Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de
Austropuccinia psidii

Mariana da Silva Lopes

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Mariana da Silva Lopes
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de
Austropuccinia psidii

Versão revisada de acordo com a resolução CopGr6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **MARIA CAROLINA QUECINE VERDI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

RESUMO

Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de***Austropuccinia psidii***

Austropuccinia psidii (sin *Puccinia psidii*) é um fungo biotrófico que infecta diversos gêneros de mirtáceas. É uma ferrugem (Pucciniales) nativa da América do Sul que apresenta ampla distribuição e rápida dispersão geográfica, alcançando atualmente a Austrália, centro de diversidade das mirtáceas. Este patógeno tem alarmado a comunidade científica devido à vasta capacidade de dispersão e por causar perdas econômicas consideráveis em culturas de interesse comercial, com destaque na eucaliptocultura. Apesar de sua importância, estudos relacionados ao patossistema *A. psidii* - *Eucalyptus* ainda são incipientes, sendo que o entendimento das bases moleculares envolvidas na interação planta-patógeno é essencial para adoção de medidas de controle eficazes e duradouras. Atualmente, a busca por candidatos a efetores tem crescido consideravelmente, pois são moléculas capazes de alterar a fisiologia do hospedeiro, suprimindo ou ativando os mecanismos de defesa. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi identificar *in silico* genes candidatos a efetores e validá-los por meio de análise de expressão por RT-qPCR. Para predição dos genes candidatos a efetores foi utilizado o genoma parcial de *A. psidii* e uma *pipeline* específica, baseada em diversos parâmetros, tais como: presença do peptídeo sinal, ausência de domínio transmembrana e superfície de ancoragem e pequeno tamanho. Foram identificados 2.886 candidatos, dos quais 13% apresentaram similaridade com Pucciniales. As categorias mais importantes de localização subcelular preditas foram apoplasto (87,3%), cloroplasto (7%) e núcleo (4,1%). Oito candidatos foram selecionados para análise de expressão após mineração em dados de RNA-seq. Os ensaios foram realizados *in vitro* com uredósporos de duas populações distintas de *A. psidii*, uma proveniente de eucalipto (MF-1) e outra de *S. jambos* (GM-J1) e as amostras foram coletadas em 6, 12 e 24 horas após inoculação (h.a.i.). O perfil de expressão dos candidatos variou entre os tempos investigados, sendo que dois candidatos mostraram altos valores de expressão em todos os tempos, ao passo que quatro foram mais expressos nos tempos iniciais (6 e 12 h.a.i.). Os tempos iniciais correspondem às fases de germinação e pré-penetração, fortalecendo a predição desses quatro candidatos como apoplásticos. Foi observado um perfil diferencial de expressão entre as duas populações do patógeno, o que sugere uma provável modulação pelo hospedeiro de origem na expressão dos candidatos a efetores, fato ainda pouco abordado na literatura e que deve ser melhor investigado. Embora o trabalho tenha sido realizado *in vitro*, foi possível selecionar potenciais candidatos para continuidade dos estudos, incluindo a validação *in planta* e caracterização funcional. Os dados são relevantes em vista a escassez de informações biológicas desse patossistema e fornecem uma visão inicial de como esses efetores atuam na interação planta-patógeno.

Palavras-chave: Interação planta-patógeno; Ferrugem; Eucalipto; RT-qPCR

ABSTRACT

In silico identification and transcriptional profile of effector candidate genes from***Austropuccinia psidii***

Austropuccinia psidii (sin *Puccinia psidii*) is a biotrophic fungus that infects several genera of Myrtaceae. It is a rust (Pucciniales) native from South America that displays a broad distribution after have shown a quick geographic dispersion, being currently present even in Australia, which is Myrtaceae's diversity center. This pathogen has alarmed the scientific community due to its wide dispersion ability and because of considerable economic losses occurring in crops of commercial interest, especially eucalyptus cultures. Despite its importance, studies related to *A. psidii*-*Eucalyptus* pathosystem are still incipient and the understanding of the molecular basis involved in the plant-pathogen interaction is essential to develop effective and durable control mechanisms. Currently, the search for effector candidates has increased considerably since they are molecules that alter the host physiology, suppressing or activating the defense mechanisms. In this study, we aimed to identify in silico effectors candidate genes and also to validate them by expression analysis (RT-qPCR). To predict the effector candidate genes, we used the partial genome of *A. psidii* and a specific pipeline based on several parameters, such as small size, presence of signal peptide, absence of transmembrane domain and anchorage surface. A total of 2,886 candidates were identified, from which 13% are similar to Pucciniales. The most important categories of predicted subcellular localization were apoplast (87,3%), chloroplast (7%) e nucleus (4,1%). Eight candidates were selected for expression analysis after mining in RNA-seq data. The in vitro assays were carried out with uredospores from two distinct populations of *A. psidii*: one from eucalyptus (MF-1) and other from *S. jambos* (GM-J1); the samples were collected 6, 12 and 24 hours after inoculation (h.a.i). The expression profile of the candidates was distinct among the times investigated. The results showed that two candidates had high expression values in all times evaluated, while four were more expressed at 6 and 12 h.a.i. These times correspond to the germination and pre-penetration phases, corroborating with the prediction of these four candidates as apoplastics. A differential expression profile was found between the two pathogen populations, suggesting a probable modulation by the origin host in the expression of effectors candidates, what has not been extensively investigated and discussed in the literature on the topic. Although this study has been performed in vitro, it was possible to select potential candidates for further investigations, including in plant validation and functional characterization. The data presented here are relevant considering the scarcity of biological information about this pathosystem, besides providing an initial insight on how these effectors act in the plant-pathogen interaction.

Keywords: Plant-pathogen interaction; Rust; Eucalyptus; RT-qPCR

1. INTRODUÇÃO

Há uma grande diversidade de microrganismos na Terra, os quais atuam em diversos nichos ecológicos desempenhando inúmeras funções nos ecossistemas. Muitos microrganismos adaptaram-se a explorar as plantas como nichos, devido à variedade de microhabitats que estas apresentam, tais como, filosfera, rizosfera e endosfera (Montesinos, 2003), associada à disponibilidade de nutrientes e abrigo. Apesar de todas as plantas estudadas apresentarem microrganismos associados (Strobel et al., 2004) os quais podem trazer inúmeros benefícios às plantas, uma pequena fração, os denominados patógenos, foi capaz de superar os mecanismos de resistência e causar doenças em plantas (Montesinos, 2003; Ferreira et al., 2006).

Patógenos de plantas incluem bactérias, fungos e nematoides (Agrios, 2005), sendo que os fungos são considerados os patógenos mais importantes entre os eucariotos (Ferreira et al., 2006). De acordo com o estilo de vida podem ser classificados como necrotróficos, hemibiotróficos e biotróficos (Agrios, 2005). Os fungos biotróficos obtêm seus nutrientes de células vivas do hospedeiro, sendo inteiramente dependentes do mesmo para crescimento e reprodução (Catanzariti et al., 2006), dessa forma, seu estudo torna-se muito mais laborioso devido à dificuldade de cultivá-los *in vitro* (Quecine et al., 2014).

As ferrugens (Basidiomicetos da ordem Pucciniales) constituem o grupo mais diverso de patógenos biotróficos (Duplessis et al., 2011) e apresentam grande importância pelo fato de atacarem culturas de expressiva relevância econômica (Kolmer et al., 2009). *Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken conhecida como Ferrugem das Mirtáceas, infecta pelo menos 56 gêneros de mirtáceas (Machado et al., 2015), sendo os danos econômicos mais significativos na cultura do eucalipto. No Brasil, a eucaliptocultura representa aproximadamente 72% das florestas plantadas, com uma produtividade de 39 m³/ha.ano (IBÁ, 2015) e os danos causados pela doença podem ocasionar reduções entre 15 a 35% do incremento anual (Auer et al., 2016). Além disso, a preocupação com essa ferrugem tem crescido após a sua detecção na Austrália: centro de origem do eucalipto e centro de diversidade das mirtáceas (Carnegie et al., 2010).

Apesar da importância de *A. psidii*, pouco conhecimento se tem da sua biologia. Esforços têm sido realizados para sequenciamento do genoma do patógeno (Quecine et al., 2012; Tan et al., 2014), o qual pode elucidar as bases moleculares da interação planta-patógeno. Sabe-se que durante o processo de infecção ocorre uma batalha a nível molecular; enquanto os hospedeiros tentam reconhecer e impedir a germinação e prosseguimento da infecção, os patógenos tentam suprimir o reconhecimento pelo hospedeiro. Dentro desse contexto, as moléculas efetoras merecem destaque, pois podem suprimir o sistema de defesa das plantas para garantir o desenvolvimento da doença. Obviamente, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de reconhecer tais moléculas, o que estabelece o modelo zigue-zague na interação planta-patógeno (Hogenhout et al., 2009; Jones e Dangl, 2006).

Atualmente, há um grande esforço para caracterizar esses efetores, uma vez que fornecem um melhor entendimento sobre a patogenicidade, resistência e especificidade com os hospedeiros (Ellis et al., 2009). Além disso, os efetores têm sido alvo de novas estratégias de controle de doenças. É conhecido que cada efector contribui de forma parcial para a virulência final e muitos podem apresentar redundância funcional. Apesar disso, existem alguns efetores denominados de “fundamentais”, os quais desempenham contribuição relevante para a virulência (Dangl et al., 2013) e podem ser empregados no controle de doenças por meio da obtenção de hospedeiros resistentes (Dalió et al., 2014).

Considerando a importância dessas moléculas na interação planta-patógeno aliado ao escasso conhecimento a respeito da biologia do fungo *A. psidii*, o objetivo do presente trabalho foi identificar, *in silico*, genes candidatos a efetores presentes no genoma de *A. psidii* e validá-los por meio de análise de expressão gênica (RT-qPCR) durante o desenvolvimento *in vitro* de duas populações distintas do patógeno.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente pesquisa foi investigado o relatório de genes candidatos a efetores de *A. psidii*, obtendo-se 3.907 candidatos. Todos esses candidatos apresentaram o peptídeo sinal, ausência de domínio transmembrana e sinal de ancoragem, tamanho entre 45-414 aminoácidos, com tamanho médio de 71 aminoácidos. Dos 3.907 candidatos, 1.021 tinham sido previamente anotados como elementos de transposição (729) ou com classificações proteicas específicas (292). A presença de elementos transponíveis preditos como candidatos a efetores pode indicar que esses TEs estejam inseridos dentro de potenciais candidatos, demonstrando a contínua evolução em que estes genes estão expostos. Entretanto, essas sequências serão investigadas futuramente, juntamente com os candidatos anotados com funções enzimáticas e inibidoras.

Os 2.886 candidatos restantes foram anotados como proteínas hipotéticas ou não anotadas. Dos 419 candidatos descritos como hipotéticos 90% apresentaram similaridade com *P. graminis* e *M. larici-populina*, sendo considerados conservados em Pucciniales, enquanto os 2.467 candidatos não anotados foram considerados exclusivos de *A. psidii*. Por meio da predição de localização subcelular a maior parte dos candidatos foram preditos como apoplásticos, os quais são essenciais para patógenos biotróficos; quantidades relevantes de candidatos foram encontradas para as categorias nuclear e cloroplastidial.

Por meio da análise de expressão, dois candidatos não apresentaram perfil de efector, não sendo diferencialmente expresso em nenhum dos tempos analisados, entretanto a experimentação *in vitro* pode ter influenciado esses resultados. Um desses efetores possui como alvo o cloroplasto do hospedeiro, assim, esse candidato pode ser expresso em tempos mais tardios e/ou necessitar do estímulo da planta. Seis candidatos foram diferencialmente expressos nos tempos iniciais (6 e 12 h.a.i.), os quais correspondem a formação de tubos germinativos e apressórios. Com exceção de 27121 (predito como nuclear), os demais cinco candidatos foram preditos como apoplásticos, corroborando os dados de expressão encontrados.

Foram detectadas tendências no perfil de expressão entre as duas populações de *A. psidii* estudadas. O candidato 00372 apresentou aumento gradativo em todos os tempos analisados para MF-1 enquanto para GM-J1 esse aumento ocorreu até 12 h.a.i. Os candidatos 15800 e 00732 apresentaram diminuição gradativa de expressão para MF-1, enquanto para GM-J1 houve um aumento no tempo 12 h.a.i. Para o candidato 127358 houve expressão diferencial no intervalo 12-0h para MF-1, enquanto em GM-J1 o gene não foi diferencialmente expresso.

Apesar do trabalho ter sido realizado *in vitro*, trata-se do primeiro estudo de caracterização de candidatos a efetores de *A. psidii*, por meio do qual foi possível observar a expressão diferencial dos candidatos em determinados tempos e uma provável modulação pelo hospedeiro de origem. Tais dados fornecem uma visão inicial de como esses efetores atuam na interação planta-patógeno e necessitam ser validados *in planta* para posterior caracterização funcional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramovitch, R. B., Janjusevic, R., Stebbins, C. E., and Martin, G. B. 2006. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2851-2856.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th eds. Elsevier Academic Press, USA.
- AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.
http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Mafia, R. G., and Assis, T. F. 2009. Doenças causadas por agentes bióticos ou infecciosos. Pages 199-301 in: *Clonagem e Doenças do Eucalipto*. A. C. Alfenas, E. A. V. Zauza, R. G. Mafia, and T. F. Assis, eds. Editora UFV, Viçosa-MG, Brazil.
- Andrade, E. N. D. 1961. *O eucalipto*. Companhia Paulista de Estrada de Ferro, São Paulo.
- Auer, C. G., dos Santos, A. I., and Furtado, E. L. 2016. Doenças do eucalipto Pages 359-372 in: *Manual de Fitopatologia*, L. Amorim, J. M. A. Rezende, A. Bergamim-Filho, and L. E. A. Camargo, eds. Editora Ceres. Piracicaba-SP, Brazil.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J. Y., Li, W. W., and Noble, W. S. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* 37:W202-W208.
- Baxter, L., Tripathy, S., Ishaque, N., Boot, N., Cabral, A., Kemen, E., Thines, M., Ah-Fong, A., Anderson, R., Badejoko, W., Bittner-Eddy, P., Boore, J. L., Chibucos, M. C., Coates, M., Dehal, P., Delehaunty, K., Dong, S. M., Downton, P., Dumas, B., Fabro, G., Fronick, C., Fuerstenberg, S. I., Fulton, L., Gaulin, E., Govers, F., Hughes, L., Humphray, S., Jiang, R. H. Y., Judelson, H., Kamoun, S., Kyung, K., Meijer, H., Minx, P., Morris, P., Nelson, J., Phuntumart, V., Qutob, D., Rehmany, A., Rougon-Cardoso, A., Ryden, P., Torto-Alalibo, T., Studholme, D., Wang, Y. C., Win, J., Wood, J., Clifton, S. W., Rogers, J., Van den Ackerveken, G., Jones, J. D. G., McDowell, J. M., Beynon, J., and Tyler, B. M. 2010. Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Genome. *Science* 330:1549-1551.
- Beck, M., Heard, W., Mbengue, M., and Robatzek, S. 2012. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* 15:367-374.
- Beenken, L. 2017. Austropuccinia: a new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). *Phytotaxa* 297:53-61.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340:783-795.
- Bini, A. P. 2016. Estudo molecular do desenvolvimento de *Puccinia psidii* Winter *in vitro* e no processo de infecção em *Eucalyptus grandis*. Thesis. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.
- Birch, P. R. J., Boevink, P. C., Gilroy, E. M., Hein, I., Pritchard, L., and Whisson, S. C. 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 11:373-379.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406.
- Boller, T., and He, S. Y. 2009. Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324:742-744.

- Bos, J. I. B., Kanneganti, T. D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M. R., Birch, P. R. J., and Kamoun, S. 2006. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* 48:165-176.
- Caillaud, M. C., Piquerez, S. J. M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J. D. G. 2012. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. *Plant Journal* 69:252-265.
- Castro, H. A., Krugner, T. L., Ideriha, C. H. F., Cappello, M. S. C., and Marchi, A. B. 1983 Cross-inoculation of *Eucalyptus*, guava (*Psidium guajava*), and rose apple (*Syzygium jambos*) with *Puccinia psidii*. *Fitopatologia Brasileira* 8, 491–497.
- Cantu, D., Govindarajulu, M., Kozik, A., Wang, M. N., Chen, X. M., Kojima, K. K., Jurka, J., Michelmore, R. W., and Dubcovsky, J. 2011. Next Generation Sequencing Provides Rapid Access to the Genome of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the Causal Agent of Wheat Stripe Rust. *Plos One* 6:e24230.
- Cantu, D., Segovia, V., MacLean, D., Bayles, R., Chen, X. M., Kamoun, S., Dubcovsky, J., Saunders, D. G. O., and Uauy, C. 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.
- Carnegie, A. J., and Lidbetter, J. R. 2012. Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. *Australasian Plant Pathology* 41:13-29.
- Carnegie, A. J., Lidbetter, J. R., Walker, J., Horwood, M. A., Tesoriero, L., Glen, M., and Priest, M. J. 2010. *Uredo rangellii*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on Myrtaceae in Australia. *Australasian Plant Pathology* 39:463-466.
- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ayliffe, M. A., and Ellis, J. G. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18:243-256.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., Guo, W. J., Kim, J. G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B., and Frommer, W. B. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468:527-532.
- Coll, N., Epple, P., and Dangl, J. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell death and differentiation* 18:1247-1256.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676.
- Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C., and Crous, P. W. 1998. Eucalyptus rust: A disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease* 82:819-825.
- Dalio, R. J. D., Magalhães, D. M., Atílio, L. B., Rodrigues, C. M., Breton, M. C., Pichi, S., Pascholati, S. F., Machado, M. A. 2014. Efetores na interação planta-patógeno. *Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo* 22:25-68.
- Damasceno, C. M. B., Bishop, J. G., Ripoll, D. R., Win, J., Kamoun, S., and Rose, J. K. C. 2008. Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *Phytophthora* species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:820-830.

- Dangl, J. L., Horvath, D. M., and Staskawicz, B. J. 2013. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science* 341:746-751.
- Da Silva, R. R. 2010. Identificação de genes que codificam proteínas secretadas por *Puccinia psidii*, agente etiológico da ferrugem das mirtáceas. Dissertation. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
- De Carvalho, A. D. O., Alfenas, A. C., Maffia, L. A., and do Carmo, M. G. F. 1998. Resistência de espécies, progênies e procedências de Eucalyptus à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33:139-147.
- De Carvalho, M., Nascimento, L. C., Darben, L. M., Polizel-Podanosqui, A. M., Lopes-Caitar, V. S., Qi, M. S., Rocha, C. S., Carazzolle, M. F., Kuwahara, M. K., Pereira, G. A. G., Abdelnoor, R. V., Whitham, S. A., and Marcelino-Guimaraes, F. C. 2017. Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. *Molecular Plant Pathology* 18:363-377.
- De Jonge, R., Bolton, M. D., and Thomma, B. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 14:400-406.
- De Souza, T. A., Soprano, A. S., de Lira, N. P. V., Quaresma, A. J. C., Pauletti, B. A., Leme, A. F. P., and Benedetti, C. E. 2012. The TAL Effector PthA4 Interacts with Nuclear Factors Involved in RNA-Dependent Processes Including a HMG Protein That Selectively Binds Poly (U) RNA. *Plos One* 7: e32305.
- De Wit, P. 2016. Apoplastic fungal effectors in historic perspective; a personal view. *New Phytologist* 212:805-813.
- Dianese, J. C., Moraes, T. S. D., and Silva, A. R. 1984. Response of eucalyptus species to field infection by *Puccinia psidii*. *Plant Disease* 68:314-316.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Amann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., and Kahmann, R. 2009. Pep1, a Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis*, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. *Plos Pathogens* 5: e1000290.
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Jiang, R. H., Bruce, N. A., Arredondo, F. D., Zhang, X., and Tyler, B. M. 2008. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *The Plant Cell* 20:1930-1947.
- Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y. C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D. L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B. L., Chiu, R., Coutinho, P. M., Feau, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M. G., Kodira, C. D., Kohler, A., Kues, U., Lindquist, E. A., Lucas, S. M., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J. L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Salamov, A. A., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G. A., Henrissat, B., Van de Peer, Y., Rouze, P., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Schein, J. E., Zhong, S. B., Hamelin, R. C., Grigoriev, I. V., Szabo, L. J., and Martin, F. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:9166-9171.
- Ellis, J. G., Rafiqi, M., Gan, P., Chakrabarti, A., and Dodds, P. N. 2009. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 12:399-405.
- Fankhauser, N., and Maser, P. 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics* 21:1846-1852.

- FAO, 2015. Global Forest Resources Assessment 2015: How are the world's forests changing? <http://www.fao.org/3/a-i4793e.pdf>
- Fernandez, D., Tisserant, E., Talhinhos, P., Azinheira, H., Vieira, A., Petitot, A. S., Loureiro, A., Poulain, J., Da Silva, C., Silva, M. D. C., and Duplessis, S. 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. *Molecular Plant Pathology* 13:17-37.
- Ferreira, F. 1983. Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore* 7:92-109.
- Ferreira, R. B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C. N., Chen, Z. J., Batista, L. M., Duarte, J., Borges, A., and Teixeira, A. R. 2006. Fungal pathogens: The battle for plant infection. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:505-524.
- Figueiredo, M., and Passador, M. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. 2008. *Arq. Inst. Biol.* 75:117-134.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J., and Bateman, A. 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44:D279-D285.
- Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275–296.
- Franceschetti, M., Maqbool, A., Jimenez-Dalmaroni, M. J., Pennington, H. G., Kamoun, S., and Banfield, M. J. 2017. Effectors of Filamentous Plant Pathogens: Commonalities amid Diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81: e00066-16.
- Fu, Z. Q., Guo, M., Jeong, B. R., Tian, F., Elthon, T. E., Cerny, R. L., Staiger, D., and Alfano, J. R. 2007. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* 447:284-U281.
- Giblin, F. 2013. Myrtle rust report: New Caledonia. Assessment of myrtle rust situation in New Caledonia. University of the Sunshine Coast Maroochydore, Queensland.
- Glen, M., Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Wingfield, M. J., and Mohammed, C. 2007. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy a review. *Australasian Plant Pathology* 36:1-16.
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., and Thordal-Christensen, H. 2010. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* 11:317.
- Gohre, V., and Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* 46: 189-215
- Goldberg, T., Hecht, M., Hamp, T., Karl, T., Yachdav, G., Ahmed, N., Altermann, U., Angerer, P., Ansoerge, S., Balasz, K., Bernhofer, M., Betz, A., Cizmadija, L., Do, K. T., Gerke, J., Greil, R., Joerdens, V., Hastreiter, M., Hembach, K., Herzog, M., Kalemanov, M., Kluge, M., Meier, A., Nasir, H., Neumaier, U., Prade, V., Reeb, J., Sorokoumov, A., Troshani, I., Vorberg, S., Waldraff, S., Zierer, J., Nielsen, H., and Rost, B. 2014. LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Research* 42:W350-W355.
- Graça, R. N., Ross-Davis, A. L., Klopfenstein, N. B., Kim, M. S., Peever, T. L., Cannon, P. G., Aun, C. P., Mizubuti, E. S., and Alfenas, A. C. 2013. Rust disease of eucalypts, caused by *Puccinia psidii*, did not originate via host jump from guava in Brazil. *Molecular ecology* 22:6033-6047.
- Hacquard, S., Joly, D. L., Lin, Y. C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legue, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van de Peer, Y., Rouze, P., Martin, F., Hamelin, R. C., and 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* 25:279-293.

- Hennen, J. F., Figueiredo, M. B., de Carvalho Jr, A. A., and Hennen, P. G. 2005. Catalogue of the species of plant rust fungi (Uredinales) of Brazil. Instituto de Pesquisas, Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Brazil.
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R., and Kamoun, S. 2009. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:115-122.
- Holub, E. B., and Cooper, A. 2004. Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. *Trends in Plant Science* 9:211-214.
- Howden, A. J. M., and Huitema, E. 2012. Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity. *Frontiers in Plant Science* 3:1-6.
- IBÁ, 2015. Relatório estatístico Indústria Brasileira de Árvores. http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., and Stebbins, C. E. 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311:222-226.
- Jashni, M. K., Dols, I. H. M., Iida, Y., Boeren, S., Beenen, H. G., Mehrabi, R., Collemare, J., and de Wit, P. 2015. Synergistic Action of a Metalloprotease and a Serine Protease from *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* Cleaves Chitin-Binding Tomato Chitinases, Reduces Their Antifungal Activity, and Enhances Fungal Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28:996-1008.
- Jiang, R. H. 2011. Dynamics of effectors in host–pathogen interactions. *Mycology* 2:210-217.
- Jiang, R. H. Y., Tripathy, S., Govers, F., and Tyler, B. M. 2008. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:4874-4879.
- Joffily, J. 1944. Ferrugem do eucalipto. *Bragantia* 4:475-48.
- Jones, D. A., and Takemoto, D. 2004. Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* 16:48-62.
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Joosten, M., Vogelsang, R., Cozijnsen, T. J., Verberne, M. C., and De Wit, P. 1997. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *The Plant Cell* 9:367-379.
- Junghans, D. T. 2000. Quantificação da severidade, herança da resistência e identificação de marcadores RAPD ligados à resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis*. Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Kamoun, S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 44:41-60.
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegele, R. T. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:1130-1139.
- Kleemann, J., Takahara, H., Stuber, K., and O'Connell, R. 2008. Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags. *Microbiology* 154:1204-1217.
- Kolmer, J. A., Ordonez, M. E., and Groth, J. V. 2009. The Rust Fungi. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

- Kong, G. H., Zhao, Y., Jing, M. F., Huang, J., Yang, J., Xia, Y. Q., Kong, L., Ye, W. W., Xiong, Q., Qiao, Y. L., Dong, S. M., Ma, W. B., and Wang, Y. C. 2015. The Activation of *Phytophthora* Effector Avr3b by Plant Cyclophilin is Required for the Nudix Hydrolase Activity of Avr3b. *Plos Pathogens* 11: e1005139.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305:567-580.
- Lee, A. H. Y., Hurley, B., Felsensteiner, C., Yea, C., Ckurshumova, W., Bartetzko, V., Wang, P. W., Quach, V., Lewis, J. D., Liu, Y. L. C., Bornke, F., Angers, S., Wilde, A., Guttman, D. S., and Desveaux, D. 2012. A Bacterial Acetyltransferase Destroys Plant Microtubule Networks and Blocks Secretion. *Plos Pathogens* 8: e1002523.
- Lee, S. J., Kelley, B. S., Damasceno, C. M. B., John, B. S., Kim, B. S., Kim, B. D., and Rose, J. K. C. 2006. A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1368-1377.
- Leite, T.F. 2012. Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter por meio da técnica de RNA-Seq. Thesis. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.
- Link, T. I., and Voegele, R. T. 2008. Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Molecular Plant Pathology* 9:59-66.
- Link, T. I., Lang, P., Scheffler, B. E., Duke, M. V., Graham, M. A., Cooper, B., Tucker, M. L., Van De Mortel, M., Voegele, R. T., Mendgen, K., Baum, T. J., and Whitham, S. A. 2014. The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizii* and their candidate effector families. *Molecular Plant Pathology* 15:379-393.
- Lodish, H. 2012. *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Luderer, R., Takken, F. L. W., de Wit, P., and Joosten, M. 2002. *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Molecular Microbiology* 45:875-884.
- Ma, Y., Walker, R. K., Zhao, Y. C., and Berkowitz, G. A. 2012. Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:19852-19857.
- Machado, P. D., Glen, M., Pereira, O. L., Silva, A. A., and Alfenas, A. C. 2015. Epitypification of *Puccinia psidii*, Causal Agent of Guava Rust. *Tropical Plant Pathology* 40:5-12.
- MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Toth, R., Nicolaisen, M., and Hogenhout, S. A. 2011. Phytoplasma Effector SAP54 Induces Indeterminate Leaf-Like Flower Development in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology* 157:831-841.
- McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S. C., Beynon, J. L., and Birch, P. R. 2013. An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription factors from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *PLoS pathogens* 9:e1003670.
- McTaggart, A. R., Roux, J., Granados, G. M., Gafur, A., Tarrigan, M., and Santhakumar, W. M. J. 2016 Rust (*Puccinia psidii*) recorded in Indonesia poses a threat to forests and forestry in southeast Asia. *Australas Plant Path* 45:83-89.

- McTaggart, A., Shuey, L., Granados, G., du Plessis, E., Fraser, S., Barnes, I., Naidoo, S., Wingfield, M., and Roux, J. 2017. Evidence that *Austropuccinia psidii* may complete its sexual life cycle on Myrtaceae. Plant Pathology doi: 10.1111/ppa.12763.
- Masson, M. V. 2009. Ferrugem do eucalipto: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico. Dissertation. Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, Brazil.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A. 1997. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. Cell 91:295-298.
- Mesarich, C. H., Griffiths, S. A., van der Burgt, A., Okmen, B., Beenen, H. G., Etalo, D. W., Joosten, M., and de Wit, P. 2014. Transcriptome Sequencing Uncovers the Avr5 Avirulence Gene of the Tomato Leaf Mold Pathogen *Cladosporium fulvum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 27:846-857.
- Montesinos, E. 2003. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. International Microbiology 6:221-223.
- Morin, L., Talbot, M. J., and Glen, M. 2014. Quest to elucidate the life cycle of *Puccinia psidii* sensu lato. Fungal Biology 118:253-263.
- Nemri, A., Saunders, D. G. O., Anderson, C., Upadhyaya, N. M., Win, J., Lawrence, G. J., Jones, D. A., Kamoun, S., Ellis, J. G., and Dodds, P. N. 2014. The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. Frontiers in Plant Science 5:1-14.
- Oh, S. K., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Win, J., Bos, J. I. B., Liu, H. Y., van Damme, M., Morgan, W., Choi, D., Van der Vossen, E. A. G., Vleeshouwers, V., and Kamoun, S. 2009. In Planta Expression Screens of *Phytophthora infestans* RXLR Effectors Reveal Diverse Phenotypes, Including Activation of the Solanum bulbocastanum Disease Resistance Protein Rpi-blb2. Plant Cell 21:2928-2947.
- Oßwald, W., Fleischmann, F., Rigling, D., Coelho, A. C., Cravador, A., Diez, J., Dalio, R. J., Jung, M. H., Pfan, H., Robin, C., Sipos, G., Solla, A., Cech, T., Chambery, A., Diamandis, S., Hansen, E., Jung, T., Orlikowski, L. B., Parke, J., Prospero, S., and Werres, S. 2014. Strategies of attack and defence in woody plant-Phytophthora interactions. Forest Pathology 44:169-190.
- Panstruga, R., and Dodds, P. N. 2009. Terrific Protein Traffic: The Mystery of Effector Protein Delivery by Filamentous Plant Pathogens. Science 324:748-750.
- Pascholati, S. F. (2011). Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. Pages 543-589 in: Manual de Fitopatologia., L. Amorim, J. M. A. Rezende, and A. Bergamim-Filho, eds. Editora Ceres. Piracicaba-SP, Brazil.
- Pereira, J. C. D., Sturion, J. A., Higa, A. R., Higa, R. C. V., and Shimizu, J. Y. 2000. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Embrapa Florestas, Colombo, PR.
- Pereira, A. L. A., Carazzolle, M. F., Abe, V. Y., de Oliveira, M. L. P., Domingues, M. N., Silva, J. C., Cernadas, R. A., and Benedetti, C. E. 2014. Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response. BMC Genomics 15:157.
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2015. Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Target Diverse Plant Cell Compartments. Molecular Plant-Microbe Interactions 28:689-700.

- Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G. O., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2016. Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. *Cellular Microbiology* 18:453-465.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45.
- Porto, B. N. 2016. Sequenciamento do genoma e identificação de candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix*. Thesis. Universidade Estadual de Lavras, Lavras, Brazil.
- Povolotskaya, I. S., and Kondrashov, F. A. 2010. Sequence space and the ongoing expansion of the protein universe. *Nature* 465:922-926.
- Quecine, M. C., Moon, D. H., Franceschini, L. V., Bini, A. L., Leite, T. F., and Labate, C. A. 2012. De novo partial genome assembly of the biotrophic eucalyptus rust pathogen *Puccinia psidii*. In: XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interaction, Kioto, Japão.
- Quecine, M. C., Bini, A. P., Romagnoli, E. R., Andreote, F. D., Moon, D. H., and Labate, C. A. 2014. Genetic Variability in *Puccinia psidii* Populations as Revealed by PCR-DGGE and T-RFLP Markers. *Plant Disease* 98:16-23.
- Quecine, M. C., Leite, T. F., Bini, A. P., Regiani, T., Franceschini, L. M., Budzinski, I. G. F., Marques, F. G., Labate, M. T. V., Guidetti-Gonzalez, S., Moon, D. H., and Labate, C. A. 2016. Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of *Puccinia psidii* Uredospores Reveals Differences of Fungal Populations Infecting Eucalyptus and Guava. *Plos One* 11: e0145343.
- Rep, M., van der Does, H. C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., de Koster, C. G., and Cornelissen, B. J. C. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology* 53:1373-1383.
- Resende, M. L. V., Salgado, S. M., and Chaves, Z. M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28:123-130.
- Rodriguez-Herva, J. J., Gonzalez-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antunez-Lamas, M., Rio-Alvarez, I., Li, Z., Lopez-Torreon, G., Diaz, I., del Pozo, J. C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodriguez-Palenzuela, P., and Lopez-Solanilla, E. 2012. A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cellular Microbiology* 14:669-681.
- Rooney, H. C. E., van 't Klooster, J. W., van der Hoorn, R. A. L., Joosten, M., Jones, J. D. G., and de Wit, P. 2005. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308:1783-1786.
- Roux, J., Greyling, I., Coutinho, T. A., Verleur, M., and Wingfield, M. J. 2013. The Myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. *IMA Fungus* 4:155-159.
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balague, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., and Raffaele, S. 2014. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* 15:427-432.
- Ruiz, R., Alfenas, A., Maffia, L., and Barbosa, M. d. M. 1989. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* 14:73-81.
- Santos, C. 2006. Estudos epidemiológicos da ferrugem do eucalipto causado por *Puccinia psidii* em plantios irrigados. Dissertation. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, Brazil.

- Saunders, D. G. O., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., and Raffaele, S. 2012. Using Hierarchical Clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *Plos One* 7: e29847.
- Schorneck, S., van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E. 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:17421-17426.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., and van der Hoorn, R. A. L. 2008. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related Cys proteases of tomato. *Plant Cell* 20:1169-1183.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J. E., and Innes, R. W. 2003. Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301:1230-1233.
- Simpson, J. A., Thomas, K., and Grgurinovic, C. A. 2006. Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. *Australasian Plant Pathology* 35:549-562.
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Dodds, P. N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K. B., Manners, J. M., and Taylor, J. M. 2016. EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist* 210:743-761.
- Stukenbrock, E. H., and McDonald, B. A. 2008 The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 46:75–100.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67:257-268.
- Sugio, A., Kingdom, H. N., MacLean, A. M., Grieve, V. M., and Hogenhout, S. A. 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:E1254-E1263.
- Takahashi, S. S. 2002. Ferrugem do eucalipto: índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados a intensidade da doença no campo. Dissertation. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, Brazil.
- Talhinhas, P., Azinheira, H. G., Vieira, B., Loureiro, A., Tavares, S., Batista, D., Morin, E., Petitot, A. S., Paulo, O. S., Poulain, J., Da Silva, C., Duplessis, S., Silva, M. D., and Fernandez, D. 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* 5:1-17.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Tan, M.-K., Collins, D., Chen, Z., Englezou, A., and Wilkins, M. R. 2014. A brief overview of the size and composition of the myrtle rust genome and its taxonomic status. *Mycology* 5:52-63.
- Tessmann, D. J., and Dianese, J. C. 2002. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. *Fitopatologia Brasileira* 27:538-542.
- Tian, M. Y., Huitema, E., da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., and Kamoun, S. 2004. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *Journal of Biological Chemistry* 279:26370-26377.

- Tian, M. Y., Benedetti, B., and Kamoun, S. 2005. A second kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiology* 138:1785-1793.
- Tian, M. Y., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E., and Kamoun, S. 2007. A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiology* 143:364-377.
- Torres-Zabala, M. D., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., Tillich, M., Licht, D., Bolter, B., Delfino, L., Truman, W., Mansfield, J., Smirnoff, N., and Grant, M. 2015. Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature Plants* 1:1-10.
- Torto, T. A., Li, S. A., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N. A. R., van West, P., and Kamoun, S. 2003. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Research* 13:1675-1685.
- Tsuda, K., and Katagiri, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13:459-465.
- Tsui, S. 2015. Estudo dos elementos transponíveis em *Puccinia psidii* Winter, agente causal da ferrugem em *Eucalyptus* spp. Dissertation. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.
- Van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cakir, C., Schornack, S., Sklenar, J., Jones, A. M. E., and Kamoun, S. 2012. The Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora infestans* Translocates the CRN8 Kinase into Host Plant Cells. *Plos Pathogens* 8: e1002875.
- Van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M., Vervoort, J., and de Wit, P. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1420-1430.
- Van Poppel, P., Jiang, R. H. Y., Sliwka, J., and Govers, F. 2009. Recognition of *Phytophthora infestans* Avr4 by potato R4 is triggered by C-terminal domains comprising W motifs. *Molecular Plant Pathology* 10:611-620.
- Van den Ackerveken, G., Dunn, R. M., Cozijnsen, A. J., Vossen, J., Vandenbroek, H. W. J., and Dewit, P. 1994. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene avr9 in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular & General Genetics* 243:277-285.
- Vleeshouwers, V., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S. K., Wang, M. Q., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., Govers, F., Kamoun, S., and Van der Vossen, E. A. G. 2008. Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and *Phytophthora Infestans* Avirulence Genes. *Plos One* 3: e2875.
- Wang, C. I. A., Guncar, G., Forwood, J. K., Teh, T., Catanzariti, A. M., Lawrence, G. J., Loughlin, F. E., Mackay, J. P., Schirra, H. J., Anderson, P. A., Ellis, J. G., Dodds, P. N., and Kobe, B. 2007. Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and -D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity. *Plant Cell* 19:2898-2912.
- Wang, Q. Q., Han, C. Z., Ferreira, A. O., Yu, X. L., Ye, W. W., Tripathy, S., Kale, S. D., Gu, B. A., Sheng, Y. T., Sui, Y. Y., Wang, X. L., Zhang, Z. G., Cheng, B. P., Dong, S. M., Shan, W. X., Zheng, X. B., Dou, D. L., Tyler, B. M., and Wang, Y. C. 2011. Transcriptional Programming and Functional Interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR Effector Repertoire. *Plant Cell* 23:2064-2086.

- Wernersson, R. 2006. Virtual Ribosome - a comprehensive DNA translation tool with support for integration of sequence feature annotation. *Nucleic Acids Research* 34:W385-W388.
- Win, J., Kamoun, S., and Jones, A. M. 2011. Purification of effector–target protein complexes via transient expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant immunity: methods and protocols* 712:181-194.
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., and Hogenhout, S. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. Pages 235-247 in: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wietholter, N., Horn, S., Reisinger, K., Beike, U., and Moerschbacher, B. M. 2003. In vitro differentiation of haustorial mother cells of the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, triggered by the synergistic action of chemical and physical signals. *Fungal Genet Biol.* 38: 320–326.
- Xavier, A. A., Alfenas, A. C., Matsuoka, K., and Hodges, C. S. 2001. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 30:277-281.
- Zipfel, C., and Robatzek, S. 2010. Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity: Veni, Vidi ... ? *Plant Physiology* 154:551-554