

PREDIÇÃO DO SECRETOMA DE *Hemileia vastatrix* RAÇA XXXIII¹

Brenda Neves Porto²; Eveline Teixeira Caixeta³; Pedro Marcus Pereira Vidigal⁴; Daniela Teixeira Lelis⁵; Eunize Maciel Zambolim⁶; Laércio Zambolim⁷; Mário Lúcio Vilela de Resende⁸

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa & Desenvolvimento/Café, INCT Café, CNPq e CAPES

²Doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras-UFLA, brenda.bio@gmail.com.

³Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br; autor correspondência.

⁴Doutorando em Genética e Melhoramento Universidade Federal de Viçosa-UFV, pedro.vidigal@ufv.br

⁵Bolsista do Consórcio Brasileiro de Pesquisa & Desenvolvimento, danitlelis@yahoo.com.br.

⁶Pesquisadora, DSc, Bioagro, UFV, Viçosa, eunize@ufv.br.

⁷Professor, PhD, Departamento Fitopatologia, UFV, Viçosa, zambolim@ufv.br.

⁸Professor, PhD, Departamento Fitopatologia, UFLA, Lavras, mlucio@dfp.ufla.br.

RESUMO: O uso de cultivares de café resistente à *Hemileia vastatrix*, o agente causal da ferrugem alaranjada, é a estratégia mais eficiente de controle dessa doença. A obtenção de genótipos resistentes tem sido um desafio devido ao alto potencial adaptativo do fungo e, consequentemente, surgimento de novas raças fisiológicas do patógeno que suplantam as cultivares resistentes. Durante a interação com o café, o fungo secreta proteínas efetoras que modificam a estrutura e função da célula hospedeira, permitindo o estabelecimento da colonização parasitária. Para ampliar o conhecimento das proteínas efetoras de *H. vastatrix*, neste trabalho, os *reads* obtidos do sequenciamento *denovo* do DNA genômico desse fungo foram analisados, e com o proteoma deduzido foi predito o secretoma. Foram identificadas 615 proteínas contendo peptídeo sinal localizado na via de secreção e sem domínios transmembrânicos. Essas foram anotadas e são consideradas as potenciais proteínas secretadas de *H. vastatrix*. Desse secretoma obtido, 385 proteínas preditas apresentaram homologia com as de *Puccinia. graminis* f. sp. *tritici*, 109 com *Melampsora larici-populina*, 39 com *H. vastatrix* e 72 não apresentaram homologia com proteínas depositadas no *Genbank*, as quais podem ser candidatas a efetores específicos de *H. vastatrix*. Esse resultado confirma que proteínas secretadas são conservadas dentro da mesma família, uma vez que, a maior parte delas mostraram homologia entre as ferrugens pertencentes à família *Pucciniaceae* (*H. vastatrix* e *Puccinia. graminis* f.sp. *tritici*). O baixo número de homologia encontrado para *H. vastatrix* (39) deve-se ao fato de que, até o momento, estão depositadas poucas proteínas desse fungo nos bancos de dados públicos. As análises obtidas fornecem uma informação abrangente das proteínas secretadas de *H. vastatrix*, uma vez que foram realizadas com base no sequenciamento estrutural do genoma.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea* spp., ferrugem do cafeeiro, interação planta-patógeno, efetores.

GENETIC DIVERSITY IN A COFFEE BOURBON GERMPLASM COLLECTION

ABSTRACT: The use of resistant coffee cultivars to *Hemileia vastatrix*, the causal agent of leaf rust, is the most effective strategy to control this disease. The obtainment of resistant genotypes has been a challenge due to the high adaptive potential of the fungus, which is responsible for the appearance of new physiological races resulting in a breakdown of the coffee resistance. During the interaction with the coffee, the fungus secretes effector proteins, which modify the structure and function of the host cell, allowing the establishment of parasite colonization. To increase knowledge of the effector protein of *H. vastatrix*, in this work, the reads obtained from the *denovo* sequencing genomic DNA of this fungus were analyzed. From the obtained proteome, a secretome was predicted, containing 615 proteins with signal peptide located in the secretion pathway and without transmembrane domains. They were annotated and are considered potential secreted proteins of *H. vastatrix*. From these predicted proteins, 385 showed homology to *Puccinia. graminis* f. sp. *tritici*, 109 to *Melampsora larici-populina*, 39 to *H. vastatrix*, and 72 showed no significant homology to proteins deposited in *Genbank*, which may be considered specific effectors of *H. vastatrix*. This result confirms that secreted proteins are conserved within the same family, as most of them showed homology between rusts belonging to the *Pucciniaceae* family (*H. vastatrix* and *Puccinia. graminis* f. sp. *tritici*). The low number of homology found for *H. vastatrix* (39) is due to the fact that, until now, a few proteins of this fungus were deposited in public databases. Our analysis provide comprehensive information of secreted proteins from *H. vastatrix* that were based on structural genome sequencing.

KEY WORDS: *Coffea* spp., coffee leaf rust, plant-pathogen interaction, effectors.

INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* (Berkely & Broome) é responsável pela principal doença foliar que afeta a produção do café arábica (*Coffea arabica* L.) (SILVA et al., 2006). Essa doença, quando não

controlada, pode levar a perdas na produção de até 50% devido à queda precoce das folhas (ZAMBOLIM et al., 2005). Atualmente, o controle é realizado principalmente pela utilização de fungicidas (POZZA; CARVALHO e CHALFOUN, 2010), entretanto, a abordagem mais eficaz e ambientalmente correta no controle dessa doença é o uso de cultivares resistentes. Porém, devido ao alto potencial evolutivo da população de *H. vastatrix*, surgem novas raças fisiológicas do patógeno que levam a suplantação das cultivares de café resistentes, representando um grande desafio aos programas de melhoramento (VÁRZEA & MARQUES, 2005; CABRAL et al., 2009; MAIA et al., 2013).

A formação de novas raças fisiológicas de *H. vastatrix* está relacionada com a pressão de seleção exercida pelos genes de resistência do hospedeiro. Já foram identificadas 45 raças fisiológicas desse patógeno, sendo que 16 delas foram detectadas no Brasil (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII e XXXVII) (ZAMBOLIM et al., 2005; CABRAL et al., 2009; CAPUCHO et al., 2012). A raça XXXIII, por possuir dois ou três genes de virulência (v5,7 ou v5,7,9), está sendo capaz de suplantar a resistência de algumas cultivares de cafeeiro que haviam sido liberadas como resistentes à ferrugem no Brasil (VÁRZEA & MARQUES, 2005; CAPUCHO et al., 2012), portanto, tem trazido grandes preocupações para os melhoristas e produtores.

Estudos realizados no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, têm mostrado que a interação do cafeeiro-*H. vastatrix* segue a teoria de co-evolução proposta por Flor (Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967). Dessa forma, a resistência à ferrugem é condicionada por pelo menos nove genes dominantes (*SH1* a *SH9*), podendo-se inferir a existência de pelo menos nove genes de avirulência em *H. vastatrix*. Durante a interação com o cafeeiro, esse fungo secreta um arsenal de proteínas efetoras que modificam a estrutura e a função da célula hospedeira, permitindo a colonização parasítica. Algumas dessas proteínas efetoras, as proteínas de avirulência (*Avr*), são reconhecidas por proteínas codificadas por genes de resistência, o que desencadeia uma resposta de defesa da planta contra a infecção do patógeno.

Uma abordagem que pode ser realizada com a finalidade de detectar essas proteínas *Avr* é a análise do secretoma do fungo e a utilização de ferramentas de bioinformática para identificar genes candidatos a efetores de *H. vastatrix* que cumpram uma lista de critérios específicos em bancos de dados de sequências, seguida da validação por meio de ensaios funcionais para atividades de efetores. Apesar de muitos anos de pesquisa neste patossistema, os genes *Avr* complementares de *H. vastatrix* foram pouco estudados. Até o momento, alguns poucos efetores foram identificados ou caracterizados por métodos bioquímicos ou a nível molecular por meio do sequenciamento de ESTs a partir de uredinísporos germinados, apressório e haustório. Essas informações são ainda insuficientes, uma vez que, conseguem identificar apenas uma pequena fração do secretoma total presente no genoma desse fungo (DUPLESSIS et al., 2012; FERNANDEZ et al., 2013; TALHINHAS et al., 2014). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi prever o secretoma de *H. vastatrix* raça XXXIII, visando identificar genes candidatos a efetores, por meio do proteoma obtido do sequenciamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Sequências de DNA de *H. vastatrix*

Foram utilizadas *reads* obtidos do sequenciamento *de novo* do DNA genômico de *H. vastatrix* raça XXXIII. Esse sequenciamento foi realizado utilizando duas plataformas de sequenciamento (PacBio e Illumina) e uma estratégia de montagem híbrida, para obter resultados mais precisos. Esses *reads* foram utilizadas para a realização da anotação estrutural do genoma desse fungo e predição gênica. Com o proteoma deduzido, a partir dos *reads*, foi realizada a predição do secretoma.

Análises de Bioinformática do Secretoma

O estudo do secretoma foi realizado com base nas 13.034 proteínas preditas do genoma de *H. vastatrix* raça XXXIII. A predição refinada do secretoma desse isolado foi baseada em um *pipeline* automatizado utilizando *scripts* em Perl e linguagem de comando em Linux. Inicialmente todas as proteínas foram analisadas quanto a presença de peptídeo sinal por meio do algoritmo SignalP v4.0. Apenas as proteínas com D-Score = Y (SignalP) foram selecionadas para serem analisadas quanto a localização do peptídeo sinal por meio do algoritmo TargetPv1.0. As proteínas que apresentaram o peptídeo sinal localizado na via de secreção foram selecionadas e analisadas quanto à presença de domínios transmembrânicos, utilizando o algoritmo TMHMM v.2.0. Somente as proteínas que apresentaram TM = 0 foram selecionadas. As sequências das proteínas secretadas foram comparadas com as sequências de proteínas não redundantes do Genbank/NCBI, usando-se o algoritmo BLASTp (Evalue = 10⁻⁵) (Figura 1).

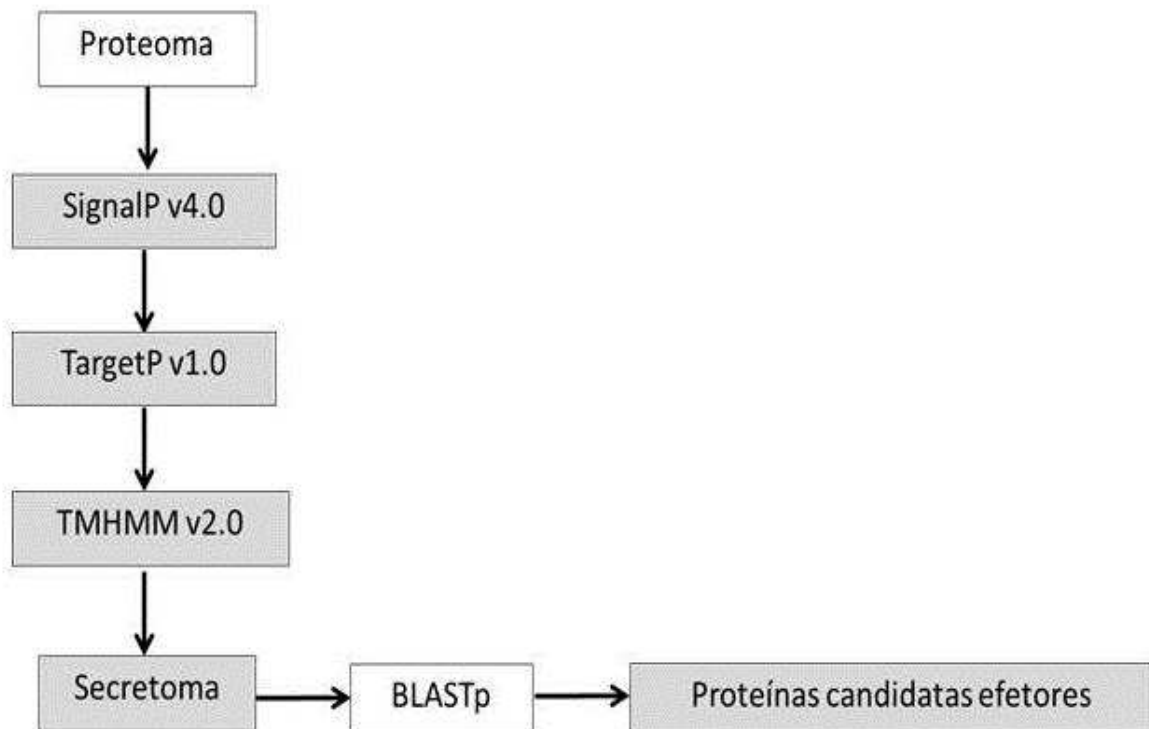


Figura 1. Pipeline de bioinformática usado para predição do secretoma e possíveis efetores de *H. vastatrix* raça XXXIII.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 13.034 proteínas preditas, encontradas no genoma da raça XXXIII, 893 foram selecionadas por apresentarem peptídeo sinal. Dessas, 863 apresentaram o peptídeo sinal localizado na via de secreção. Para analisar essas proteínas quanto a presença de domínios transmembrânicos, o peptídeo sinal foi retirado e as proteínas maduras que não apresentaram esses domínios foram selecionadas. Utilizando esse *pipeline*, obteve-se 615 genes que codificam para proteínas potencialmente secretadas. Esse número de proteínas encontrado foi maior que o observado nos dois estudos previamente realizados nesse patossistema. FERNANDEZ et al. (2012) encontraram 382 proteínas secretadas. Essas proteínas foram identificadas de sequências ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de folhas de café inoculadas com o patógeno, 21 dias após a inoculação, portanto, correspondem a proteínas expressas nessa condição. TALHINHAS et al. (2014) também analisaram ESTs de *H. vastatrix*, utilizando o transcriptoma de esporo germinado e apressório, e obtiveram 516 proteínas secretadas. Nesses dois trabalhos foram analisadas apenas as proteínas expressas em condições específicas, justificando o número menor de proteínas secretadas que o encontrado no presente trabalho (615). Ao analisar as sequências do genoma, espera-se obter um conjunto das proteínas potencialmente secretadas presente em todo o genoma desse fungo e não apenas uma fração delas que é específica das condições estudadas no transcriptoma. Do secretoma predito, a maior parte das proteínas (385) apresentaram homologia com as de *Puccinia. graminis* f. sp. *tritici* e 109 com as de *Melampsora larici-populina* (Figura 2). Todas essas ferrugens são fungos biotróficos, parasitas obrigatórios pertencentes ao filo *Basidiomycota* e a ordem *Pucciniales*. No entanto, *M. larici-populina* pertence à família *Melampsoraceae* e *P. graminis* e *H. vastatrix* são da família *Pucciniaceae*. Observou-se, portanto, que a maior parte das proteínas de *H. vastatrix* são mais conservadas dentro da família. Uma maior homologia com as proteínas de *P. graminis* também pode ser explicada pelo número de sequências de cada espécie depositado nos bancos de dados públicos. Para *P. graminis*, estão depositadas 65.082 sequências, enquanto para *M. larici-populina*, 32.984. Essa alta homologia também foi encontrada com os transcritos dessas espécies nos estudos realizados por FERNANDEZ et al. (2012) e TALHINHAS et al. (2014).

Até o momento, *H. vastatrix* apresenta apenas 55 proteínas depositadas no *Genbank/NCBI*, o que explica o baixo número de homologia (39) encontrada para essa espécie (Figura 2). Setenta e duas dessas proteínas secretadas não apresentaram homologia com nenhuma outra proteína depositada nos bancos de dados, por isso, merecem destaque pois podem ser consideradas proteínas secretadas exclusivas de *H. vastatrix* e ainda não foram estudadas (Figura 2).

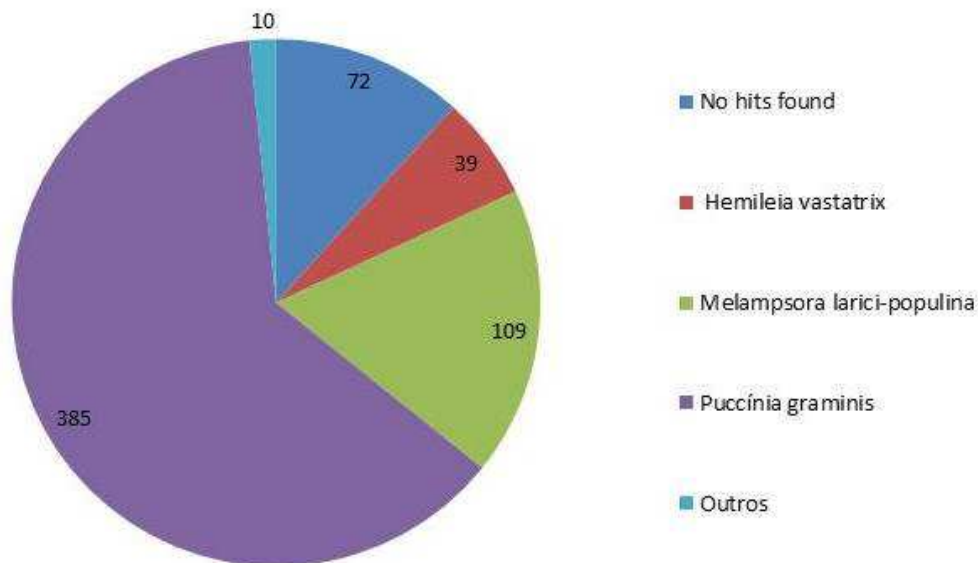


Figura 2. Resultado BLASTp das proteínas de *H. vastatrix* raça XXXIII.

Essas análises fornecem uma informação mais abrangente das proteínas secretadas de *H. vastatrix*, uma vez que foram realizadas com base no sequenciamento estrutural do genoma. O conhecimento e a validação dessas proteínas poderá ser útil para a identificação e classificação dos isolados de *H. vastatrix* em raças, substituindo ou auxiliando a classificação utilizados a série diferenciadoras de raças. Além disso, o conhecimento da interação cafeeiro-*H. vastatrix* é essencial para desenvolver cultivares de cafeeiro com resistência mais durável, como alternativa para o controle da doença.

CONCLUSÃO

Informações sobre o secretoma predito de *H. vastatrix* raça XXXIII foram obtidas. As análises dessas proteínas foram realizadas com base no sequenciamento estrutural do genoma desse isolado, fornecendo, portanto, uma informação mais abrangente das proteínas secretadas desse fungo. Foram encontradas 72 proteínas que não apresentaram homologia com proteínas depositadas no *Genbank*, as quais podem ser candidatas a efetores específicos de *H. vastatrix*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABRAL, P.G.C.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L.; LELIS, T.P.; CAPUCHO, A.S.; CAIXETA, E. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Disease Note*, v. 4, p.129-130, 2009.
- CAPUCHO, A.S.; ZAMBOLIM, E.M.; FREITAS, R.L.; HADDAD, F.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, L. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Note*, v.7, p.189-191, 2012.
- DUPLESSIS, S.; JOLY, D.L.; DODDS, P.N. Rust effectors, In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, p.155-193, 2012.
- FERNANDEZ, D.; TALHINHAS, P.; DUPLESSIS, S. Rust fungi: achievements and future challenges on genomics and host-parasite interactions. *Agricultural Applications*, p.315-341, 2012.
- MAIA, T.A.; ZAMBOLIM, E.M.; CAIXETA, E.T.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZAMBOLIM, L. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australasian Plant Pathology*, v.42, p.533-542, 2013.
- POZZA, E.A.; CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R.J.; MENDES, A.N.G.; BALIZA, D.P. Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: UFLA, p.69-101, 2010.
- SILVA, M.C.; VÁRZEA, M.P.V.; GUERRA GUIMARÃES L.; AZINHEIRA, H.G.; FERNANDES, D.; PETITOT, A.S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal Plant Physiology*, v.18, p.119-147, 2006.
- TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.G.; VIEIRA, B.; LOUREIRO, A.; TAVARES, S.; BATISTA, D.; MORIN, E.; PETITOT, A.S.; PAULO, O.S.; POULAIN, J.; SILVA, C.; DUPLESSIS, S.; SILVA, M.; FERNANDEZ, D. 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, 2014.

VÁRZEA, V.M.P. & MARQUES, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*, p. 53-74, 2005
ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, E.M. Doenças do cafeeiro (*Coffea arábica* e *C. canephora*). In: KIMATI, M. et al. (Ed). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.165-180, 2005.