAR, GA., TATE, J., BATEMAN, A. 2016 *The Pfam protein families database: towards a more sustainable future* **Nucleic Acids Research** Database Issue 44:D279-D285

FERNANDEZ, D. et al. 2004. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 6, p. 527-536,.

FERNANDEZ, D. et al. 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**, v. 13, n. 1, p. 17-37.

GODOY, CV., BERGAMIN FILHO, A., SALGADO, CL. 1997. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H. Manual de fitopatologia: doenças de plantas e seu controle. 3. ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**. v. 2, p. 184-200.

GUZZO, SD., HARAKAVA, R., TSAI, SM. 2009 Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 10, p. 625-638.

GICHURU, EK., ITHIRU, JM., SILVA, MC., PEREIRA, AP., VÁRZEA, VMP. 2012. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology** 37:424-427.

HAMISH MCWILLIAM, WEIZHONG LI, MAHMUT ULUDAG, SILVANO SQUIZZATO, YOUNG MI PARK, NICOLA BUSO, ANDREW PETER COWLEY AND RODRIGO LOPEZ. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, Vol. 41, Web Server issue W597–W600 doi:10.1093/nar/gkt376

LOPES, RLF., 2015 Análise citológica e perfil de expressão gênica de *Hemileia vastatrix* (raça XXXIII) na interação com o cafeeiro. **Tese de Doutorado**. UFV.

MCCOOK, S. 2008. “Chronicle of a plague foretold. Crop epidemics and the Environmental History of Coffee in the Americas”, **Varia Historia**, 24, 87-111.

- PAULA, MFB., SÁGIO, SA., LAZZARI, F., BARRETO, HG., PAIVA, LV., JUNIOR, AC. 2012. EFFICIENCY OF RNA EXTRACTION PROTOCOLS IN DIFFERENT TYPES OF COFFEE PLANT TISSUES. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 3, p. 284-293
- PEREIRA AA, et al. 2000. Cultivar de café resistente à Ferrugem: Oeiras-MG 6851. **Revista Ceres**, v. 46, p. 121-124.
- PETRE, B., JOLY, DL., DUPLESSIS, S. 2014 Effector proteins of rust fungi. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 415-416.
- PORTO, NB., 2016. Sequenciamento do Genoma e Identificação de Candidatos a Efetores de *Hemileia vastatrix*. **Tese** de doutorado UFLA.
- RAEDER, U., BRODA, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in **Applied Microbiology** 1:17-20.
- Rodrigues, CJ.1990. “Coffee rusts: History, taxonomy, morphology, distribution and host resistance”, **Fitopatologia Brasileira**, 15, 5-9
- RODRIGUES JR, CJ., BETTENCOURT, A J., RIJO, L. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**, v. 13, n. 1, p. 49-70.,
- RODRIGUES, CJ. 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistances. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 5-9.
- SILVA, MC., VÁRZEA, V., GUIMARÃES, LG., AZINHEIRA, HG., FERNANDEZ, D., PETITOT, A., BERTRAND, B., LASHERMES, P., NICOLE, M. 2006. “Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease”, **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18, 119-147.
- SILVA, MC. et al. 1999. Cytochemical aspects of the plant–rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra) – *Hemileia vastatrix* (race III). **International Journal of Plant Sciences**, v. 160, n. 1, p. 79-91.
- SILVA, MC. et al. 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, n. 4, p. 169-183.
- TALHINHAS, P., BATISTA, D., DINIZ, I., VIEIRA, A., SILVA, DN., LOUREIRO, A., TAVARES, S., PEREIRA, AP., AZINHEIRA, HG., GUIMARAES, LG., VÁRZEA V., SILVA, MDC. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**. DOI: 10.1111/mpp.12512
- TALHINHAS, P. et al. 2014. Overview of the functional virulent genome of the coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* with an emphasis on early stages of infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 88, p. 1-17.

VÁRZEA, VMP., MARQUES, D. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim, L.; Zambolim, E. M.; Várzea, V. M. P. (Eds). **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**. Viçosa: Editora UFV, 2005, p. 53-74.

VIEIRA, A. et al. 2011. Validation of RT-qPCR reference genes for in planta expression studies in *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust. **Fungal biology Reviews**, Amsterdam, v. 115, n. 9, p. 891-901.

VIEIRA, A. et al. 2012. Expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 261-277.

Wang B., Sun Y., Song N., Zhao M., Liu R., Feng H., Wang X., Kang Z. 2017. *Puccinia striiformis f.sp. tritici* microRNA-like RNA 1 (Pst-milR1), an important pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. **New Phytologist**. 215: 338–350

ZAMBOLIM, L. et al. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1999, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1999. v. 1, p. 134-215.

ZAMBOLIM, L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Trop. plant pathol.** v41: p1–8.

Zambolim L, Maciel-Zambolim E, Vale FXR, Pereira AA, Sakyama NS, Caixeta ET (2005) Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim L, Maciel-Zambolim E, Várzea VMP (eds) **Durable resistance to coffee leaf rust**. UFV, Viçosa, pp 53–74

Zhang S., Xu J.R. 2014 Effectors and Effector Delivery in *Magnaporthe oryzae*. **PLOS Pathogens**. v10

CAPÍTULO III

PROTEÍNAS CANDIDATAS EFETORAS DISCRIMINAM O PATÓTIPO HV-09 DE *Hemileia vastatrix*.

PROTEÍNAS CANDIDATAS EFETORAS DISCRIMINAM O PATÓTIPO HV-09 DE *Hemileia vastatrix*.

Silva, R.A., Caixeta, E.T., Ferraz, H., Badel, J., Zambolim, L.

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome), tem se destacado como uma das principais doenças que limitam a produção café. Desde a sua descoberta no século 19 no Sri Lanka, esta doença tem se espalhado rapidamente por todo o mundo e atualmente ocorre em todas as regiões produtoras de café. Apesar da distribuição generalizada e do impacto econômico, pouco se sabe sobre os mecanismos de infecção do patógeno. (Silva et al., 2012).

O gênero *Hemileia* foi descrito pela primeira vez por Berkeley e Broome em 1869, sendo classificado desta forma, devido à forma dos uredóporos, que apresentam uma face lisa e outra equinolada (Hemi, meio e leia, lisa). Os sintomas da ferrugem alaranjada do café são observados na face inferior das folhas, onde aparecem pequenas manchas amarelo-pálidas, as quais evoluem para lesões maiores de aspecto pulverulento (urediniósporos) e coloração amarelo-alaranjada. Já, na face superior, observam-se manchas cloróticas amareladas que correspondem aos limites da pústula na face inferior, a qual necrosa e causa a queda da folha infectada (Fazuoli et al., 2007; Godoy et al., 1997; Zambolim et al., 1999).

Embora, o uso de fungicidas seja uma medida de controle imediato, o plantio de cultivares resistentes é o mais importante. A principal fonte de resistência é o Híbrido de Timor que tem sido utilizado em vários programas de melhoramento e provou ser eficaz, sendo utilizados há mais de 30 anos (Talhinhos et al., 2017).

O avanço da genômica vem impulsionando as pesquisas com genômicas de fungos, demonstrada pela expansão de laboratórios nos últimos cinco anos, que recebe fundos para o trabalho molecular (Bakkeren et al., 2016). Recentemente, os dados do genoma parcial de *H. Vastatrix* com 333 Mb contendo 14 mil genes, foram disponibilizado. Esse banco de dados foi obtido de um conjunto de oito isolados (Cristancho et al., 2014). Mas, ainda são escassos os estudos moleculares relacionados ao efetores e à diversidade genética do patógeno. No entanto, este conhecimento é extremamente útil para a elaboração de estratégias de controle da ferrugem, como o desenvolvimento de cultivares resistentes, estudos epidemiológicos da doença e na

determinação do comportamento evolutivo das populações predominantes do fungo nas regiões de desenvolvimento dos programas de melhoramento e naqueles onde se pretende introduzir o material resistente (Nunes et al., 2009).

O primeiro estudo molecular de variabilidade genética em *H. vastatrix* foi realizado com marcadores RAPD e 45 isolados do fungo. Os resultados mostraram que os isolados pertencentes à mesma raça fisiológica diferiam substancialmente em nível molecular. Os autores concluíram que a variabilidade do fungo poderia estar relacionada a mudanças genéticas independentes da virulência, e que a estrutura genética populacional do fungo era consistente com uma reprodução clonal e desestruturada em relação a raças, origem geográfica e a espécie hospedeira (Gouveia et al., 2005).

A variabilidade foi atribuída a processos de diferenciação do patógeno tais como a mutação, recombinação assexuada ou outras fontes de variação genética, como mecanismos de reprodução assexuada que ocorrem na população e favorecem a troca genética. A ocorrência da criptosssexualidade nos urediniosporos do fungo, recentemente demonstrada, pode explicar parte da variabilidade encontrada neste patógeno (Carvalho et al., 2011).

A resistência do cafeeiro é governada pela teoria gene-a-gene, sendo condicionada por pelo menos nove genes dominantes (S_H1 a S_H9) sozinhos ou associados (Rodrigues Jr et al., 1975; Bettencourt et al., 1988). Proteínas codificadas por estes genes são capazes de reconhecer, direta ou indiretamente, efetores específicos codificados pelos genes de avirulência (*Avr*) do patógeno, ativando os mecanismos de defesa. Neste caso, o fungo não consegue causar uma infecção estável nos tecidos do hospedeiro, caracterizando uma interação incompatível. Por outro lado, o fungo pode secretar proteínas efetoras, que são capazes de impedir o reconhecimento pela planta e suprimir suas respostas de defesa, além de promover o parasitismo resultando em uma interação compatível (Ellis et al., 2009).

Portanto, o conhecimento dos genes expressos pelo fungo e pela planta pode facilitar o entendimento dos eventos moleculares que levam ao desenvolvimento da doença ou à resistência da planta. Com base nos genes de resistência do cafeeiro, foram caracterizadas mais de 50 raças de *H. vastatrix* em todo o mundo, sendo 15 delas presentes no Brasil (Gichuru et al., 2012; Zambolim, 2016). A grande variabilidade genética das populações de *H. vastatrix*, comum à maioria dos patógenos biotróficos, tem sido determinada pelo padrão de infecção observado em uma série de 24 variedades diferenciadoras de cafeeiros (Zambolim et al., 2005).

De um modo geral, e em particular nos fungos, raças fisiológicas ou patótipos são comuns, ou seja, variantes do patógeno com diferentes combinações de genes de virulência e, conseqüentemente, diferentes capacidades para infectar distintos genótipos de uma dada espécie hospedeira (Rodrigues Jr., 2002). Tradicionalmente, a variabilidade fisiológica de *H. vastatrix* é determinada pelo padrão de infecção em clones de cafeeiros diferenciadores de raças. Entretanto, o número de série diferenciadora é restrita, o que impossibilita a caracterização de alguns patótipos com amplo espectro de virulência. O objetivo do trabalho foi estudar a diversidade genética de isolados monopustular de *H. vastatrix* coletados em diferentes regiões, espécies e variedades de café, usando marcadores SNPs identificados em pontenciais efetores do fungo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. População *Hemileia vastatrix*

Foram utilizados 46 isolados de *H. vastatrix* previamente caracterizados em raças e patótipos (Tabela 1), pertencente a micoteca do Laboratório Biotecnologia do Cafeeiro (Biocafé) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Esses isolados foram utilizados para estudar a população do fungo usando sete genes candidatos a efetor, e foram sequenciadas pela *MacroGen Advancing throughout Genomics-South Korea*.

Tabela 1- Localização geográfica e hospedeiros das raças e patótipos utilizados.

ISOLADO	GENÓTIPO/ CULTIVAR	MUNICÍPIO	UF	RAÇA	GENE VIRULÊNCIA
1M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	Hv11	v1,5,6,8,?
2M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	Hv08	v1,5,6,?
3M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	XXX	v5,8
4M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	Hv05	v5,6?
5M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	III	v1,5
6M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	Hv11	v1,5,6,8,?
7M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	Hv14	v1,2,5,7,8,9,?
9M	Híbrido de Timor UFV	Viçosa	MG	Hv10	v1,2,5,6,7,8,9?
10M	Catuaí UFV	Viçosa	MG	Hv09	v1,5,6
11M	Catuaí	Viçosa	MG	Hv02	v1,5,8
12M	Pé Franco Conilon	Jaguaré	ES	Hv12	v5,6,7,9?
13M	Conilon	Jaguaré	ES	XIII	v5,?
14M	Pé Franco Conilon	Jaguaré	ES	II	v5
15M	Conilon (Crespin)	Jaguaré	ES	II	v5
16M	Bamburral (Conilon)	Jaguaré	ES	II	v5
18M	Conilon Clone 03	Jaguaré	ES	XXII	v5,6
19M	Conilon Mistura de clones	Jaguaré	ES	II	v5
20M	Conilon Mistura de Clones	Jaguaré	ES	II	v5
21M	Conilon LB1	Soretama	ES	Hv05	v5,6?
22M	Conilon	Jaguaré	ES	II	v5
23M	Conilon Clone 02	Jaguaré	ES	II	v5
24M	Conilon Clone 120	Jaguaré	ES	XIII	v5,?

25M	Conilon (Mistura)	Soretama	ES	II	v5
26M	Conilon (ALB1, 02, 16)	Soretama	ES	Hv12	v5,6,7,9,?
28M	Conilon clone 02	Linhares	ES	XXXIII	v5,7 ou v5,7,9
29M	Conilon	Linhares	ES	XIII	v5,?
30M	Conilon (02, 153, G35)	Linhares	ES	II	v5
31M	Conilon	Linhares	ES	Hv05	v5,6?
33M	Conilon (Mistura)	Linhares	ES	II	v5
36M	Conilon (Mistura)	Rio Bananal	ES	II	v5
37M	Conilon	Rio Bananal	ES	II	v5
38M	Conilon (mistura de clone)	Vila Valério	ES	Hv07	v1,5,6,7,8,9
39M	Conilon (153, A21, verdinho)	Vila Valério	ES	Hv15	v1,5,6,8,9?
40M	Conilon	Vila Valério	ES	III	v1,5
41M	Conilon (mistura de clone)	Marilândia	ES	XXII	v5,6
44M	Conilon	Marilândia	ES	Hv05	v5,6,?
45M	Conilon	Marilândia	ES	Hv08	v1,5,6,?
46M	Conilon (53,03,02) clones vitória	Marilândia	ES	II	v5
47M	Conilon (P1,P2, G35, G18, 153, 02,76)	Marilândia	ES	Hv03	v5,6,7,9
51M	Conilon 18 Clones	Marilândia	ES	Hv06	v1,5,6,7,9
52M	Conilon 18 Clones	Marilândia	ES	XXII	v5,6
53M	Robusta	Marilândia	ES	Hv13	v1,4,5?
54M	Mistura de clones	Itabela	BA	XIII	v5,?
55M	Conilon 03clone	Itabela	BA	II	v5
56M	Conilon clone 03	Itabela	BA	II	v5
58M	Conilon (G35, BJ1, Biji)	Itabela	BA	II	v5
60M	Mistura de clones	Itabela	BA	Hv07	v1,5,6,7,8,9
62M	Mundo Novo (407)	Cambará	PR	Hv01	v1,5,6,7,8,9,?
63M	Catuaí (429)	Batatais	SP	Hv04	v5,6,8
64M	(449)	Eunápolis	BA	Hv06	v1,5,6,7,9
65M	Mistura de Clones (459)	Jaguaré	ES	Hv01	v1,5,6,7,8,9?
66M	Oeiras MR	Viçosa	MG	Hv01	v1,5,6,7,8,9?
67M	(7963/117)	Viçosa	MG	Hv01	v1,5,6,7,8,9?
68M	C. arábica	Viçosa	MG	XXIX	v5,6,7,8,9
69M	C. arábica	Viçosa	MG	II	v5
70M	C. arábica	Viçosa	MG	Hv01	v1,5,6,7,8,9,?

2.2. Extração de DNA genômico de isolados de *H. vastatrix*

Para a extração do DNA genômico do fungo foram utilizados de 30 a 50 mg de uredinióspore segundo protocolo Raeder & Broda, (1985) com modificações. O material foi triturado em nitrogênio líquido em um microtubo de 1,5 mL, com auxílio de pistilo plástico. Após a trituração, foi adicionado 600ul de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM e SDS 2%). Os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos e, posteriormente, foi adicionado feno/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1. As amostras foram agitadas manualmente por 10 minutos, e centrifugadas a 10.000g por 5 minutos. Os sobrenadantes cuidadosamente transferidos para tubos novos, e adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1. Após a centrifugação,

os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos, e adicionados um volume igual de isopropanol gelado e 0,1 do volume de acetato de amônia 7M. Após homogeneizado por inversão para precipitação do DNA, foram incubados a -20 por 30 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados a 10.000g por 15 minutos, e os sobrenadantes descartados. O DNA genômico foi lavado com etanol 70% por duas vezes e centrifugados por a 10.000g por 5 minutos entre as lavagens. O precipitado (*pellets*) secos em temperatura ambiente foram ressuspenso em água MilliQ. Em seguida, foi adicionada RNase, na concentração de 10 ng/μl, mantendo-se os tubos a 37°C por 15 minutos. A quantificação do DNA de cada isolado foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 e a sua qualidade confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os DNAs foram diluídos para a concentração final de 25 ng/μl e armazenados a - 20°C até o uso.

2.3. Reação em cadeia Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas 20 μl contendo 1x de Tampão 10X, 150μM de dNTPS, 0,1 μM de cada iniciador, 1,0 mM de MgCl₂, 0,6U de Taq, 50ng de DNA genômico e água MilliQ para completar a reação. A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial a 94 ° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 ° C por 1 min, 58° C por 1 min, 72 ° C por 1 min e uma extensão final a 72 ° C por 8 min. O tamanho esperado do fragmento amplificado foi confirmado por meio de eletroforese em gel de agarose. Fragmentos do tamanho esperado foram purificados com ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent. O sequenciamento foi realizado pela *Macrogen Advancing throughout Genomics*-South Korea.

A região do gene dos sete genes candidatos a efetor *Hemileia vastatrix* P-17, P-19, P-34, P-37, P-38, P-42, e P-48 foi amplificada por PCR utilizando iniciadores P-17F (5'ACTGTCCCACCAGCAATAGG-3') e P-17R (3'ACAAGTCTGCTGACCCATCC-5'), P-19F(5'-TTCTATCGTCGCTCCTCCCA-3') e P19R(3'GGGCCACAACATCATA GCCT-5'), P-34F(5'-ATGGTCCTTTCGACTCTTCT-3') e P-34R (3'CTGATCCATAA GACCTTTCG-5'), P-37F (5'GGTACCTGTTGTTCTAAGTG-3') e P-37R (3'-CCTGAA ACTTCCAGTAGAG-5'), P-38F (5'-GAGAAACTCCCTTCTTCTC-3') e P38R (3'AGG AAGTAGATGGGGTAGTA-5'), P-42F (5'GATCCTGCTATTCAACTTGC-3') e P42R (3'AATATGCTGAGTCTCCAAGG-5'), P48F (5'CCCCTCTCTAGTACCACCTT-3') e P 48R (3'AGCTATCACCCTTCCACCAC5').

2.4. Análises filogenéticas

Análises filogenéticas foram feitas utilizando as sequências de nucleotídeos dos genes P-17, P-38 e P42 com 46 isolados de *Hemileia vastatrix*. Genes selecionados pela predição do genoma de *H. vastatrix* raça XXXIII, genes que codificam proteínas secretadas, confirmadas através de banco de dados transcriptoma e validadas por RT qPCR. A inferência bayesiana foi realizada com o Sr.Bayes 3.1.2 (Inferência Bayesiana de Filogenia) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O modelo de substituição foi selecionado com base no critério de informação Akaike (AIC) usando MrModeltest 3.2. A probabilidade de distribuição de árvore a posteriori foi calculada usando MCMC (Metropolis-coupl Markov Chain Monte Carlo) de duas cadeias de uma árvore aleatória com 10 milhões de gerações e descartando 25% das primeiras árvores. A convergência MCMC eo tamanho efetivo da amostra foram examinados usando o programa Tracer 1.4. As árvores filogenéticas foram vistas e editadas com FigTree 1.3.1. ([Http://tree.bio.ac.uk/software](http://tree.bio.ac.uk/software)).

3. RESULTADOS

Os isolados monopustulares de *H. vastatrix* e seus respectivos gene de virulência inferidos pela inoculação nas series diferenciadoras. Os isolados foram sequenciados com os sete genes candidatos a efetor, mas apenas três foram selecionados de acordo com o perfil de expressão quantificados por RT qPCR. Para o gene P-42 e P-17 significativo para expressão no tempo de 24h e para o gene P-38 significativo em 12h.

Em busca de uma nova ferramenta para caracterização de *H. vastatrix*, gene específico e ligados ao processo infeccioso, como os candidatos a efetores foram sequenciados para 46 isolados do fungo. Foram utilizadas a sequência completa dos genes com região dos exons e introns na análise de filogenia. Para o gene P-42 apenas o isolado 40 diferiu dos demais (Figura 1). Esse isolado foi caracterizado como raça III, foi coletado cafeeiro *C. canephora* de origem do Espírito Santo. O isolado 5 e 40 de regiões diferentes e coletados em genótipos diferentes caracterizados como mesma raça diferiram em resposta aos genótipos que compõem as séries diferenciadoras. A menor similaridade observada entre as sequencias do gene P-42 foi de 98%(figura 2).

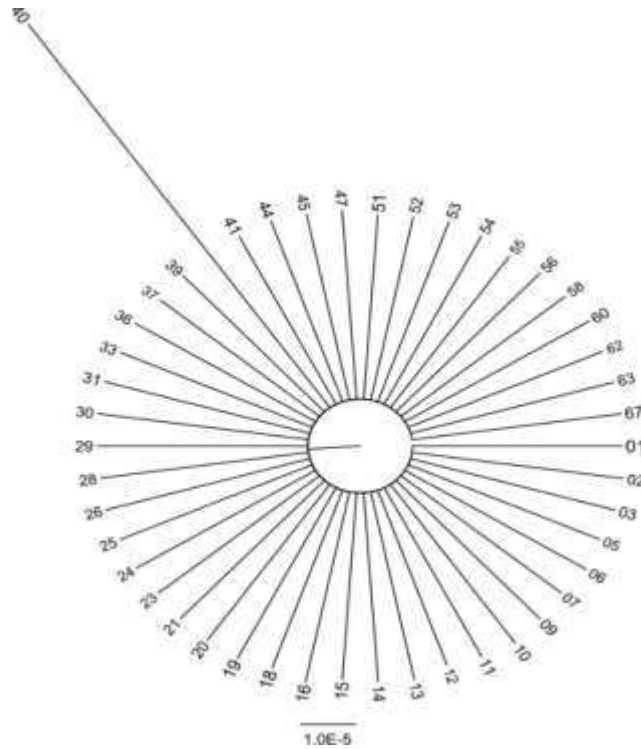


Figura 1. Análise Bayseana do gene candidato a efetor P-42 amplificado em 46 isolados

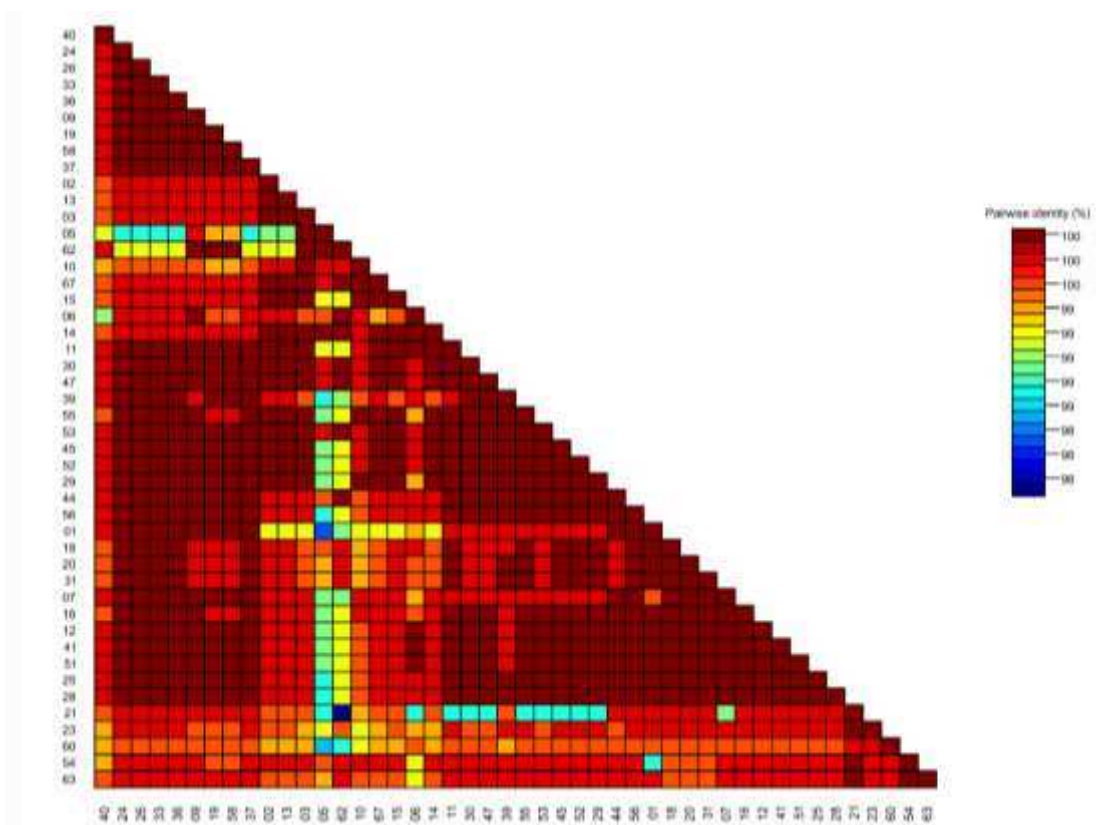


Figura 2. Similaridade das sequências entre os 46 isolados para o gene candidato a efetor P-42

Análise Bayesiana da sequência do gene candidato a efector P-17 para 45 isolados mostrou que aquelas dos isolados 04, 05, 10 e 51 foram as mais divergentes. (Figura 3). Sendo 04 identificado como patótipo Hv05 oriundo de Híbrido de Timor no Estado de Minas Gerais, 05 caracterizado como raça III oriundo de Híbrido de Timor no estado de Minas Gerais. O isolado 10 oriundo de *Coffea arabica*, coletado em Minas Gerais, foi caracterizado como patótipo Hv09 coletado no Estado de Minas Gerais. A análise filogenética mostrou que o mesmo se encontra em grupo separado dos demais. Isolado 51 coletado de *Coffea canephora* no estado do Espírito Santo, também não caracterizado em raça sendo chamado de patótipo Hv06. Para as 46 amostras uma matriz de similaridade foi gerada com o mínimo de 97% de identidade entre os isolados (Figura-4)

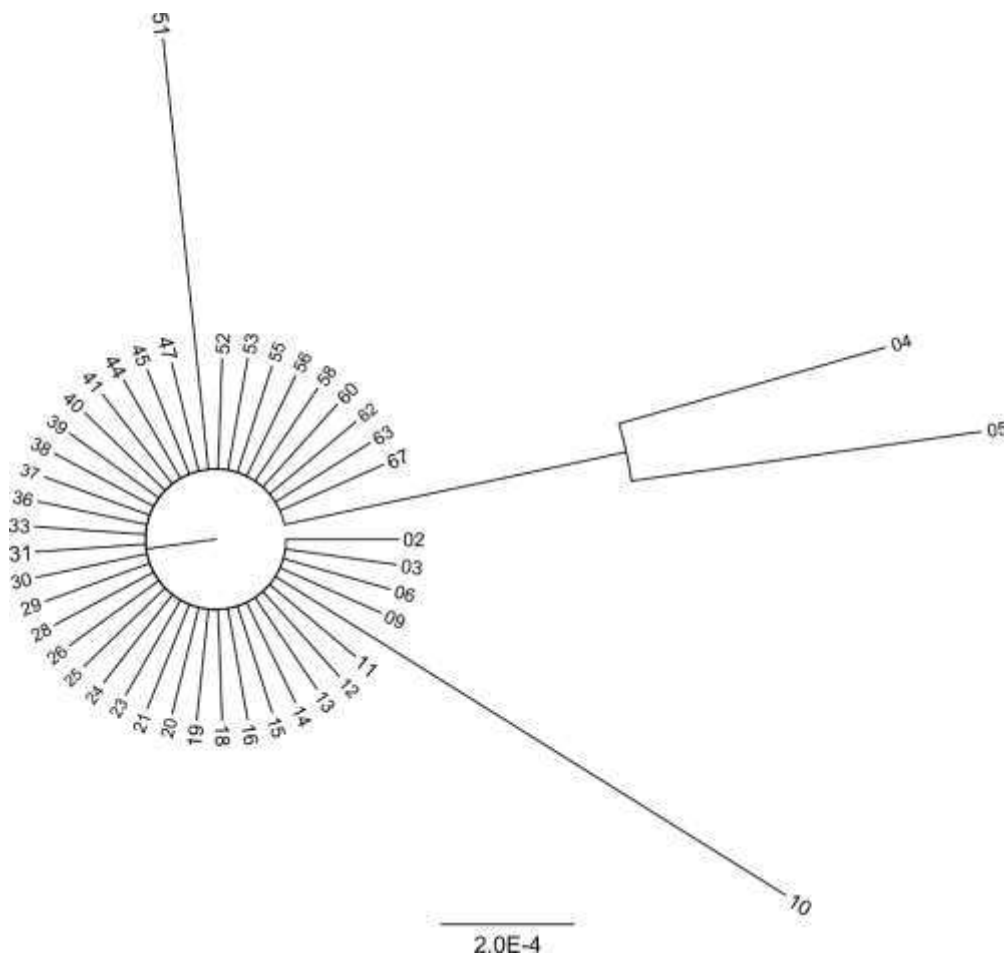


Figura 3. Análise Bayesiana do gene candidato a efector P-17 amplificados em 45 isolados

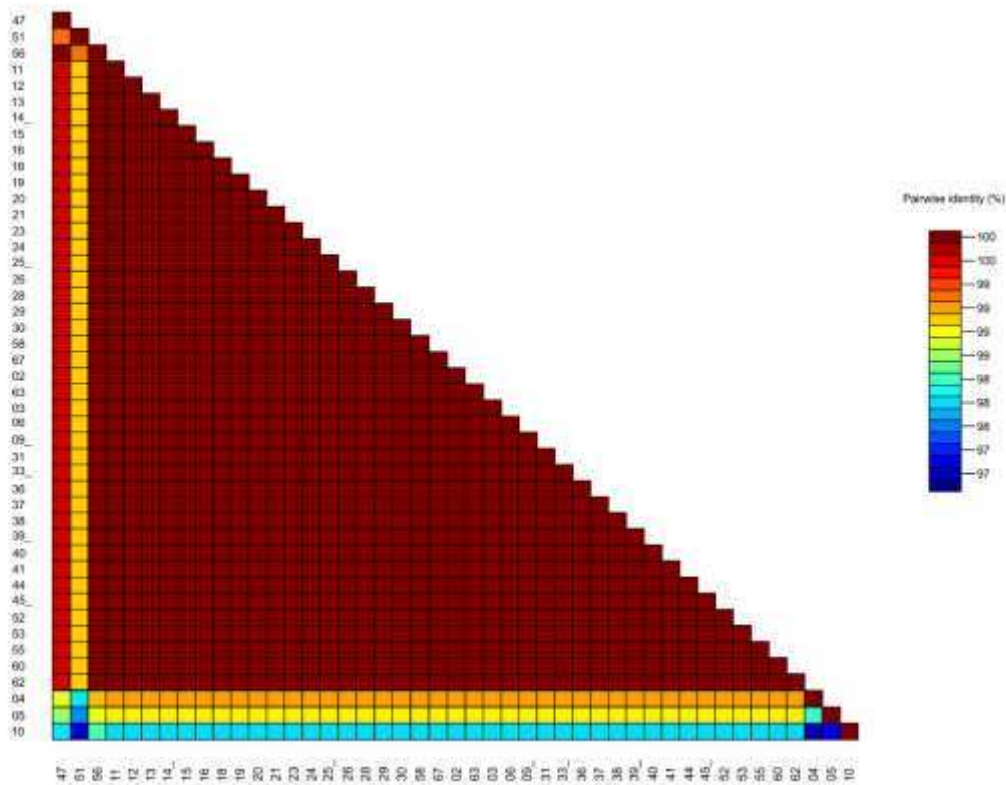


Figura 4. Matriz de similaridade das sequencias entre os 45 isolados para o gene candidato a efetor P-17

Para o gene P-38, apenas o isolado 30 e 56 foram agrupados em um grupo distinto (Figura-5). 30M foi caracterizado como raça II e o 56 também caracterizado como raça II. Ambos de *Coffea canephora*, mas de regiões diferentes como Espírito Santo e Bahia.

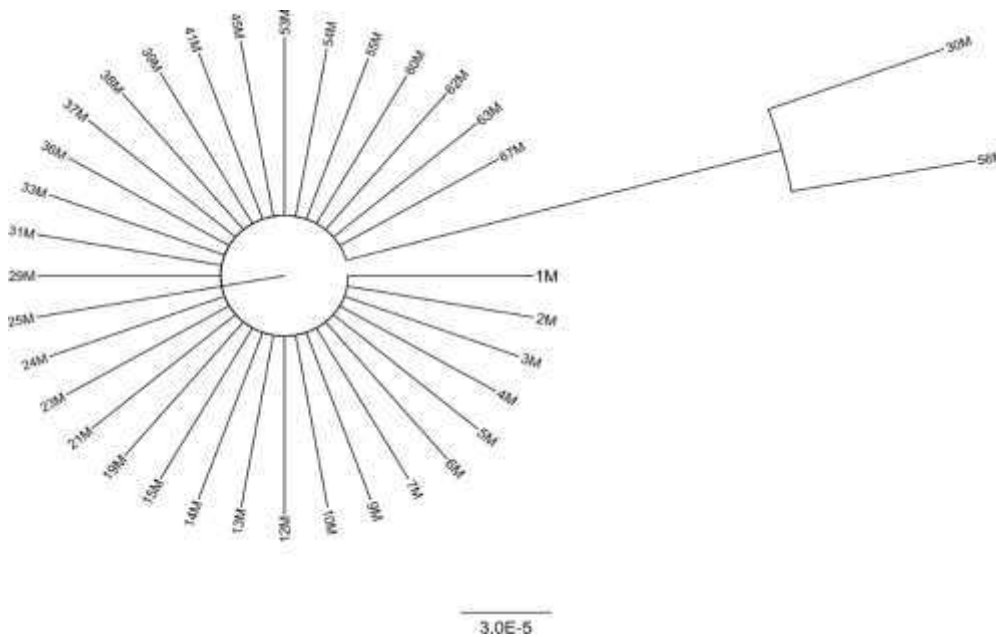


Figura 5. Análise Bayesiana do gene candidato a efetor P-38 amplificados em 36 isolados

A matriz de similaridade realizada com as sequencias do gene P-38 mostrou que este foi o mais discriminante com mínimo de 91% de diferença entre os isolados.

(Figura 6)

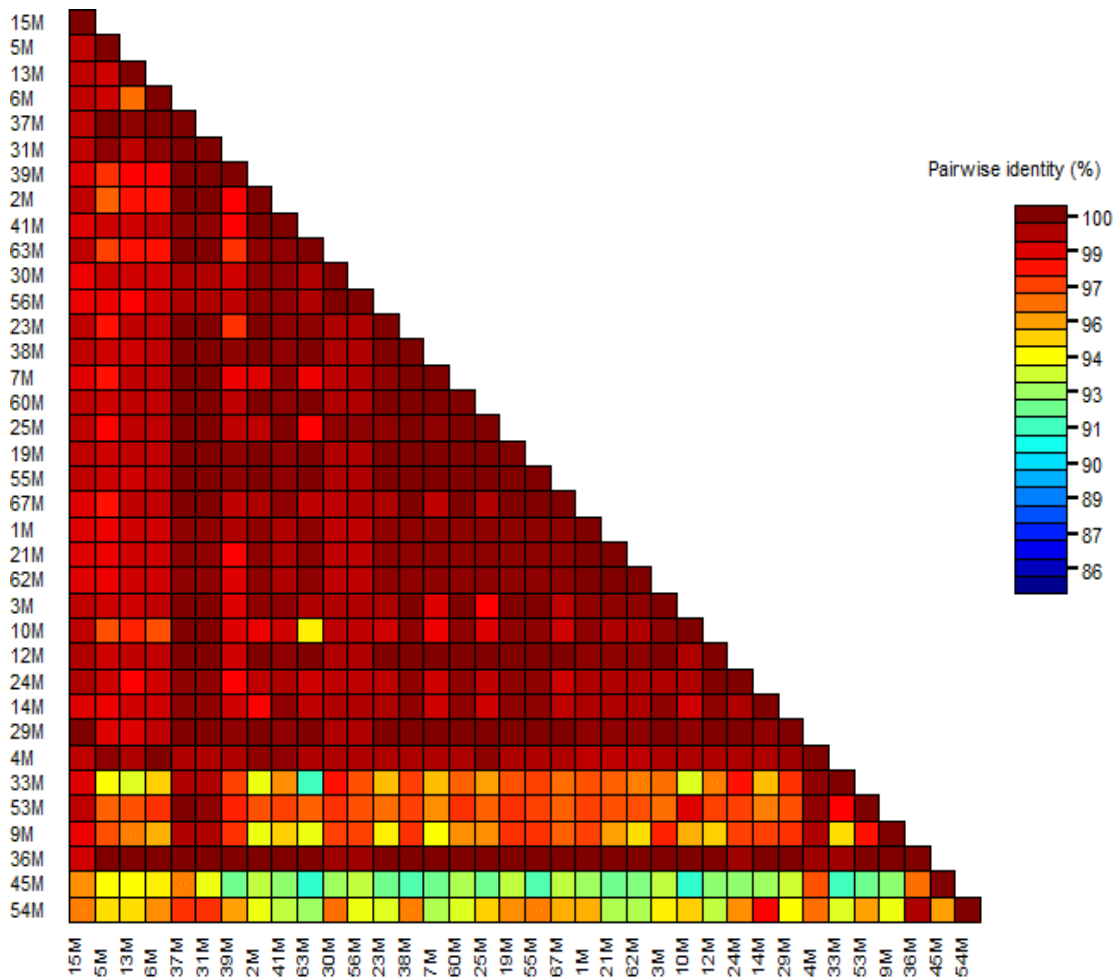


Figura 6- Matriz de similaridade das sequencias entre os 36 isolados para o gene candidato a efetor P-38

Quando analisados todos os genes concatenados para os 43 isolados, podemos observar uma alta similaridade com o mínimo de 99%. E o isolado que mais discriminou em 99% foi o isolado 10 que corresponde ao patótipo Hv-09. (Figura 7)

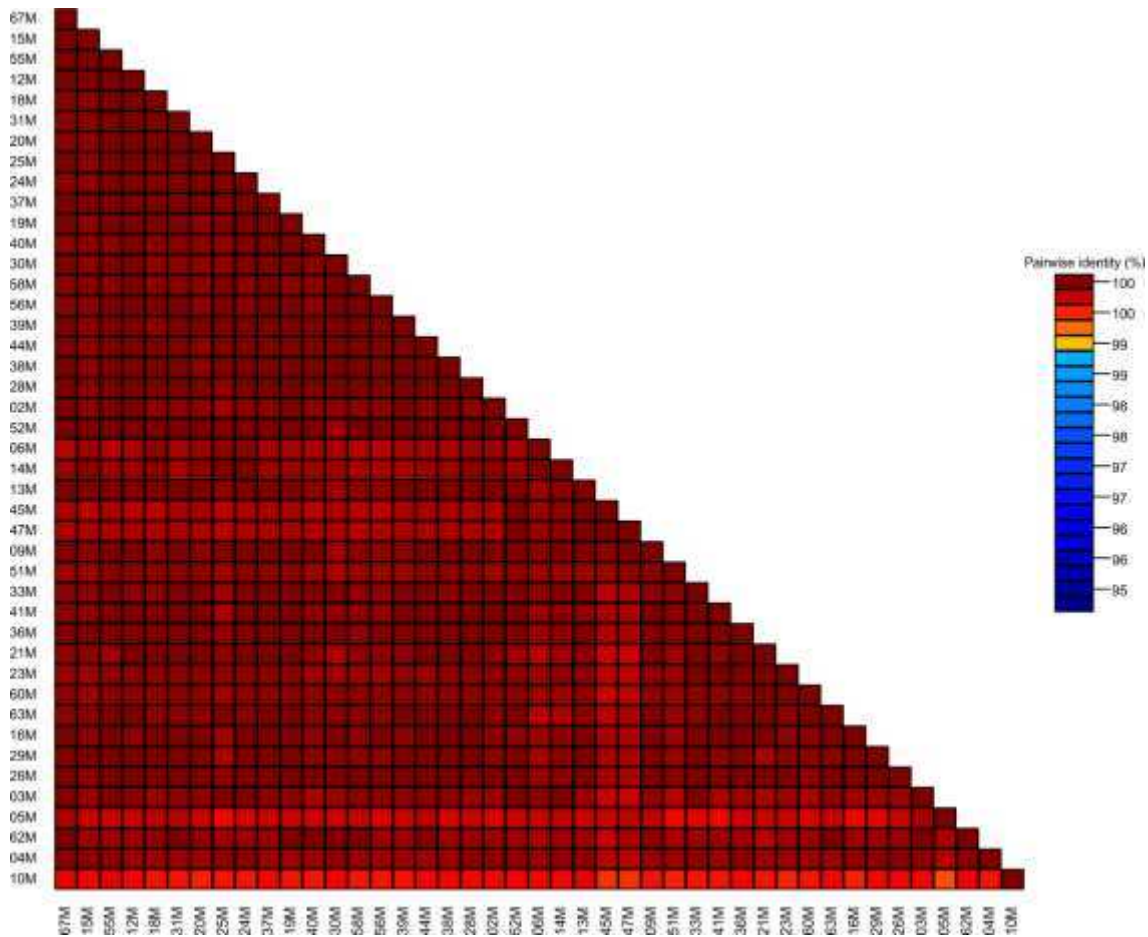


Figura- 7. Matriz de similaridade das sequencias de 43 isolados de *Hemileia vastatrix* com sete genes candidatos a efetores P-17, P-19, P-34, P-37, P-42 e P-48 concatenados.

4. DISCUSSÃO

Cultivares resistentes de café com resistencia durável para a ferrugem tem uma longa história de sucessos e insucessos devido a falta de informação sobre o potencial evolutivo do fungo *H. vastatrix* e de como estão distribuidas as raças e patótipos do fungo. Nesse trabalho as diferentes raças e patótipos de *H. vastatrix* foram estudadas com base em sete genes candidatos a efetores , genes conservados em *H. vastatrix*. Os isolados analisados são representativos dos principais estados Brasileiros produtores de café e coletados em cafeeiros Híbridos de Timor, *Coffea canephora* e *Coffea arabica*. Pela abordagem bayesiana não foi encontrada nenhuma estruturação dos isolados, nem quanto ao hospedeiro nem quanto ao Estado de origem dos isolados. Foram discriminados a raça III, II, patótipo Hv-05, patótipo Hv-09 e o patótipo Hv-06, coletados de *C canephora*, HdT e *Coffea arábica* respectivamente. Quando utilizado os genes concatenados apenas o patótipo Hv-09 representado por apenas um isolado derivado de *Coffea arabica* foi discriminado, com menor porcentagem de similaridade entre as sequências. Esta

diferença mostra a variabilidade dos isolados, e não uma estruturação, levando em consideração que outras raças coletadas em *C. arabica* não foram discriminadas.

De acordo com Nunes et al., (2009) quando se utiliza de áreas contínuas com plantações de café permite um movimento gradual de epidemias de ferrugem e distribuição de genótipos, e isso mostrou diferenciação genética entre as populações de *H. vastatrix*. No entanto, as diferenças encontradas no presente trabalho não correlacionam com genótipo e região geográfica estudada, as diferenças podem ocorrer independente do genótipo e região da coleta.

Maia et al. (2013, 2017) não relataram diferenças significativas entre as populações de patógenos com base na diferenciação genética embora tenham sido coletadas de diferentes hospedeiros, mas encontrou nível de agressividade diferencial em populações do ES e MG. Os resultados mostram que a diferença apenas no fenótipo da interação, como os estudos mostram diferença de agressividade e diferentes raças que compõem a população de *Hemileia vastatrix* das mais diversas áreas geográficas, e a população não se encontra estruturadas, pode apresentar um grande risco a cafeicultura Brasileira. A utilização extensiva de cultivares derivados de HdT também pode levar variação dentro das populações do fungo no Brasil, o que pode explicar a suplantação da resistência das cultivares derivadas de HdT e alta variabilidade do patógeno. Várias variedades foram desenvolvidas no país utilizando fontes de resistência de coleções de germoplasma que disponibilizado pelo Centro Investigação da Ferrugem do Cafeeiro (CIFC) de Portugal (Zambolim, 2016). No entanto, muito poucas variedades são completamente resistentes portanto, é difícil prever a durabilidade de fontes resistentes a ferrugem, e a principal recomendação para os programas de melhoramento é assim incorporar a resistência multigênica como estratégia de controle.

5. CONCLUSÕES FINAIS

Com presente trabalho foi possível caracterizar sete raças, sendo elas II, III, XIII, XXII, XXIX, XXX e XXXIII;

As raças XXIX e XXX estão sendo relatadas pela primeira vez no Brasil;

Foi possível identificar 15 novas raças;

Isolados 5 e 40 caracterizados como raça III, não são a mesma raça;

Foi possível inferir a existência de mais seis genes que conferem resistência, presente nos diferentes cafeeiros que compõem a série diferenciadora de raças;

Não houve diferença de presença e tamanho de fragmentos de DNA amplificados com marcadores específicos de 47 genes candidatos a efetores nos isolados de *H. vastatrix* estudados;

Seis das proteínas candidatas a efetoras sequenciadas estão ligadas ao processo infeccioso;

Foram identificados marcadores SNPs na sequencias de oito genes candidatos a efetores;

A raça Hv-09 foi discriminada com base na presença de SNPs em sua sequencia.

REFERÊNCIAS

- BETTENCOURT AJ, RODRIGUES CJ. 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. eds. *Coffee: Agronomy*. London: **Elsevier Applied Science** pp 285-292.
- CABRAL, PGC., MACIEL-ZAMBOLIM, E., OLIVEIRA, SAS., CAIXETA, ET., ZAMBOLIM, L. 2015 Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea spp.* **Plant Pathology**. Doi: 10.1111/ppa.12411
- CARVALHO CR, FERNANDES RC, CARVALHO GMA, BARRETO WB, EVANS HC. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. **Plos One** 6(11): e26387
- CRISTANCHO, M. A. et al. 2014. Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-11.
- ELLIS JG., RAFIQI M., GAN P., CHAKRABARTI A., DODDS PN. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. **Current Opinion in Plant Biology** 12(4): 399-405.
- FAZUOLI, LC., SILVAROLA, MB., SALVA, TJG. 2007. Cultivares de café arábica do IAC: Um patrimônio da cafeicultura brasileira. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 12-15.
- GICHURU, EK., ITHIRU, JM., SILVA, MC., PEREIRA, AP., VÁRZEA, VMP. 2012. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology** 37:424-427.
- GODOY, CV., BERGAMIN FILHO, A., SALGADO, CL. 1997. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H. Manual de fitopatologia: doenças de plantas e seu controle. 3. ed. São Paulo: Agronômica **Ceres**. v. 2, p. 184-200.
- KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. 2016 MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33:1870-1874
- MAIA T., BADEL, JL., FERNANDES, MB., BRAGANÇA CAD., MIZUBUTI ESG., BROMMONSCHENKEL, SH. 2017. Variation in Aggressiveness Components in the *Hemileia vastatrix* Population in Brazil. **Phytopathol** 165 174–188
- MAIA, T. A., MACIEL-ZAMBOLIM, E., CAIXETA, E. T., MIZUBUTI, E. S. G., ZAMBOLIM L. 2013. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP **Australasian Plant Pathol.** 42:533–542.
- NUNES, CC., MAFFIA, LA., MIZUBUTI, ESG., BROMMONSCHENKEL, SH., SILVA, JC. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology** 38:445-452.

- RONQUIST, F., HUELSENBECK, JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- RODRIGUES JR, C.J. 2002. Centro de investigação das ferrugens do cafeeiro: Estudos e ensaios. Oeiras, Portugal, 55p.
- RODRIGUES JR, CJ., BETTENCOURT, A. J., RIJO, L. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**, v. 13, n. 1, p. 49-70.
- SILVA, DN., VIEIRA, A., TALHINHAS, P., AZINHEIRA, HG., SILVA, MC., FERNANDEZ, D., DUPLESSIS, S., PAULO, OS., BATISTA, D. 2012. Phylogenetic analysis of *Hemileia vastatrix* and related taxa using a genome-scale approach. 24. International conference on Coffee Science. **ASIC**.
- TALHINHAS, P., BATISTA, D., DINIZ, I., VIEIRA, A., SILVA, D. N., LOUREIRO, A., TAVARES, S., PEREIRA, A. P., AZINHEIRA, H. G., GUIMARAES, L. G., VARZEA, V., SILVA, M. D. C. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology** DOI: 10.1111/mpp.12512
- VIEIRA, A. et al. 2011. Validation of RT-qPCR reference genes for in planta expression studies in *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 115, n. 9, p. 891-901.
- ZAMBOLIM, L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Trop. Plant Pathol.** v41: p1–8.
- ZAMBOLIM, L. et al. 1999. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: Zambolim, L. (Ed). Produção de café com qualidade. Viçosa: **Editora UFV**, p. 134-215.
- Zambolim L, Maciel-Zambolim E, Vale FXR, Pereira AA, Sakyama NS, Caixeta ET (2005) Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological variability, current situation and future prospects. In: Zambolim L, Maciel-Zambolim E, Várzea VMP (eds) **Durable resistance to coffee leaf rust**. UFV, Viçosa, pp 53–74