



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**SISTEMATIZAÇÃO DE ESTUDOS DE EFETORES PROTEICOS
EM FITOPATÓGENOS FÚNGICOS E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PROTEÍNA CANDIDATA A EFETORA DE *Moniliophthora roreri***

TAÍS ARAÚJO SANTOS

ILHÉUS-BA/ JUNHO/ 2022

TAÍS ARAÚJO SANTOS

**SISTEMATIZAÇÃO DE ESTUDOS DE EFETORES PROTEICOS
EM FITOPATÓGENOS FÚNGICOS E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PROTEÍNA CANDIDATA A EFETORA DE *Moniliophthora roreri***

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz, como parte de
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de conhecimento: Genética
Molecular e de Microrganismos

ILHÉUS-BA/ JUNHO/ 2022

S237

Santos, Taís Araújo.

Sistematização de estudos de efetores proteicos em fitopatógenos fúngicos e caracterização de uma proteína candidata a efetora de *Moniliophthora roreri* / Taís Araújo Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2022.

104f. : il.

Orientador: Carlos Priminho Pirovani

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGGBM
Inclui referências.

1. Cacaueiro. 2. Predisposição genética para doença. 3. Expressão gênica. 4. Revisão sistemática . I. Título.

CDD 633.74

TAÍS ARAÚJO SANTOS

**SISTEMATIZAÇÃO DE ESTUDOS DE EFETORES PROTEICOS
EM FITOPATÓGENOS FÚNGICOS E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PROTEÍNA CANDIDATA A EFETORA DE *Moniliophthora roreri***

Aprovada: 15 de junho de 2022

Qualificação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte de requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.
Área de conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos

Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC)

Dra. Irma Yuliana Mora Ocampo
(UESC)

Dr. Ronaldo José Durigan Dalio
(IdeeLabBiotecnologia)

Dr. Carlos Priminho Pirovani
(UESC – orientador)

AGRADECIMENTOS

Com muita gratidão, chego até aqui. Agradeço primeiramente a Deus, por ter me conduzido e amparado nos momentos difíceis.

A minha família, em especial, aos meus pais, por me ouvirem, por sempre apoiar minhas decisões e pela confiança que tem em mim, eu amo muito vocês.

Ao meu noivo, por acreditar em mim, pelos bons momentos e por sempre arranjar um jeito de me fazer sorrir.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Priminho Pirovani, pela atenção sempre dada quando requisitada, pela boa convivência e ensinamentos.

À equipe de orientação, em especial, Dra. Ariana Silva Santos, pelas contribuições e ajuda.

Aos Proteômicos, pela agradável convivência e por me acolher tão bem. Em especial, Aline, Hermanna, Keilane, Laiana, Mona, Malu, Vanessa e Yuli, vocês tornaram a minha passagem pelo mestrado muito mais fácil.

Aos demais colegas e amigos dos laboratórios de Cultura de tecidos e Biomol.

Às colegas de apartamento, Letícia, Amanda e Andresa que representam a minha família em Itabuna.

A todos os componentes dos grupos “Amigas”, “Garotas proteômica”, “Bonde do cleitinho” e “Patotinha”, pelas conversas compartilhadas, amizade, gargalhadas, trocas de experiências, ajuda e conselhos.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, por me proporcionar um ambiente repleto de oportunidades e aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Monilíase do cacaueiro	12
2.2. Interação planta-patógeno	15
2.3. Proteínas efetoras de fungos fitopatogênicos	19
2.4. Caracterização de proteínas efetoras e seu potencial biotecnológico	21
2.5. Sistematização de estudos científicos	24
CAPÍTULO I	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1. Desenho do estudo	28
2.2. Seleção dos estudos	29
2.3. Extração e sumarização de dados	30
3. RESULTADOS	30
3.1. Dados bibliométricos	30
3.2. Fitopatógenos fúngicos e seus efetores	32
3.3. Modos de ação das proteínas efetoras fúngicas	33
3.4. Direcionamento celular dos efetores proteicos	33
3.5. Técnicas utilizadas para a caracterização funcional de proteínas efetoras	34
4. DISCUSSÃO	35
4.1. O modo de ação dos efetores é baseado na relação do patógeno com as plantas hospedeiras	36
4.2. Efetores são categorizados de acordo com seu local de atuação	38
4.3. Abordagens experimentais utilizadas para a caracterização de efetores	40
5. CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO II	70
1. INTRODUÇÃO	71
2. MATERIAIS E MÉTODOS	73
2.1. Seleção do candidato a efetor	73
2.2. Análises <i>in silico</i>	73
2.3. Transformação e expressão da proteína recombinante em <i>Escherichia coli</i>	74
2.4. Espectrometria de massas	74
2.5. Purificação da proteína recombinante	75
2.6. Espectroscopia de dicroísmo circular	75

2.7. Ensaio de morte celular.....	75
2.8. Detecção de H ₂ O ₂	76
3. RESULTADOS	76
3.1. As análises <i>in silico</i> prever a proteína Moror_12486 uma candidata a efetora.	76
3.2. Expressão e purificação de rMOROR_12486	76
3.3. rMOROR_12486 induz morte celular em plantas de tomate.....	78
3.4. O acúmulo de H ₂ O ₂ é aumentado na presença de rMOROR_12486.....	79
3.5. Análise de espectroscopia de CD da estrutura secundária de rMOROR_12486	80
4. DISCUSSÃO.....	81
5. CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES	91

RESUMO

SANTOS, Taís Araújo M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Junho de 2022. **Sistematização de estudos de efetores proteicos em fitopatógenos fúngicos e caracterização de uma proteína candidata a efetora de *Moniliophthora roreri*.** Orientador: Carlos Priminho Pirovani. Co-orientadoras: Ariana Silva Santos e Virgínia Lúcia Fontes Soares.

Patógenos fúngicos são responsáveis por inúmeras doenças e têm causado grandes perdas à produção agrícola. A Monilíase do cacaueiro, causada pelo fungo *Moniliophthora roreri*, é uma das principais doenças que afeta drasticamente a produção de cacau no mundo. Com o propósito de estabelecer interações compatíveis com seus hospedeiros, os patógenos secretam moléculas conhecidas como efetores durante a sua colonização na planta. Caracterizar a funcionalidade das proteínas efetoras melhorará nossa compreensão sobre o seu papel no patossistema e influenciará em estratégias futuras para combater infecções por fungos fitopatogênicos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo sistematizar os estudos de proteínas efetoras fúngicas caracterizadas nos diferentes patossistemas, bem como caracterizar uma proteína candidata à efetora do fungo *M. roreri*. No capítulo I, uma revisão sistemática foi desenvolvida com base nas diretrizes PRISMA, com o intuito de sistematizar informações e fornecer o estudo da arte sobre as proteínas efetoras caracterizadas até o momento. A pesquisa foi realizada usando as bases de dados PubMed, Science Direct e Web of Science. Um total de 2.114 artigos relacionados à string de pesquisa foram selecionados. Após a fase de seleção e extração, 103 estudos foram aceitos, e utilizados na fase de sumarização dos dados. Em relação aos fungos estudados, 68% pertencem ao filo ascomycota, sendo 32% das espécies estudadas pertencente ao filo basidiomycota. A revisão reuniu um total de 28 patógenos, sendo o *Magnaporthe oryzae* a espécie que apresentou um maior percentual (29%) de proteínas efetoras estudadas. Até o momento da pesquisa, foram identificados um total de 108 proteínas caracterizadas, sendo secretadas por fungos biotróficos (47%), hemibiotróficos (32%) e necrotróficos (21%). Em relação ao compartimento em que as proteínas tiveram como alvo, 49% atuam no apoplasto e 51% no citoplasma. Os efetores apoplásticos estão associados com funções inibitórias, interferindo em proteases e quitinases. Por outro lado, os citoplasmáticos atuam sobre alvos intracelulares interferindo em processos associados com a defesa da planta. O capítulo II consistiu em caracterizar funcionalmente uma proteína candidata a efetora de *M. roreri*, homóloga à BASIDINA, caracterizada em *M.*

perniciosa. Esta proteína demonstrou ser um potencial efetor ao interferir no sistema ao afetar a fisiologia das células hospedeiras. Os resultados das análises da sequência proteica demonstraram que MOROR_12486 possui características comuns a outras proteínas efetoras descritas na literatura, como presença de peptídeo sinal, baixa massa molecular, ausência de domínios conservados e localização extracelular. A estirpe Rosetta (DE3) de *Escherichia coli* foi transformada com o vetor pET28a contendo uma ORF otimizada para expressão da rMOROR_12486. Uma proteína de aproximadamente 20 kDa foi expressa mediante adição de IPTG, o que corresponde à massa molecular estimada para a proteína rMOROR_12486 com a His-Tag derivada do vetor. A identidade dessa proteína foi confirmada por espectrometria de massas. Dessa forma, a proteína recombinante marcada com His₆ foi purificada por cromatografia de afinidade a partir da fração insolúvel do extrato de *E. coli*. Os espectros de dicroísmo circular demonstraram que rMOROR_12486 não perde a conformação quando é tratada a 95 °C, indicando que se trata de uma proteína termoestável. Além disso, rMOROR_12486 desencadeia morte celular e atua elicitando respostas de defesa ao induzir o acúmulo de H₂O₂ em *Solanum lycopersicum*, indicativo de uma resposta de defesa hipersensível, sugerindo seu reconhecimento por receptores imunes em plantas não hospedeiras. Em conclusão, a revisão permitiu sistematizar os efetores de fungos fitopatogênicos já caracterizados na literatura e compreender seus mecanismos de ação nos patossistemas. Porém muitos efetores ainda não possuem sua função revelada, a exemplo dos efetores de fungos basidiomycotas, destacando então a necessidade de estudos para a elucidação dessas funções. Dessa forma, o capítulo II traz dados científicos sobre os efeitos da proteína efetora do basidiomycota *M. roreri*. Os resultados demonstraram que rMOROR_12486 o homólogo da BASIDINA, de forma semelhante, induziu o acúmulo de EROS e morte celular nos tecidos vegetais do tomateiro. Sendo assim, os resultados descritos aqui, para a proteína efetora rMOROR_12486 de *M. roreri*, irão contribuir para estudos mais detalhados em um futuro próximo.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS), expressão heteróloga, revisão sistemática

ABSTRACT

SANTOS, Taís Araújo M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Junho de 2022. **Systematization of protein effector studies in fungal phytopathogens and characterization of a candidate effector of *Moniliophthora roreri*.** Advisor: Carlos Priminho Pirovani. Co-advisors: Ariana Silva Santos e Virgínia Lúcia Fontes Soares.

Fungal pathogens are responsible for numerous diseases and have caused great losses to agricultural production. Frosty Pod Rot, caused by the fungus *Moniliophthora roreri*, is one of the main diseases that drastically affects cocoa production in the world. In order to establish compatible interactions with their hosts, pathogens secrete molecules known as effectors during their colonization in the plant. Characterizing the functionality of effector proteins will improve our understanding of their role in the pathosystem and influence future strategies to combat phytopathogenic fungal infections. Thus, the present work aimed to systematize the studies of fungal effector proteins characterized in different pathosystems, as well as to characterize a candidate protein for the effector of the fungus *M. roreri*. In chapter I, a systematic review was developed based on PRISMA guidelines, with the aim of systematizing information and providing the study of the art on the effector proteins characterized so far. The search was performed using the PubMed, Science Direct, and Web of Science databases. A total of 2,114 articles related to the research string were selected. After the selection and extraction phase, 103 studies were accepted, and used in the data summarization phase. Regarding the fungi studied, 68% belong to the phylum ascomycota, with 32% of the studied species belonging to the phylum basidiomycota. The review gathered a total of 28 pathogens, being *Magnaporthe oryzae* the species that presented a higher percentage (29%) of studied effector proteins. To date of the research, a total of 108 characterized proteins have been identified, being secreted by biotrophic (47%), hemibiotrophic (32%) and necrotrophic (21%) fungi. Regarding the compartment in which the proteins were targeted, 49% act in the apoplast and 51% in the cytoplasm. The apoplast effectors are associated with inhibitory functions, interfering with proteases and chitinases. On the other hand, cytoplasmic agents act on intracellular targets interfering with processes associated with plant defense. Chapter II consisted in functionally characterizing a candidate effector protein from *M. roreri*, homologous to BASIDIN, characterized in *M. perniciosa*. This protein has been shown to be a potential effector by interfering in the system by affecting the physiology of host cells. The results of the protein sequence analysis showed that MOROR _12486 has

characteristics common to other effector proteins described in the literature, such as the presence of a signal peptide, low molecular weight, absence of conserved domains and extracellular localization. *Escherichia coli* strain *Rosetta* (DE3) was transformed with the pET28a vector containing an ORF optimized for rMOROR_12486 expression. A protein of approximately 20 kDa was expressed upon addition of IPTG, which corresponds to the estimated molecular mass for the rMOROR_12486 protein with the vector-derived His-Tag. The identity of this protein was confirmed by mass spectrometry. Thus, the His6-tagged recombinant protein was purified by affinity chromatography from the insoluble fraction of the *E. coli* extract. Circular dichroism spectra showed that rMOROR_12486 does not lose conformation when treated at 95 °C, indicating that it is a thermostable protein. In addition, rMOROR_12486 triggers cell death and acts by eliciting defense responses by inducing the accumulation of H₂O₂ in *Solanum lycopersicum*, indicative of a hypersensitive defense response, suggesting its recognition by immune receptors in non-host plants. In conclusion, the review allowed us to systematize the effectors of phytopathogenic fungi already characterized in the literature and to understand their mechanisms of action in pathosystems. However, many effectors still do not have their function revealed, such as the effectors of basidiomycota fungi, thus highlighting the need for studies to elucidate these functions. Thus, chapter II provides scientific data on the effects of the effector protein of the basidiomycota *M. roreri*. The results demonstrated that rMOROR_12486, the BASIDINA homologue, similarly induced ROS accumulation and cell death in tomato plant tissues. Therefore, the results described here, for the effector protein MOROR_12486 from *M. roreri*, will contribute to more detailed studies in the near future.

Key words: *Theobroma cacao*, effector-triggered susceptibility (ETS), heterologous expression, systematic review

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas são suscetíveis a um grande número de patógenos, incluindo os fungos. Fitopatógenos fúngicos são responsáveis por inúmeras doenças e têm causado grandes danos à produção agrícola (RODRIGUEZ-MORENO *et al.*, 2018). Estima-se que até 30% da produção agronômica por ano é perdida devido a várias doenças causada por fungos (AVERY *et al.*, 2019). Diversas safras de alto valor, como banana, café, cacau e especiarias, são atualmente afetadas por infecções fúngicas (DRENTH; GUEST, 2016). Os patógenos *Magnaporthe oryzae* e *Puccinia spp.*, que infecta o arroz e trigo, respectivamente, são economicamente os fungos mais devastadores em todo o mundo (DEAN *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2019). Outro exemplo, são os fungos do gênero *Moniliophthora* spp. que trazem graves perdas econômicas em todas as regiões produtoras de cacau nas quais se espalharam (BAILEY *et al.*, 2018).

Os fitopatógenos fúngicos têm diversos mecanismos de infecção que suportam a colonização fúngica nas plantas. A colonização e infecção bem-sucedida desses patógenos dependem da sua capacidade de modificar as plantas hospedeiras vivas para sequestrar os nutrientes necessários para o seu crescimento e reprodução (SELIN *et al.*, 2016).

Desse modo, os fungos patogênicos são frequentemente categorizados com base em sua relação com as plantas hospedeiras (SHAO *et al.*, 2021). Essas categorias incluem os biotróficos, que sobrevivem em tecidos vivos, causando infecções sem matar as células ou tecidos do hospedeiro; os necrotróficos que infectam o hospedeiro vivo, com o objetivo de matar o tecido infectado; e os hemibiotróficos que utilizam mecanismos semelhantes aos biotróficos para causar infecções e depois matam seu hospedeiro como os necrotróficos (LO PRESTI *et al.*, 2015).

Em contraste, várias estratégias de defesa são utilizadas pela planta para impedir o desenvolvimento dos fungos (PRADHAN *et al.*, 2021), a exemplo da imunidade desencadeada por PAMP (PTI) que é acionada após o reconhecimento de moléculas fúngicas, tais como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) por receptores de reconhecimento de padrões localizados por membrana plasmática (PRRs) da planta, esta constitui a primeira linha de defesa da planta (BIGEARD *et al.*, 2015).

Patógenos bem-sucedidos podem superar tais barreiras de defesa, através de moléculas comumente conhecidas como efetores (GIRALDO; VALENT, 2013). Os efetores são

importantes determinantes de virulência, eles podem tanto facilitar a infecção a favor do patógeno, bem como desencadear respostas de defesa no hospedeiro quando reconhecidos pelas cultivares resistentes da planta (JASWAL *et al.*, 2020).

A segunda linha de defesa do hospedeiro envolve a detecção de efetores de avirulência pelo gene de resistência (R) do hospedeiro, desencadeando assim a imunidade acionada por efetor (ETI) (JONES; DANGL, 2006). A ativação da ETI resulta em resistência à doença e geralmente está associada a indução da resposta hipersensível (HR), levando à morte rápida das células no local de infecção do patógeno (BALINT-KURTI, 2019).

Os principais fatores na capacidade dos patógenos fúngicos em causarem doenças em seus hospedeiros são os efetores. Existem diversos mecanismos pelos quais os efetores funcionam para alterar a imunidade das plantas, e o estudo desses mecanismos de ação é uma parte fundamental no desenvolvimento de novas estratégias no controle de doenças em plantas (KANJA; HAMMOND-KOSACK, 2020).

Dessa forma, caracterizar a funcionalidade das proteínas efetoras melhorará nossa compreensão sobre o seu papel na infecção e influenciará em nossas estratégias futuras para combater infecções por fitopatógenos fúngicos (KANJA; HAMMOND-KOSACK, 2020). Assim, o presente trabalho teve como objetivo sistematizar os estudos de proteínas efetoras fúngicas caracterizadas até o momento, bem como caracterizar uma proteína candidata à efetora do fungo *Moniliophthora roreri*, causador da Monilíase do cacaueiro. Trata-se de uma proteína cuja sua homóloga em *M. perniciosa*, apresentou-se como um potencial efetor envolvido no desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa no cacaueiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Monilíase do cacaueiro

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie arbórea, perene, pertencente à família *Malvaceae* e originária da região da bacia Amazônica (BAUM *et al.*, 2004). É uma das culturas tropicais mais importantes do ponto de vista econômico, devido as amêndoas que são produzidas pelos seus frutos constituírem a principal matéria prima para a produção do chocolate (DELGADO-OSPINHA *et al.*, 2021). O Brasil é o sétimo produtor mundial de cacau, com 265 mil toneladas. A região Norte lidera a produção nacional (53,2%), sendo a Bahia o

único estado produtor do Nordeste, ocupando uma área de 403 mil ha, com 111,4 mil toneladas (42%) (IBGE, 2020).

Os fitopatógenos causam frequentemente várias doenças nas plantações de cacau, alterando as funções fisiológicas das plantas e, em casos extremos, causam a sua morte (CILAS; BASTIDE, 2020). Uma das limitações mais importantes da produção de cacau em todo o mundo são as doenças causadas principalmente pelos fungos fitopatogênicos do gênero *Moniliophthora*, que envolve os basidiomicotas *Moniliophthora roreri* Cif. & Par. e *Moniliophthora perniciosa* Stahel (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). Esses microrganismos são os causadores da Monilíase do cacaueiro (*Frosty Pod Rot*) e da vassoura de bruxa (witches' broom disease), respectivamente, doenças altamente invasivas que causam baixos rendimentos e perdas totais de produção (BAILEY *et al.*, 2018).

Apesar do cultivo de cacau ser acometido por várias doenças, a Monilíase do cacaueiro em termos de impacto econômico é considerada pelos produtores a doença mais limitante, sendo mais destrutiva e de difícil controle (SÁNCHEZ MORA; GARCÉS FIALLOS, 2012). O fungo causador sobrevive em diferentes condições ambientais, além disso, seus esporos são produzidos em abundância nos frutos doentes e são mais resistentes à dissecação e à luz do que os esporos de *M. perniciosa* (PHILLIPS-MORA; WILKINSON, 2007).

Moniliophthora roreri, é um basidiomycota pertencente à classe Agaricomycetes, ordem Agaricales e família Marasmiaceae, que tem como hospedeiro as espécies dos gêneros *Theobroma* ssp. e *Herrania* ssp. (BAILEY; MEINHARDT, 2016). O fungo possui dois estágios distintos: biotrófico e necrotrófico. Durante a fase biotrófica os frutos desenvolvem malformações e, em seguida, progridem para a fase necrotrófica onde ocorrem apodrecimento e esporulação, resultando na morte do tecido em poucos dias (BAILEY *et al.*, 2014; EVANS, 2007).

O ciclo de vida de *M. roreri* inicia-se a partir dos esporos que são principalmente dispersos através do vento e da chuva (Figura 1). Esses esporos são depositados na superfície do fruto e na presença de água germinam e penetram o tecido através da cutícula ou estômatos, colonizando os tecidos intercelularmente (DEAN *et al.*, 2012; SÁNCHEZ-MORA; GARCÉS-FIALLOS, 2012). Posteriormente, lesões marrons aparecem cobrindo toda a superfície do fruto, seguido de um pseudoestroma branco com esporulação abundante, que em condições adequadas de umidade e temperatura estarão aptos a infectar outras plantas (CAMPUZANO,

1976). Os esporos são as únicas estruturas encontradas em condições de campo que são capazes de infectar o cacau, sendo mais suscetível nos estágios iniciais do desenvolvimento, ou seja, à medida que ocorre o crescimento do fruto, este se torna menos suscetível ao patógeno (BAILEY *et al.*, 2018).

Muitos consideram o *M. roreri* como o fungo com o maior potencial de destruição caso atinja novas áreas de plantações de cacau, pois onde ocorre, torna-se continuamente o principal fator limitante da produção (PLOETZ, 2016). Essa agressividade pode ser observada nos países onde a doença chegou recentemente, a Bolívia e a Jamaica, respectivamente, onde o fungo continua na fase invasiva (PHILLIPS-MORA *et al.*, 2015; JOHNSON *et al.*, 2017). Atualmente a praga foi reportada no Brasil, onde era classificada como quarentenária ausente (SBA, 2021). O que torna grande a possibilidade de disseminação da doença pelo País.

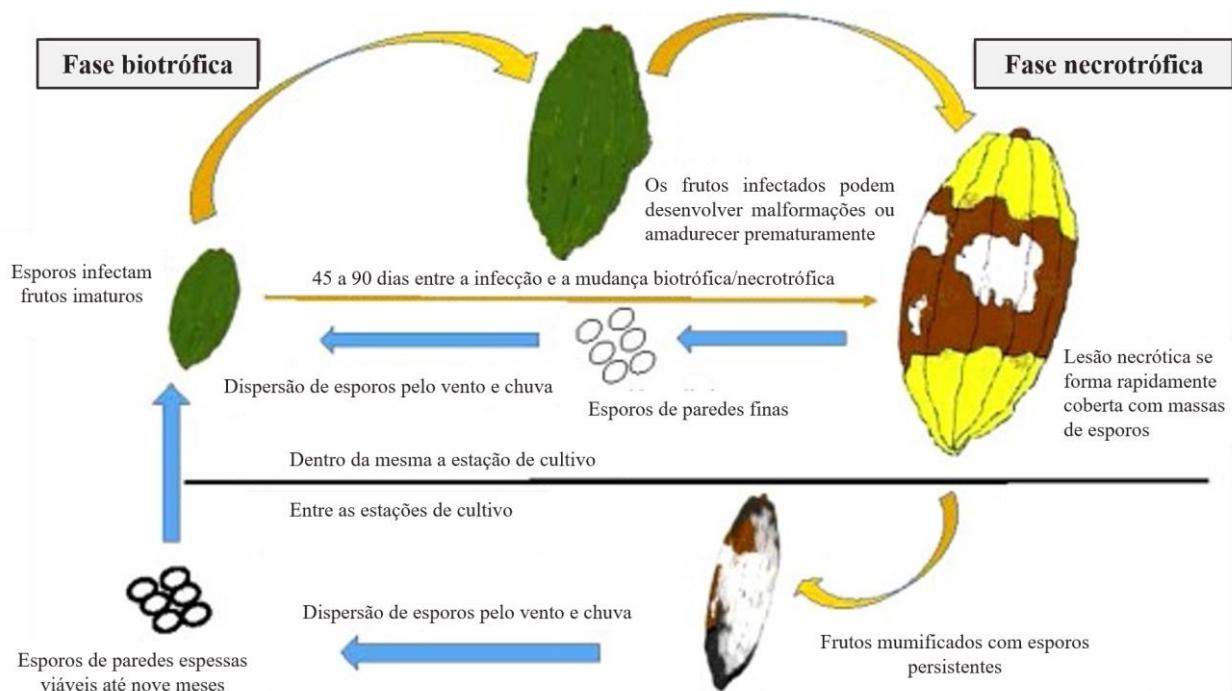


Figura 1. Ciclo de infecção de *Moniliophthora roreri* em *Theobroma cacao*. Os esporos produzidos em frutos necróticos infectam novos frutos, iniciando uma fase biotrófica prolongada (45-90 dias). Uma vez iniciada a fase necrotrófica, novos esporos são rapidamente produzidos nos frutos e se espalham pelo vento e pela chuva. Esporos remanescentes em frutos mumificados podem iniciar novas epidemias em associação com novas estações de cultivo (Modificado de BAILEY *et al.*, 2018).

Consideráveis avanços no entendimento da interação *M. roreri* x *T. cacau* vem sendo obtidos com o estudo do seu genoma (MEINHARDT *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2018; OSORIO-GUARÍN *et al.*, 2020). De modo que análises funcionais de genes e vias bioquímicas têm sido estudadas para esclarecimento dos mecanismos moleculares do fungo durante a colonização no cacau (BAILEY *et al.*, 2018).

Ainda não está claro qual é o mecanismo usado por *M. roreri* para penetrar nos frutos do cacau. No entanto, a fim de propor um mecanismo de infecção um estudo indicou que *M. roreri* expressa proteases, lipases, glucanases e cutinases durante os estágios iniciais do processo (TORRES-PAL; RAMIREZ-LE, 2016).

Em um estudo foi demonstrado também que a indução da quitina sintase é consistente com o rápido crescimento do fungo *M. roreri* iniciado durante a fase necrotrófica e a quitina desacetilase pode atuar modificando a sua própria parede celular, e com isso reduzindo a eficácia das enzimas vegetais (MEINHARDT *et al.*, 2014). Em outro estudo foi mostrado que os patógeno do cacau *M. perniciosa* secreta quitinases ativas ou inativas para sequestrar oligômeros de quitina e dificultar a percepção pelos receptores de quitina da planta (FIORIN *et al.*, 2018).

Sabe-se que a interação *T. cacao* x *M. roreri* é benéfica apenas ao fungo. A planta, apesar de ativar seu sistema de defesa, não se mostra eficaz no combate à doença e isso pode estar relacionado à secreção de proteínas efetoras que podem ser capazes de neutralizar o sistema de defesa da planta. Desse modo, o conhecimento da fisiologia e bioquímica do parasitismo na interação planta-patógeno pode contribuir para a compreensão e desenvolvimento de estratégias de manejo e controle de doenças.

2.2. Intereração planta-patógeno

As plantas estão frequentemente expostas a uma ampla gama de patógenos que causam danos aos seus tecidos e afetam o seu desenvolvimento. Desse modo, ao longo da evolução as plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra esses organismos patogênicos (CHAUDHARI *et al.*, 2014). Primeiramente os tecidos vegetais são protegidos por barreiras físicas pré-formadas por meio da cutícula e da parede celular (MENDGEN *et al.*, 1996). A cutícula constitui uma barreira contra fitopatógenos e pragas, embora a maioria dos patógenos fúngicos possam penetrar na cutícula por ruptura mecânica e secreção de cutinases (YEATS;

ROSE, 2013). A parede celular vegetal fornece suporte estrutural e proteção contra estresses bióticos e abióticos (HAMANN, 2012).

Os patógenos bem-sucedidos que podem romper as barreiras pré-formadas têm então que enfrentar o sistema imunológico da planta, que é constituído de mecanismos sofisticados de reconhecimento e defesa (BIGEARD *et al.*, 2015).

Os patógenos são percebidos pela planta através de dois sistemas de reconhecimento diferentes que é a imunidade acionada por padrão (PTI) e imunidade acionada por efetor (ETI), ambas acompanhadas por um conjunto de defesas induzidas que geralmente repelem ataques de patógenos (TSUDA *et al.*, 2009).

As plantas detectam os patógenos através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) a partir de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) que estão presentes na superfície celular das plantas (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015). Os PAMPs são moléculas derivadas do patógeno e que são essenciais para a sua sobrevivência, como flagelina, ergosterol e oligossacarídeos de fungos, como as glucanas ou fragmentos de quitina da parede celular (FELIX *et al.*, 1999; KUNZE *et al.*, 2004; SANABRIA; BOLLER; FELIX, 2009; HUANG; DUBERY, 2010). Os PRRs geralmente são receptores do tipo quinase ligada à membrana plasmática (RLKs) ou proteínas do tipo receptor com domínios extracelulares que não exibem nenhum domínio de sinalização intracelular conhecido, os PRRs permitem a percepção de PAMPs, acionando a PTI (BÖHM *et al.*, 2014).

A ativação de PTI resulta em uma série de respostas de resistência no início da infecção, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), mudanças no fluxo de íons citosólicos, ativação da cascata de sinalização via MAP-quinases, reforço de barreiras físicas, fechamento do estômato, expressão de genes responsivos à defesa e proteínas relacionadas à patogênese (PR) (MACHO; ZIPFEL, 2014; STAEL *et al.*, 2015).

Em resposta ao PTI, os fitopatógenos implantam um arsenal de moléculas conhecidas como efetores, as quais contribuem para a infecção do patógeno, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (GIRALDO; VALENT, 2013). Essas moléculas aumentam a capacidade do patógeno de se propagar em seu hospedeiro, interferindo em vários processos celulares, incluindo a PTI (CHAUDHARI *et al.*, 2014). O efetor Mg3LysM empregado pelo fungo *Mycosphaerella graminicola*, patógeno do trigo, protege as hifas fúngicas contra a

hidrólise de quitinases vindas da planta e com isso bloqueia a ativação de respostas de defesa do hospedeiro induzidas por quitina, inibindo a ativação das respostas precoces de PTI (MARSHALL *et al.*, 2011). *Pseudocercospora fuliginea* emprega o efetor Pf-Avr4, que se liga à quitina presente nas paredes das células fúngicas, impedindo seu reconhecimento pelos receptores vegetais de quitina (KOHLER *et al.*, 2016).

Neste cenário, um sistema de defesa mais específico e indispensável chamado ETI entra em ação. Esse sistema é baseado na percepção de efetores por genes de resistência, denominadas proteínas R (JONES; DANGL, 2006). Esses receptores intracelulares das plantas pertencem a uma família de proteínas de repetição rica em leucina de ligação a nucleotídeos (NB-LRR), também conhecida como NLRs (YUAN *et al.*, 2021). Os NLRs reconhecem os efetores do patógeno e ativam ETI. Quando os efetores são suprimidos pela ação das proteínas R, o patógeno secreta novos efetores para manipular os processos de defesa das plantas, e as plantas por sua vez desenvolvem novas proteínas R, levando ao processo de coevolução do patossistema (FLOR, 1956; KARASOV *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2015).

Esse reconhecimento pode ser através da interação direta e altamente específica, de acordo com a teoria gene a gene, onde para cada gene de avirulência (Avr) do patógeno existe um gene de resistência dominante (R) equivalente no hospedeiro que confere resistência (FLOR, 1956; DODDS *et al.*, 2006; BOLLER; FELIX, 2009). Um exemplo disso é a interação entre o fungo *Fusarium oxysporum* e o seu hospedeiro, onde o patógeno emprega o efetor Avr1 que desencadeia resistência a doenças quando a planta hospedeira, o tomate, carrega um gene R correspondente (I-1) (HOUTERMAN *et al.*, 2008). Se não houver detecção, como resultado de variação alélica ou falta de um dos dois componentes, então uma reação suscetível ou compatível é observada (SELIN *et al.*, 2016). O patógeno do arroz, *Magnaporthe oryzae* secreta o efetor AVR-Pita que confere avirulência para cultivares de arroz que contêm Pi-ta, o gene de resistência correspondente, porém diversas mutações em AVR-Pita incluindo mutações pontuais, inserções e deleções, permitem que o fungo evite o desencadeamento de respostas de resistência mediadas por Pi-ta (ORBACH *et al.*, 2000).

Entretanto, pode haver exceções em que os efetores do patógeno e as proteínas R do hospedeiro interagem indiretamente através do envolvimento de uma proteína alternativa chamada de “guardee” (hipótese guarda), essa interação é detectada pela proteína R desencadeando resistência à doença (DANGL; JONES, 2001; VAN DER HOORN; KAMOUN, 2008). Por exemplo, Avr2 é um efetor genuíno de *Cladosporium fulvum*, que

demostrou inibir a protease Cys Rcr3 necessária para resistência do tomate, porém, em variedades resistentes de tomate, essa protease é protegida pela proteína Cf-2 de resistência, ancorada à membrana extracelular, dessa forma, a ligação de Avr2 resulta em uma mudança conformacional de Rcr3 que é monitorada pela proteína Cf-2, resultando em HR e resistência contra isolados de *C. fulvum* (VAN ESSE *et al.*, 2008).

Estudos recentes sugerem que o PTI é um componente necessário da ETI, ou seja, em vez de um sistema de imunidade de duas camadas, o ETI e o PTI ativam vias diferentes, porém interativas, que levam à imunidade das plantas (KANJA; HAMMOND-KOSACK, 2020). Foi analisada as interações entre esses dois sistemas imunológicos em *Arabidopsis*, onde o reconhecimento de patógenos por PRRs ativa várias proteínas quinases e NADPH oxidases, e os receptores intracelulares potencializam principalmente a ativação dessas proteínas, aumentando sua abundância por meio de vários mecanismos, da mesma forma, a resposta hipersensível que depende de receptores intracelulares é fortemente potencializada pela ativação de receptores de superfície (NGOU *et al.*, 2021). Outro estudo relatou que a PTI é um componente indispensável da ETI durante a infecção bacteriana, onde plantas mutantes de *Arabidopsis* sem PRRs foram prejudicados nas respostas da ETI (YUAN *et al.*, 2021). Para estudar as respostas de RRS1/RPS4 em *Arabidopsis*, sem a influência das vias imunológicas dos PRRs, um estudo gerou uma linhagem de *Arabidopsis* com expressão induzível do efetor AvrRps4, e a indução não levou a uma resposta de morte celular hipersensível (HR) sem a presença de PAMPs (NGOU *et al.*, 2020). Diante disto, pode-se destacar que as vias imunológicas ativadas por receptores de superfície celular e intracelulares em plantas potencializam-se de forma mútua para ativar fortes defesas contra patógenos.

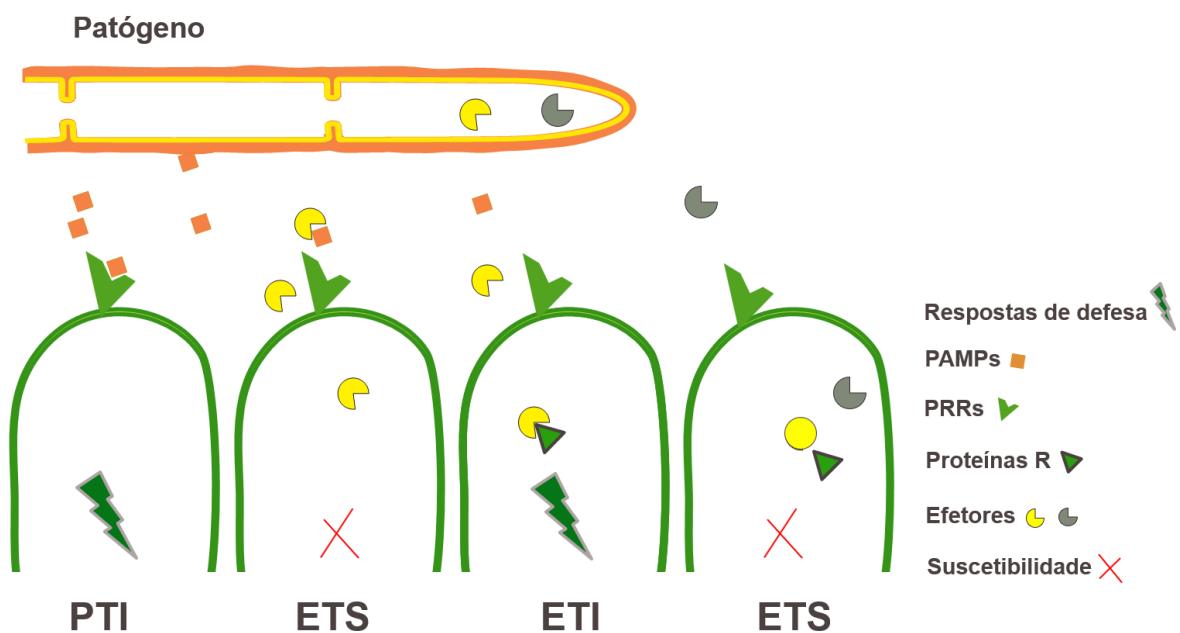


Figura 2. Representação esquemática da interação planta-patógeno. Os patógenos são percebidos pela planta através de dois sistemas de reconhecimento a PTI e ETI. Nesse caso, os PAMPs podem ser componentes da parede celular fúngica, por exemplo, a quitina. Esses PAMPs são reconhecimentos pelos PPRs que estão presentes na superfície celular das plantas. Então os PPRs reconhecem os PAMPs e ativam a PTI, através de uma série de respostas de defesa. Em resposta ao PTI, os fitopatógenos implantam moléculas conhecidas como efetores, as quais podem impedir o reconhecimento dos PAMPs, resultando na ETS. Por sua vez, as plantas apresentam proteínas de resistência (R) que reconhecem esses efetores permitindo a ativação de respostas de defesa e resultando na ETI. Os patógenos podem suprimir a ETI, tanto pela diversificação do efetor reconhecido ou pela aquisição de novos efetores.

2.3. Proteínas efetoras de fungos fitopatogênicos

Os efetores podem ser definidos como moléculas que alteram a estrutura e função da célula hospedeira, facilitando a infecção (fatores de virulência ou toxinas) ou desencadeando respostas de defesa (fatores de avirulência) (SELIN *et al.*, 2016). Ou seja, um efetor particular pode ser um fator de virulência em um hospedeiro e um fator de avirulência em outro, uma situação observada mesmo dentro de uma única espécie de planta. Quando uma molécula de um determinado patógeno modula a defesa do hospedeiro para aumentar a sua aptidão, isso é chamado de fator de virulência, no entanto, quando a mesma molécula é reconhecida pelos imunorreceptores do hospedeiro, falhando assim em aumentar a virulência e, em vez disso,

desencadeando uma resposta de defesa, ela é referida como um fator de avirulência (CHAUDHARI *et al.*, 2014).

As proteínas efetoras podem ser agrupadas com base em seu local de atuação. Elas são geralmente classificados como apoplásticas, essas são secretadas nos espaços intercelulares do tecido hospedeiro ou citoplasmáticas que são translocadas para o interior da célula (STOTZ *et al.*, 2014; ROCAFORT *et al.*, 2020). Efetores citoplasmáticos incorporam a ideia de que os efetores translocados podem não estar restritos a uma única célula, e inclui todos os locais de ação possíveis dentro das células vegetais, como núcleo e organelas (UHSE; DJAMEI, 2018).

Os efetores apoplásticos podem atuar de diversas formas. Um dos mais bem caracterizados efetores de *C. fulvum*, o Avr4, é uma proteína apoplástica que se liga às quitinas fúngicas impedindo sua hidrólise, por quitinases produzidas pelo hospedeiro (DE WIT, 2016). Em outro estudo foi demonstrado que o efetor, pit2 de *Ustilago maydis* inibe as proteases de cisteína no milho presentes no apoplasto (DOEHLEMANN *et al.*, 2011).

Os efetores citoplasmáticos atuam sobre alvos intracelulares interferindo em processos associados com a defesa do hospedeiro (WANG *et al.*, 2017). O Cmu1 é um efetor citoplasmático de *U. maydis* que beneficia o patógeno ao redirecionar o fluxo metabólico do corismato mutase da biossíntese do ácido salicílico, suprimindo o acúmulo desse hormônio relacionado à defesa durante a infecção (DJAMEI *et al.*, 2011). RTP1p de *Uromyces fabae*, foi o primeiro efetor fúngico a ser visualizado no citoplasma do hospedeiro, demonstrando estar envolvido na formação de estruturas fibrilares semelhantes a amiloide (KEMEN *et al.*, 2013).

Alguns patógenos fúngicos desenvolveram estruturas invasivas conhecidas como apressórios, haustórios e complexos de interface biotrófica (BIC) que interagem diretamente com as células hospedeiras para entregar efetores (CHAUDHARI *et al.*, 2014; KHANG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2017). A interrupção do efetor MoAa91 de *M. oryzae*, resultou em defeitos na formação do apressório, indicando que MoAa91 atua como um indutor para regular a diferenciação do apressório (YING *et al.*, 2021). Para acomodar os haustórios, as células hospedeiras são forçadas a expandir sua membrana plasmática (GARNICA *et al.*, 2014). AvrP4 e AvrM de *Melampsora lini* são genes que codificam proteínas secretadas expressas haustorialmente que induzem morte celular (CATANZARITI *et al.*, 2006). *M. oryzae* forma uma hifa primária filamentosa que se desenvolve em uma hifa invasiva especializada, e posteriormente, uma estrutura lobulada se forma na ponta da hifa, chamada BIC (KHANG *et*

al., 2010). Dessa forma, antes de serem translocadas para o citosol da planta, as proteínas efetoras de *M. oryzae* se acumulam no BIC (FERNANDEZ; ORTH, 2018). AvrPiz-t é um efetor citoplasmático secretado via BIC que tem como alvo o sistema proteassoma ubiquitina do hospedeiro para a supressão da imunidade desencadeada por PAMP em arroz (PARK *et al.*, 2012).

Atualmente, é possível encontrar alguns padrões estruturais e funcionais em comum dentre os efetores, permitindo determiná-los. De acordo com alguns autores, para uma molécula ser considerada uma candidata a efetora, ela precisa seguir alguns parâmetros, como presença de peptídeo de sinal, ausência de domínio transmembrana, ter um tamanho relativamente pequeno (<300 aminoácidos), possuir um alto teor de cisteína na proteína madura, não conter domínio Pfam e apresentar alta expressão no ciclo de infecção, são alguns critérios utilizados (SAUNDERS *et al.*, 2012; SONAH *et al.*, 2016; ELMORE *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2020). O desenvolvimento recentes de ferramentas de previsão de moléculas efetoras, tais como EffectorP e ApoplastP, por exemplo, refinou e melhorou a previsão de possíveis efetores (SPERSCHNEIDER *et al.*, 2018a; SPERSCHNEIDER *et al.*, 2018b). Em vários estudos essas características têm sido exploradas para identificação e previsão *in silico* de possíveis candidatos a efetores no genoma de patógenos conhecidos (CANTU *et al.*, 2013; MEINHARDT *et al.*, 2014; PORTO *et al.*, 2019).

Ferramentas de bioinformática têm sido desenvolvidas para analisar características baseadas em sequência dos candidatos a efetores, a fim de restringir o processo de seleção para validação funcional. Dessa forma, essas proteínas precisam ter sua função determinada experimentalmente para que seja possível elucidar a sua contribuição para a virulência do patógeno e aspectos relacionados à interação planta-patógeno.

2.4. Caracterização de proteínas efetoras e seu potencial biotecnológico

As plantas e os patógenos desenvolveram uma íntima relação evolutiva. Para promover a doença os patógenos secretam os efetores como fatores de virulência para suprimir a defesa do hospedeiro e modular sua resposta celular (PRADHAN *et al.*, 2021).

Com as contínuas melhorias das tecnologias ‘ômicas’, o número de candidatos a efetores identificados aumentou rapidamente. Porém, ainda não se sabe a funcionalidade da maioria desses efetores putativos. Desse modo, a caracterização funcional de efetores contribuem para

o entendimento dos mecanismos de ação do patógeno, bem como a sua interação com o sistema do hospedeiro (DALIO *et al.*, 2017).

Os estudo das proteínas candidatas a efetoras revelaram vários mecanismos de ação, tais como a supressão e indução da morte celular (CHEN *et al.*, 2013; GAWEHNS *et al.*, 2014), aumento na virulência dos patógenos (DOEHLEMANN *et al.*, 2011), supressão de genes relacionados à defesa (CHAROVA *et al.*, 2020), entre outros. Essas funções efetoras conhecidas são o resultado de uma combinação de abordagens experimentais baseadas em sistemas de expressão heteróloga (PETRE *et al.*, 2015), duplo-híbrido em leveduras (QI *et al.*, 2019), sistema CRISPR-Cas9 (IDNURM *et al.*, 2017), silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS) (PLIEGO *et al.*, 2013), entre outros.

Quando um efetor candidato é expresso de forma heteróloga, vários ensaios funcionais podem ser utilizados para determinar a funcionalidade da proteína (KANJA; HAMMOND-KOSACK, 2020). Produzida em *Escherichia coli* para ensaios funcionais, a função biológica da proteína Pep1 foi testada em *Hordeum vulgare* (HEMETSBERGER *et al.*, 2015). Os resultados descritos neste estudo classificaram Pep1 como um efetor que suprime a imunidade da planta, por meio da inibição da atividade da peroxidase do hospedeiro. Um outro estudo utilizou o efetor Avr2 de *C. fulvum*, para expressá-lo de forma heteróloga em *Arabidopsis thaliana*, onde demonstrou uma suscetibilidade aumentada para patógenos fúngicos extracelulares (VAN ESSE *et al.*, 2008).

Estudos que comprometam a função do efetor também estão sendo utilizados para verificar a contribuição do efetor para a virulência do patógeno (PLIEGO *et al.*, 2013). Por exemplo, a deleção do gene de avirulência de *Phytophthora sojae*, Avr4/6, contribuiu para o reconhecimento do patógeno pelos genes de resistência da soja (Rps4 e Rps6) (FANG; TYLER, 2016).

Alguns patógenos fúngicos possuem um grande arsenal de efetores caracterizados, em outros casos, patógenos que também possuem importância econômica para culturas, como por exemplo, *M. perniciosa* e *M. roreri*, necessitam imediatamente de caracterização funcional, embora candidatos a efetores tenham sido preditos (BARBOSA *et al.*, 2018).

Barbosa e colaboradores (2018) analisaram *in silico* o efetoroma de subpopulações de *M. perniciosa* e *M. roreri*, e identificaram um grupo de proteínas candidatas a efetoras. Um desses candidatos, a proteína efetora referida como BASIDINA de *M. perniciosa* induz murcha,

necrose e estresse oxidativo (FARIAS, 2020). Foi constatado também que a proteína causa danos nas membranas foliares, evidenciado pelo aumento significativo nos níveis de extravasamento de eletrólitos. Além disso, os resultados obtidos durante a medição das trocas gasosas sugeriram que a BASIDINA interfere negativamente na fotossíntese, provocando uma redução da taxa fotossintética da planta modelo Tomate Micro-Tom (*Solanum lycopersicum*).

A implementação da biotecnologia efetora fornece várias estratégias contra doenças que são importantes para atender às exigências atuais e futuras da produção agrícola. Em alguns casos, a produção e purificação convencional de proteínas recombinantes é um recurso suficiente para permitir a detecção de reações individuais entre cada efetor e o gene de resistência ou suscetibilidade (VAN DE WOUW; IDNURM, 2019).

Pesquisadores do Centro de Manejo de Culturas e Doenças da Universidade Curtin (CCDM) entregaram o efetor ToxA purificado aos produtores de trigo como uma ferramenta de seleção para o desenvolvimento de germoplasma resistente a doença da mancha amarela, causada por *P. tritici-repentis* (MOFFAT, 2014; MOFFAT *et al.*, 2014). Este ensaio permite aos produtores eliminar gradualmente as cultivares de trigo contendo o gene Tsn1 através do rastreamento ou mapeamento de populações para a ausência de interação com o ToxA. Se os produtores evitarem o plantio de variedades sensíveis a ToxA, eles podem ajudar a minimizar o risco de mutação do ToxA para uma forma mais potente no futuro (MOFFAT, 2017). Isso reitera a importância de selecionarem variedades sem essa interação, sendo este um grande passo para reduzir a enorme escala de perdas de safra causadas pela doença.

Outro estudo também avaliou a expressão dos efetores proteicos ToxA e ToxB, produzidos pelo patógeno fúngico *P. tritici-repentis*, que conferem suscetibilidade ao trigo. Esses efetores necrotróficos foram expressos em dois sistemas heterólogos: *E.coli* e *Pichia pastoris*. O sistema em *E. coli* demonstrou ser superior ao *P. pastoris* na geração de altos níveis de proteínas recombinantes que eram solúveis e estáveis. ToxA e ToxB recombinantes foram testados em culturas de cereais, bem como espécies comuns de modelos de plantas. Um grau variado de suscetibilidade efetora foi observado. A expressão heteróloga dessas proteínas, irá facilitar a seleção assistida por efetores em programas de melhoramento de trigo, bem como a investigação de efetores de *P. tritici-repentis* em interações hospedeiro e não-hospedeiro (SEE *et al.*, 2019).

Os efetores são valiosas ferramentas moleculares desenvolvidas e usadas por fitopatógenos. O estudo dessas moléculas é de extrema importância para enfrentar as doenças que causam impacto nas plantas. Portanto, a identificação e a caracterização dos efetores têm se revelado com grande aplicabilidade biotecnológica, possibilitando o desenvolvimento de estratégias promissoras nas práticas agrícolas (VAN DE WOUW; IDNURM, 2019).

2.5. Sistematização de estudos científicos

A revisão sistemática visa fornecer uma síntese abrangente e imparcial de estudos relevantes em um único documento, sendo considerada a ferramenta mais confiável para resumir as evidências existentes (AROMATARIS; PEARSON, 2014). Tal abordagem é amplamente empregada na área médica, com o objetivo de identificar o maior número possível de estudos sobre um tema de interesse (MUKA *et al.*, 2020).

Para minimizar o viés, utilizam-se métodos sistemáticos, com uma estratégia de busca predefinida, para identificar e avaliar toda a literatura publicada disponível sobre um assunto específico, fornecendo, assim, resultados mais confiáveis a partir dos quais conclusões podem ser tiradas e decisões tomadas (CALDWELL; BENNETT, 2020).

Os principais métodos que distinguem as revisões tradicionais da literatura e as revisões sistemáticas, é que a última tenta descobrir todas as evidências relevantes para uma pergunta e se concentra em pesquisas que relatam dados em vez de conceitos ou teorias (AROMATARIS; PEARSON, 2014). Além disso, é caracterizada por ter várias etapas no seu processo, incluindo seleção de estudo, avaliação crítica e extração de dados (ALEXANDER, 2020).

Atualmente, as revisões sistemáticas abrangem vários propósitos em diversos campos de investigação e diferentes tipos de questões (MUKA *et al.*, 2020; MUNN *et al.*, 2018). A necessidade de evidências robustas para subsidiar estratégias que lidem com estresses bióticos e abióticos em plantas, tem impulsionado a sua aplicação nas áreas de ciências agrárias e biológicas (WESTGATE; LINDENMAYER, 2017; SANTOS *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021).

Sendo assim, estudos de sistematização sobre as interações planta-patógeno estão se expandindo. Afim de obter respostas sobre o melhoramento genético para resistência à Sigatoka Negra, causado pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis*, foi feita uma revisão sistemática, onde os autores constataram que cultivares resistentes e suscetíveis respondem claramente de forma

diferente à infecção por esse patógeno, e declararam que as informações coletadas na revisão aumentaram a compreensão da resposta imune de *Musa spp* ao patógeno, além de ser relevante para programas de melhoramento genético de banana e plátanos para o controle da doença (SOARES *et al.*, 2021).

Outro estudo abordou as respostas de defesa em citros contra *Phytophthora*, bem como as estratégias de manejo da doença (DA SILVA *et al.*, 2021). De acordo com os artigos encontrados na revisão, os principais mecanismos de defesa da planta são as respostas de hipersensibilidade, reforço da parede celular, produção de proteínas relacionadas à patogênese e expressão de genes relacionados à defesa. Além disso, listaram algumas técnicas modernas de biotecnologia vegetal que podem ajudar a acelerar a seleção de porta-enxertos resistentes à *Phytophthora spp.*

De modo geral, aumentou-se dramaticamente o número de revisões sistemáticas publicadas nos últimos anos. É perceptível que essa abordagem metodológica está ganhando espaço nas áreas biológicas e agrárias, para respostas de perguntas com base em evidências científicas. Porém, muitos esforços ainda devem ser feitos em relação a sistematização de estudos relacionados a patossistemas importantes. A utilização dessa ferramenta é de extrema relevância para reunir informações e fornecer uma visão geral sobre um determinado assunto, bem como apresentar lacunas existentes dentro do tema de interesse.

CAPÍTULO I

Proteínas efetoras fúngicas em patossistemas biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos

Taís Araújo Santos, Ariana Silva Santos, Carlos Priminho Pirovani

RESUMO

Fitopatógenos fúngicos são responsáveis por inúmeras doenças e têm causado grandes perdas à produção agrícola. Para estabelecer uma infecção bem sucedida os fungos secretam efetores que auxiliam na colonização e obtenção de nutrientes dos tecidos vegetais. Estudos de caracterização de proteínas efetoras vêm sendo frequentemente realizados, com intuito de compreender o modo de ação dessas moléculas na virulência do patógeno. Diante disto, uma revisão sistemática foi desenvolvida com base nas diretrizes PRISMA, com o objetivo de sistematizar informações e fornecer o estudo da arte sobre as proteínas efetoras caracterizadas até o momento. A pesquisa foi realizada usando as bases de dados PubMed, Science Direct e Web of Science. Um total de 2.114 artigos relacionados à string de pesquisa foram selecionados. Após a fase de seleção e extração, 103 estudos foram aceitos, e utilizados na fase de sumarização dos dados. Em relação aos fungos estudados, 68% pertencem ao filo ascomycota, sendo 32% das espécies estudadas pertencente ao filo basidiomycota. A revisão reuniu um total de 28 patógenos, sendo o *Magnaporthe oryzae* a espécie que apresentou um maior percentual (29%) de proteínas efetoras estudadas. Até o momento da pesquisa, foram identificados um total de 108 proteínas caracterizadas, sendo secretadas por fungos biotróficos (47%), hemibiotróficos (32%) e necrotróficos (21%). Em relação ao compartimento em que as proteínas tiveram como alvo, 49% atuam no apoplasto e 51% no citoplasma. Os efetores apoplásticos estão associados com funções inibitórias, interferindo em proteases e quitinases. Por outro lado, os citoplasmáticos atuam sobre alvos intracelulares interferindo em processos associados com a defesa da planta. As funções efetoras conhecidas são resultado de uma combinação de abordagens experimentais. Sendo que alguns patógenos como os representantes do filo basidiomycota, carecem de caracterização funcional. As informações reunidas nesta revisão auxiliam na compreensão do modo de ação das proteínas efetoras em vários patossistemas, sendo relevante para posteriores estudos de controle de doenças fúngicas em plantas e de aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Efetor, virulência, fitopatógeno, revisão sistemática

1. INTRODUÇÃO

Os fungos causam frequentemente várias doenças em plantas, alterando suas funções fisiológicas e, em casos extremos levando à morte. Diversas culturas de alto valor são atualmente afetadas por patógenos fúngicos, que representam uma grave ameaça à segurança alimentar, resultando em grandes perdas econômicas em todo o mundo (FONES *et al.*, 2020).

Com base no modo de aquisição de nutrientes, os fungos fitopatogênicos são amplamente classificados como biotróficos (obtêm nutrientes de células vivas), necrotróficos (obtêm nutrientes de células mortas) e hemibiotróficos (primeiramente obtêm nutrientes de células vivas, e em seguida de células mortas) (LO PRESTI *et al.*, 2015). Para estabelecer uma infecção bem sucedida esses patógenos secretam efetores que auxiliam na colonização e obtenção de nutrientes dos tecidos vegetais. O papel dessas moléculas tem sido demonstrado em diversos patossistemas, incluindo aqueles responsáveis por severas doenças fúngicas, como as ferrugens, carvão-do-milho, oídio, brusone do arroz, entre outros (HE, Qiguang *et al.*, 2021; LI, X. *et al.*, 2022; LI, Y. *et al.*, 2020; MONTENEGRO ALONSO *et al.*, 2020; YIN *et al.*, 2019; ZHANG, Y. *et al.*, 2019).

As plantas resistentes reconhecem estes efetores e induz respostas de defesa contra os patógenos. Primeiramente, os receptores de reconhecimento de padrões vegetais (PRRs) reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como resíduos de quitina e glucanas oriundas da parede celular fúngica (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015; TANAKA; KAHMANN, 2021). Os PRRs reconhecem os PAMPs e induzem a imunidade desencadeada por PAMP (PTI) através da secreção de compostos antifúngicos, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), fitoalexinas, quitinases, glucanases, entre outros (SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2016). Dessa forma, para combater o PTI, os patógenos liberam efetores que podem atuar interagindo com os alvos do hospedeiro para bloquear as respostas de defesa e promover a infecção (HE, Qin *et al.*, 2020). Apesar disso, as plantas podem detectar a presença de certos efetores, por meio de interação direta através de receptores de repetição ricos em leucina de ligação a nucleotídeos (NB-LRRs ou NLRs) ou indireta monitorando alterações nas proteínas alvo do hospedeiro, resultando em imunidade desencadeada por efetores (ETI) (CUI; TSUDA; PARKER, 2015; FLOR, 1956, 1971; JONES; DANGL, 2006; VAN DER HOORN; KAMOUN, 2008). A ETI é caracterizada pela indução da resposta hipersensível (HR), levando à morte rápida das células no local do ataque, o que restringe a propagação do patógeno (BALINT-KURTI, 2019). Entretanto, os patógenos

também podem suprimir a ETI, tanto pela diversificação do gene efetor reconhecido ou pela aquisição de novos efetores (JONES; DANGL, 2006).

Os efetores podem interferir na defesa do hospedeiro através de uma variedade de mecanismos (DOU; ZHOU, 2012). Devido a isto, estudos de caracterização dessas moléculas vêm sendo frequentemente realizados (EBERT *et al.*, 2021; HOANG; BHASKAR; MA, 2021; LI, X. *et al.*, 2022). Sendo importantes pois nos ajudam a compreender melhor o seu papel na virulência do patógeno. Além disso, os resultados destes estudos podem ser utilizados, por exemplo, para detectar genes de resistência em cultivares ou localizar pontos de suscetibilidade em culturas suscetíveis, possibilitando o desenvolvimento de estratégias promissoras nas práticas agrícolas (VAN DE WOUW; IDNURM, 2019).

As publicações de revisões sistemáticas é de extrema relevância para reunir informações e fornecer uma visão geral sobre um determinado assunto, bem como apresentar lacunas existentes dentre do tema de interesse (CALDWELL; BENNETT, 2020). Sendo considerada a ferramenta mais confiável para resumir as evidências existentes (MUKA *et al.*, 2020). Essa abordagem é bastante comum na área médica, mas aos poucos está ganhando espaço nas áreas biológicas e agrárias, através de estudos relacionados a patossistemas de plantas economicamente importantes (DA SILVA *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2021).

O objetivo desta revisão é sistematizar os estudos de proteínas efetoras caracterizadas de fungos biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos. As informações reunidas auxiliarão na compreensão dos modos de ação dos efetores fúngicos, podendo ser úteis em pesquisas posteriores de melhoramento de culturas e aplicações biotecnológicas. Até onde sabemos, esta é a primeira revisão sistemática relacionada a proteínas efetoras de patógenos fúngicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenho do estudo

Esta revisão sistemática foi planejada e conduzida de acordo com as diretrizes fornecidas pelos Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA) (PAGE *et al.*, 2021). Inicialmente um protocolo foi desenvolvido para ser seguido durante todo o processo (Arquivo adicional 1).

Afim de obter estudos que respondesse a seguinte pergunta: “quais proteínas efetoras provenientes de patógenos fúngicos foram caracterizadas? Uma abordagem estruturada foi

utilizada para o enquadramento de questões, denominada PICOS (Population, Intervention, Comparison, Outcomes and Study) (DA COSTA SANTOS; DE MATTOS PIMENTA; NOBRE, 2007; METHLEY *et al.*, 2014). A estratégia PICOS auxilia na formulação de perguntas relevantes e precisas que podem ser respondidas em uma revisão sistemática (Tabela 1).

Tabela 1 - Componentes da pergunta de pesquisa seguindo o acrônimo PICOS.

Descrição	Abreviação	Componentes da pergunta
Population	P	Efetores proteicos de fungos envolvidos nas interações planta patógeno
Interest/intervention	I	Caracterização de efetores fúngicos que desencadeiam imunidade ou suscetibilidade em plantas
Comparison	C	Qualquer método que não envolva caracterização de efetores fúngicos (predição de efetores, efetores de bactérias, vírus, nematoides e oomicetos)
Outcome	O	Fungos fitopatogênicos com os mecanismos de ação de seus efetores bem elucidados
Study type	S	Artigos científicos com estudos experimentais

2.2. Seleção dos estudos

A busca de artigos nas bases de dados Science direct, PubMed e Web of Science foi realizada utilizando a string de pesquisa: (Effector OR avirulence OR virulence) AND pathogen AND plant AND (fungus OR fungi).

Os artigos foram importados para o software StArt (State of the Art through Systematic Review) versão Beta. 3.0.3, desenvolvido na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), onde foram classificados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão que foram estabelecidos (Arquivo adicional 1).

A revisão incluiu todos os estudos experimentais relacionados a caracterização de proteínas efetoras de fungos fitopatogênicos e excluiu artigos de revisão, capítulos de livros, resumos de congressos, teses ou dissertações, além de estudos que não focaram nos efetores de fungos envolvidos na interação planta patógeno. O método de busca e seleção foi apresentado no fluxograma PRISMA mostrando os estudos incluídos e excluídos (Figura 1).

2.3. Extração e sumarização de dados

Os dados foram extraídos para o Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016). Informações incluindo o autor, país em que o trabalho experimental foi realizado, patógeno estudado, técnica empregada, proteína efetora caracterizada, localização do efetor na planta e sua funcionalidade, foram considerados e todas as informações necessárias para responder as perguntas que norteiam o presente estudo. A partir destes dados foram elaborados os gráficos, tabelas e figuras/ilustrações.

3. RESULTADOS

3.1. Dados bibliométricos

Um total de 2114 artigos foram identificados nas bases de dados PubMed (423), Science Direct (507) e Web of Science (1184). Posteriormente, os estudos duplicados foram removidos (393), e em seguida, 1721 artigos foram previamente avaliados com base nos títulos e resumos. Após a triagem dos resumos, 1466 artigos foram excluídos, seguindo os critérios preestabelecidos. Uma amostra resultante de 255 artigos seguiu para a próxima etapa, na qual as cópias em texto completo foram analisadas. Após a leitura do texto completo dos 255 estudos restantes, 103 estudos atenderam aos critérios de elegibilidade e foram incluídos para esta revisão (Figura 1).

De acordo com os estudos incluídos nesta revisão, a distribuição geográfica é representada na Figura 2. Dentre os 16 países que contribuíram com as pesquisas, China (19%), Holanda (18%) e Estados Unidos (15%) foram os países que mais produziram estudos sobre caracterização de proteínas efetoras (Figura 2A). Esses países estudaram principalmente patógenos que afetam a cultura do arroz e tomate, como *M. oryzae* e *C. fulvum*, respectivamente (Figura 2B).

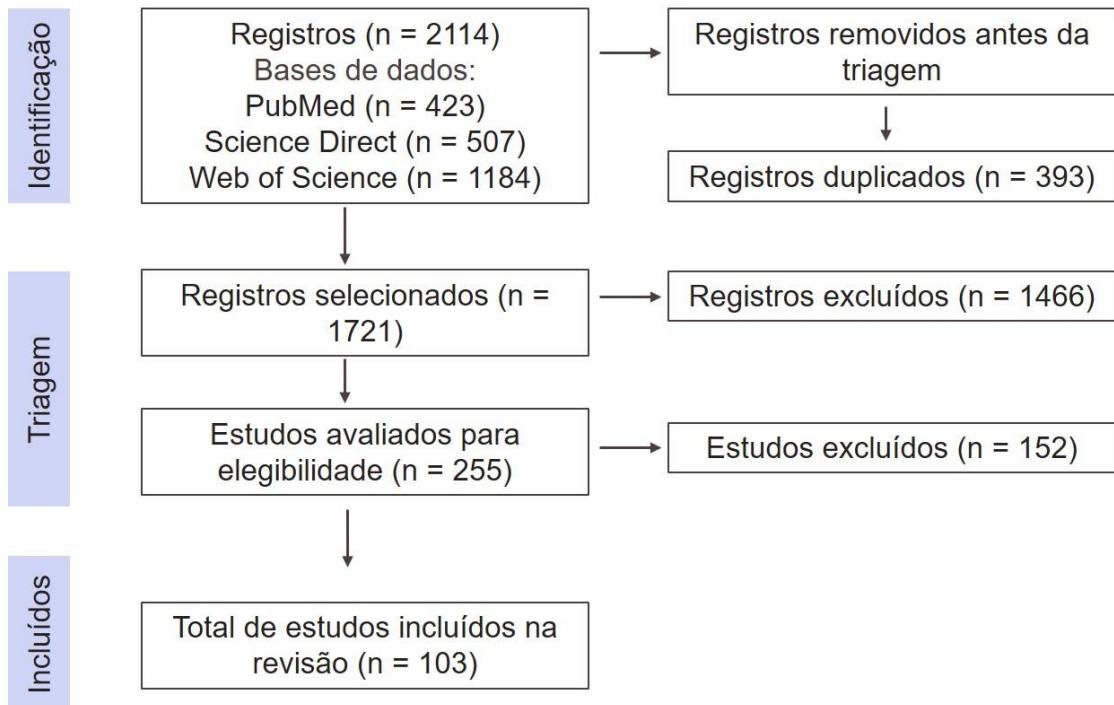


Figura 1. Fluxograma de seleção dos estudos de acordo com as diretrizes PRISMA.

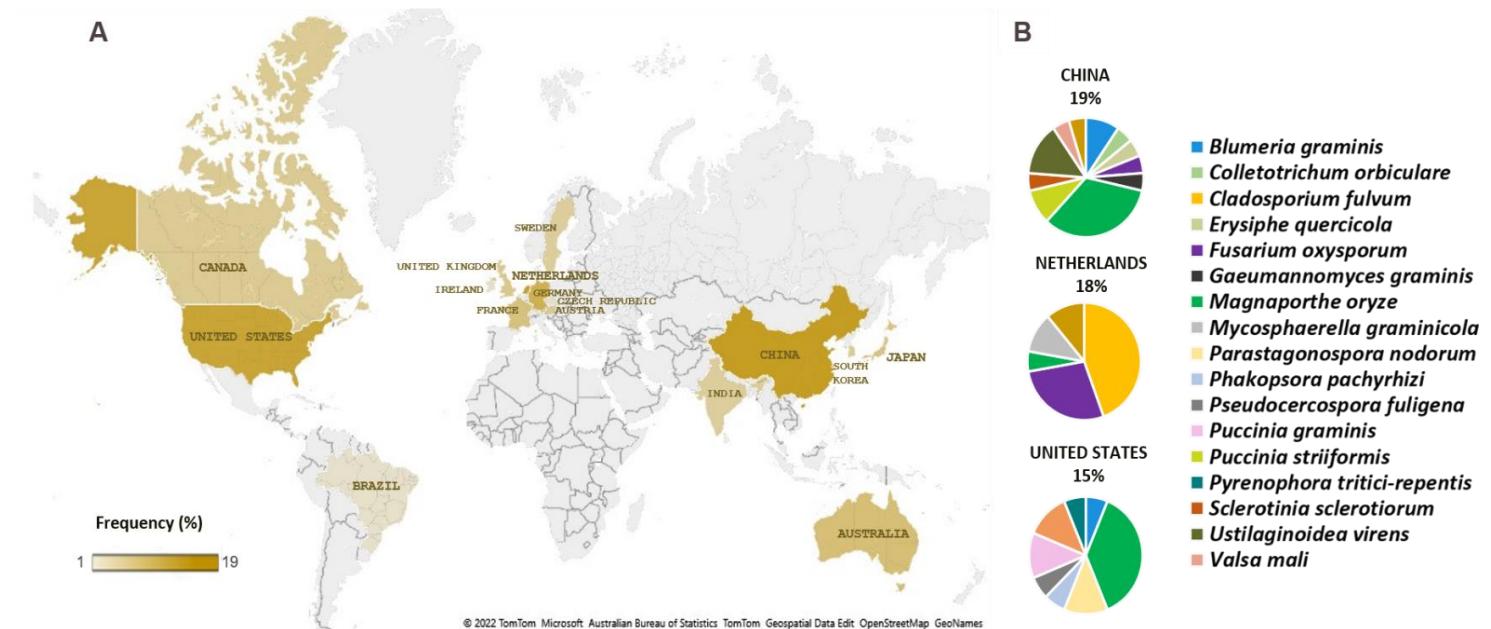


Figura 2. Resumo dos estudos publicados entre 1991-2021 reconhecidos nesta revisão sistemática. **(A)** Os 16 países que contribuíram com os estudos incluídos na revisão. **(B)** Principais países que publicaram estudos sobre caracterização de proteínas fúngicas efetoras e lista de patógenos que tiveram seus efetores estudados na China, Holanda e nos Estados Unidos.

3.2. Fitopatógenos fúngicos e seus efetores

Os resultados desta revisão revelaram um total de 108 proteínas efetoras caracterizadas, sendo secretadas por 28 patógenos fúngicos (Tabela 2). Em relação aos filos e as classes dos fungos que tiveram suas proteínas estudadas, 68% pertencem ao filo Ascomycota, sendo apenas 32% das espécies estudadas pertencentes ao filo Basidiomycota (Figura 3).

A maioria das proteínas são de fungos biotróficos (47%), sendo que os biotróficos *Ustilago maydis* e *Cladosporium fulvum*, estão entre os mais estudados. Os efetores do patógeno do tomate, o *C. fulvum*, possui 10 proteínas efetoras diferentemente caracterizadas e o patógeno do milho *U. maydis*, nove proteínas efetoras. Em relação aos fungos hemibiotróficos tivemos uma representação de 32%. O hemibiotrófico *Magnaporthe oryzae*, patógeno do arroz, foi a espécie que apresentou um maior número (n=31) de proteínas caracterizadas. Os fungos necrotróficos alcançaram 21% do total, no qual quatro efetores específicos de *Parastagonospora nodorum*, patógeno do trigo, foram caracterizados (Figura 4).

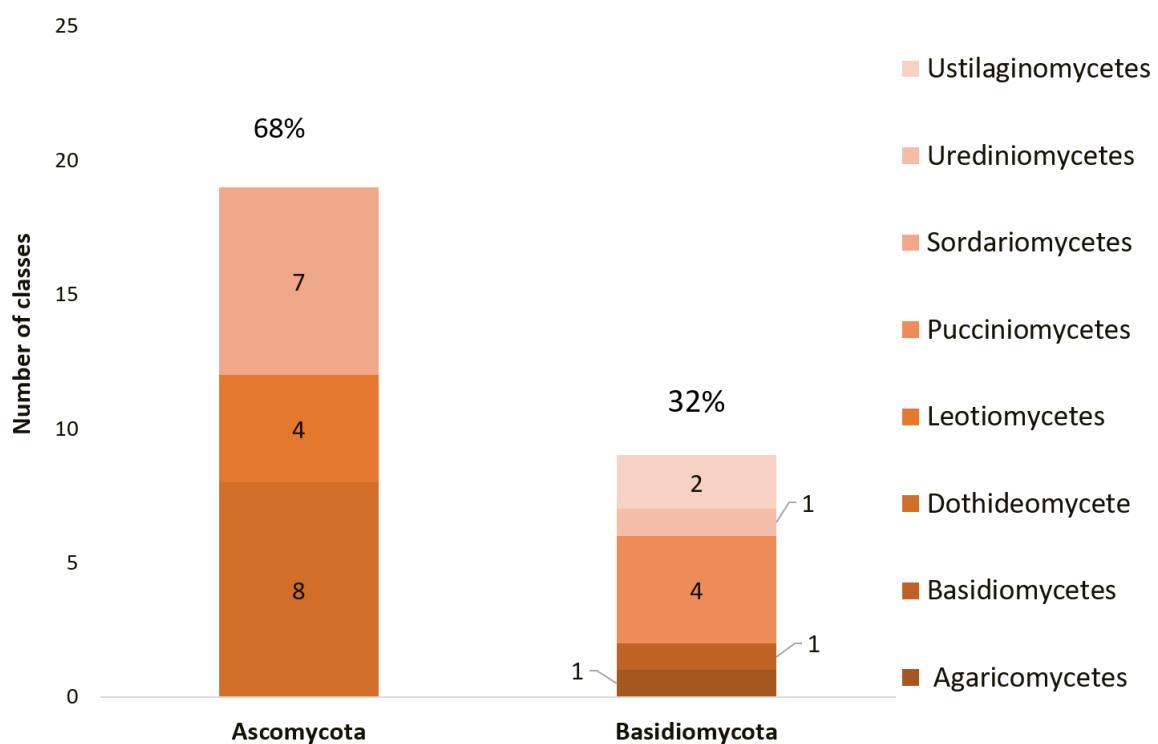


Figura 3. Frequência dos filos e classes dos patógenos fúngicos estudados.

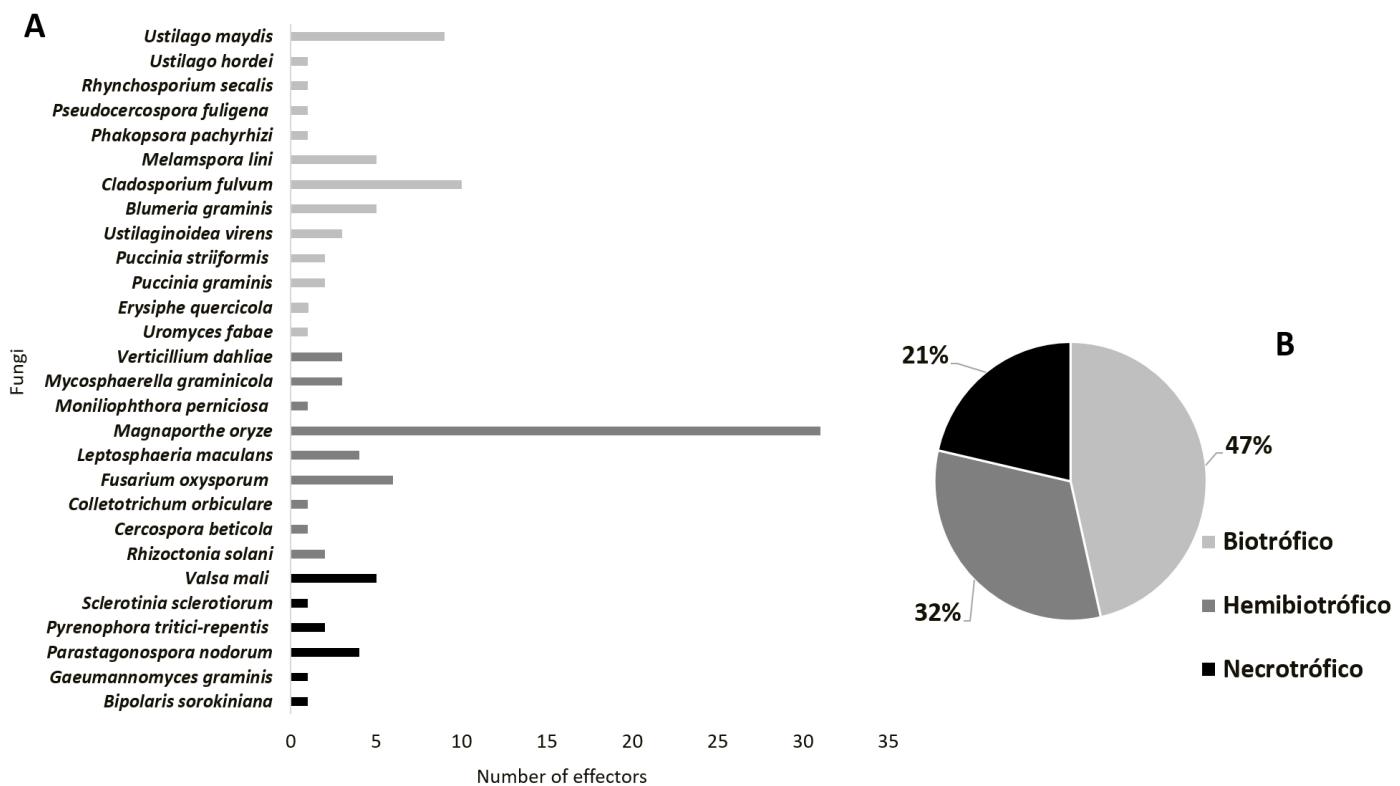


Figura 4. Relação dos patógenos com seus estilos de vida e a quantidade de efetores estudados.

(A) Patógenos fúngicos estudados com base na caracterização de suas proteínas efetoras. (B) Frequências dos estudos com fungos biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos.

3.3. Modos de ação das proteínas efetoras fúngicas

De modo geral esses efetores contribuem para a virulência do patógeno, bloqueando as respostas imunológicas da planta (46%), inibindo por exemplo, respostas precoces de PTI, como as ativadas por quitina. Um percentual de 32% atua como indutores de morte celular, sendo proteínas de fungos necrotróficos ou hemibiotróficos na fase final de infecção; 14% estão relacionadas com a supressão da morte celular hospedeira, sendo proteínas secretadas por biotróficos ou hemibiotróficos na fase inicial de infecção; 5% são proteínas que atuam inibindo as enzimas vindas da planta hospedeira e 3% participam da formação de estruturas de infecção do patógeno. Os mecanismos de ação das proteínas efetoras descritas neste artigo estão resumidos na Tabela 2, incluindo seu alvo molecular.

3.4. Direccionamento celular dos efetores proteicos

Foi elaborado um modelo biológico (Figura 5) que destaca quais os principais compartimentos celulares em que os efetores proteicos operam. 49% atuam no apoplasto e 51%

no citoplasma. As proteínas apoplásticas exercem uma ação duradoura na proteção da parede celular do fungo, inibindo moléculas antimicrobianas, como proteases e quitinases liberadas pelo hospedeiro contra o fungo. Já as citoplasmáticas que são translocadas para o interior da célula, incluindo núcleo e organelas, demonstram interferir em processos associados com a sinalização e defesa da planta.

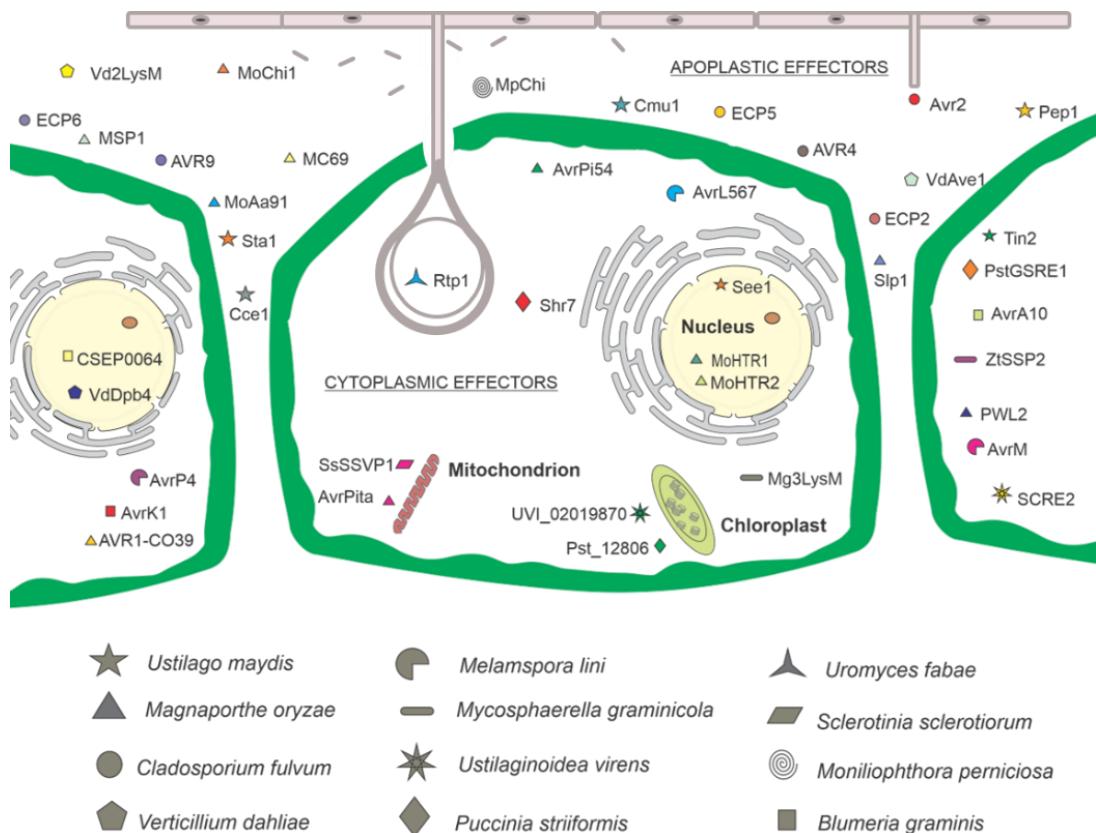


Figura 5. Localização apoplástica e citoplasmática de algumas proteínas efetoras caracterizadas e reunidas nesta revisão. Os símbolos representam os patógenos fúngicos e as cores diferenciam vários efetores liberados pelo mesmo fungo.

3.5. Técnicas utilizadas para a caracterização funcional de proteínas efetoras

As técnicas sumarizadas nos estudos selecionados foram as que permitiram demonstrar os mecanismos de ação das proteínas efetoras, para além disso as técnicas foram categorizadas em: ensaios funcionais, knockout ou knockdown, expressão de genes efetores em planta, marcadores fluorescentes, sistema de duplo híbrido de levedura (Y2H), coimunopreipitação (co-IP) e ensaios de pull-down (Figura 6).

Os estudos selecionados que relatam ensaios funcionais, como de indução ou supressão de morte celular semelhante a HR, medição de ROS, técnicas de coloração, inibição de

proteases, atividade enzimática, ensaios de secreção e de ligação de polissacarídeo, foram retratados em 27% dos estudos. As abordagens de Knockout ou Knockdown, como recombinação homóloga, silenciamento de genes mediado por RNA de interferência (RNAi), silenciamento de genes induzidos pelo hospedeiro (HIGS) e silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS – Virus Induced Gene Silence) foram abordados em 15% dos estudos. A expressão de genes efetores em planta foi empregada em 15% para determinar as atividades efetoras. Além disso, para encontrar o alvo da proteína estudada, bem como sua localização, foram utilizadas técnicas de microscopia confocal usando marcadores fluorescentes ou complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) (21%), sistema de duplo híbridos de levedura (Y2H) (12%), coimunopreipitação (co-IP) (6%) e ensaios de pull-down (4%).

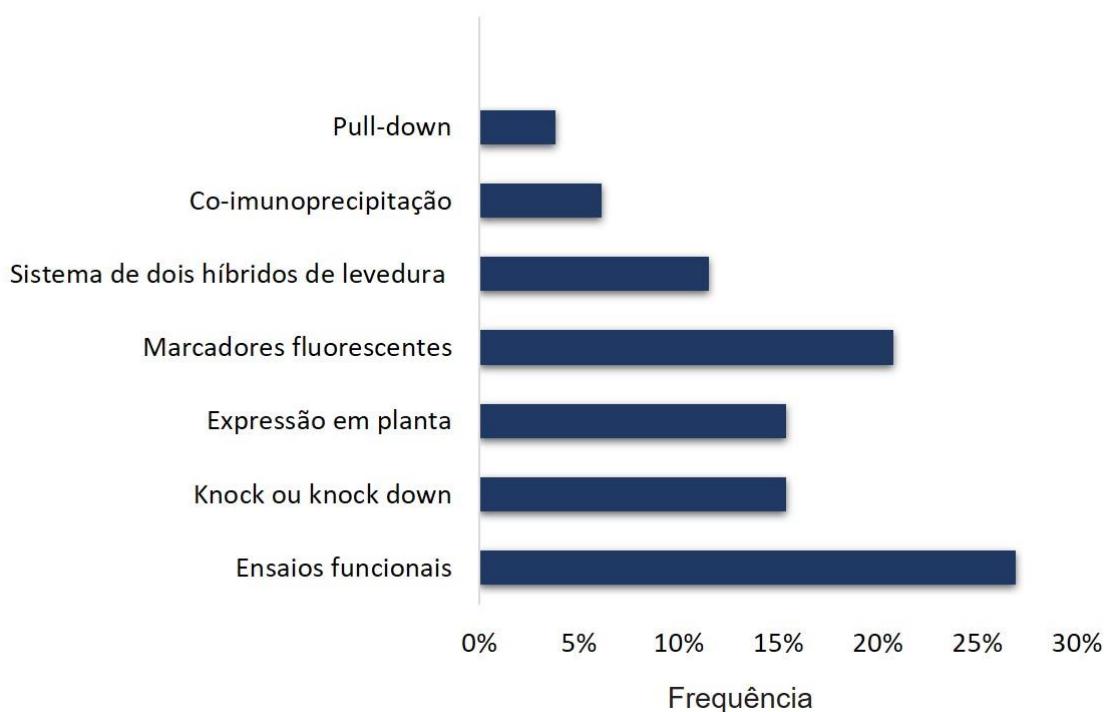


Figura 6. Frequência das técnicas utilizadas para elucidar os mecanismos de ação das proteínas efetoras incluídas na revisão sistemática.

4. DISCUSSÃO

Uma pesquisa minuciosa no banco de dados foi realizada e um total de 103 artigos foram utilizados para compor este trabalho. Um total de 28 patógenos fúngicos foram abordados em função das suas 108 proteínas com atividade efetora. A maioria desses fungos pertencem ao grupo Ascomycota. Este filo engloba gêneros, tais como *Blumeria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mycosphaerella* e *Magnaporthe*, considerados fitopatógenos que causam grandes danos em

culturas que são economicamente importantes (DEAN *et al.*, 2012). O grupo menos representativo neste estudo foi o Basidiomycota representado pelos gêneros *Rhizoctonia*, *Ustilago*, *Puccinia*, *Moniliophthora*, *Melampsora* e *Phakopsora*, patógenos que também possuem importância econômica a exemplo, de *M. perniciosa* fungo causador da vassoura de bruxa do cacaueiro.

Vale ressaltar que a maioria dos estudos foram realizados na China, que é o maior produtor de arroz do mundo (Figura 2). Como uma planta monocotiledônea, o arroz é utilizado como modelo para pesquisas científicas devido ao seu pequeno genoma em comparação com outras culturas de cereais (LIU, X.; ZHANG, 2021). A brusone do arroz, uma das doenças mais destrutivas dessa cultura, é causada pelo ascomiceto *M. oryzae*, patógeno que apresenta um maior percentual de proteínas efetoras caracterizadas até o momento (Figura 4). A razão por trás desses estudos pode ser o fato de que esse patógeno impõe uma grande restrição à produtividade na cultura do arroz. Dessa forma, *M. oryzae* se tornou um sistema modelo para entender as interações patógeno-hospedeiro (EBBOLE, 2007). Além disso, esse patossistema se encaixa no sistema gene-a-gene descrita por Flor (1971), ou seja, a resistência em cultivares de arroz é devida a interações específicas entre seus genes R e genes Avr de cepas de *M. oryzae* (LI, W. *et al.*, 2009; ORBACH *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2009).

4.1. O modo de ação dos efetores é baseado na relação do patógeno com as plantas hospedeiras

Os patógenos fúngicos utilizam diversos efetores para modificar diferentes aspectos do sistema imunológico das plantas hospedeiras. A maioria dos estudos trazidos são de proteínas efetoras empregadas por fungos biotróficos. Sabe-se, que os biotróficos colonizam e obtêm nutrientes das células vivas do hospedeiro. Dessa forma, os patógenos precisam empregar um grande repertório de efetores na fase biótrofica da infecção para manter o sistema imune do hospedeiro suspenso enquanto o fungo coloniza seus tecidos.

De acordo com os resultados, o patógeno biotrófico *C. fulvum*, causador do mofo das folhas de tomate, possui as proteínas efetoras mais bem caracterizadas. A Avr4, que é uma proteína rica em cisteína, se liga as quitinas da parede celular fúngica para impedir sua hidrólise por quitinases liberadas pela planta (VAN DEN BURG *et al.*, 2006). Outro efetor desse patógeno, o Ecp6, possui o mecanismo similar do Avr4 ao sequestrar os oligossacarídeos de quitina derivado da hidrólise da parede celular fúngica (BOLTON *et al.*, 2008; DE JONGE *et*

al., 2010). Quando os oligômeros de quitina são detectados por receptores extracelulares das plantas, isso desencadeia uma resposta imune induzida pela quitina (THOMMA; NÜRNBERGER; JOOSTEN, 2011). Portanto, o Avr4 e o Ecp6 comprometem a imunidade da planta hospedeira ao evitar que a quitina seja reconhecida por seus receptores imunológicos. Isso enfatiza a estratégia dos fungos biotróficos em liberar efetores para impedir a elicitação de respostas de defesa da planta.

O patógeno do milho *U. maydis*, também requer o tecido vegetal vivo para seu desenvolvimento, o biotrófico secreta um efetor rico em cisteína (Cce1), que é regulado positivamente durante o estágio biotrófico e indispensável no início da infecção (SEITNER *et al.*, 2018). A proteína efetora Sta1, considerada um novo tipo de efetor desse patógeno, modifica a parede celular das hifas durante a colonização do hospedeiro, para que o fungo não seja reconhecido pelo sistema imunológico da planta (TANAKA *et al.*, 2020).

Os fitohormônios regulam uma grande variedade de processos fisiológicos nas plantas (YANG, J. *et al.*, 2019). Estudos demonstram que a sinalização e defesas mediada por fitohormônios contribui para a resistência contra patógenos biotróficos (LEMARIÉ *et al.*, 2015; P. *et al.*, 1990; YANG, C. *et al.*, 2017). *U. maydis*, secreta as proteínas efetoras Cmu1 e Jsi1, que coopera com a corismato mutase do milho para reduzir o ácido salicílico disponível e sequestra a sinalização de jasmonato/etileno da planta ao interagir com o corepressor TOPLESS (TPL), respectivamente (DARINO *et al.*, 2021; DJAMEI *et al.*, 2011). Diante disso, podemos afirmar que os patógenos fúngicos desenvolveram estratégias para manipular a sinalização de defesa da planta e se tornar indetectáveis pelo seu sistema imunológico.

Os fungos hemibiotróficos se espalham biotróficamente no início da infecção, e em seguida progridem para a fase necrotrófica, onde matam as células hospedeiras para adquirir nutrientes. *M. oryzae* é um patógeno vegetal hemibiotrófico amplamente estudado. O fungo inicialmente secreta inúmeras proteínas efetoras para suprimir as respostas iniciais de defesa e manter seu hospedeiro vivo, prevenindo a morte celular. A proteína MoHrip1 de *M. oryzae*, demonstra facilitar a penetração do fungo e a subsequente proliferação pela supressão da imunidade do arroz, o que garante a virulência total do patógeno (NIE *et al.*, 2019). MoAa91 de *M. oryzae* também funciona como um efetor para suprimir a imunidade do hospedeiro. Este efetor proteico é capaz de competir com immune receptor chitin elicitor-binding protein precursor (CEBiP), suprimindo assim as respostas imunes induzidas pela quitina (LI, Y. *et al.*, 2020). Vale salientar, que o CEBiP desempenha um papel fundamental na percepção de

oligossacarídeos de quitina (THOMMA; NÜRNBERGER; JOOSTEN, 2011). Esses dados sugerem que os efetores proteicos MoHrip1 e MoAa91 são empregados pelo patógeno para inibir a morte das células hospedeiras e promover a fase biotrófica da colonização.

Em estágios posteriores da infecção, o hemibiotrófico *M. oryzae* emprega efetores que atuam induzindo a morte celular hospedeira. Um grupo de proteínas desse patógeno (MoCDIP1 a MoCDIP5) induzem a morte celular em plantas de arroz e *N. benthamiana* (CHEN *et al.*, 2012). Posteriormente, outros oito MoCDIPs foram identificados e causam também sintomas de necroses, facilitando a infecção na fase necrotrófica da colonização de *M. oryzae* no arroz (GUO *et al.*, 2019).

Apesar das proteínas efetoras serem mais estudadas em fungos biotróficos e hemibiotróficos, os mecanismos envolvidos na secreção de efetores por patógenos necrotróficos também estão sendo revelados. O necrotrófico *P. nodorum* é responsável pela doença da mancha foliar no trigo. O patógeno emprega o SnTox1 que interage com o receptor Snn1 para induzir a morte celular e adquirir nutrientes (LIU, Z. *et al.*, 2016). A resposta de HR com morte celular no local de infecção é eficiente para conferir resistência contra biotróficos e hemibiotróficos (no estágio inicial). Porém, para os fungos necrotróficos essa resposta de defesa da planta acaba sendo benéfica, pois esses fungos obtêm nutrientes de células mortas (LYU *et al.*, 2016). Esta interação tem sido caracterizada como uma relação “inverse gene-for-gene” onde um gene de suscetibilidade do hospedeiro é alvo de uma molécula efetora produzida pelo necrotrófico (FRIESEN; MEINHARDT; FARIS, 2007). Além disso, vale ressaltar que o SnTox1 cumpre um segundo papel na proteção das paredes celulares dos fungos da degradação por quitinases do trigo. Em outros estudos são demonstrados que diversas proteínas efetoras de biotróficos e hemibiotróficos se ligam à quitina para suprimir as respostas de defesa da planta (HAN, Y. *et al.*, 2019; KOHLER *et al.*, 2016; SÁNCHEZ-VALLET *et al.*, 2020). Aqui podemos inferir que um efetor empregado por um fungo necrotrófico pode suprimir as defesas da planta. Entretanto, especula-se que o tipo de morte celular desencadeada pela planta possa diferir daquela imposta pelo patógeno e, portanto, por isso precisa ser suprimida (SHAO *et al.*, 2021).

4.2. Efetores são categorizados de acordo com seu local de atuação

Os fitopatógenos secretam inúmeras proteínas efetoras no apoplasto ou no interior da célula hospedeira (Figura 5). Baseando-se nos estudos, dentro do apoplasto as proteínas demonstram proteger a parede celular do patógeno fúngico para evitar sua degradação e

reconhecimento por PRRs das plantas, além de atuarem como inibidores de moléculas antimicrobianas liberadas pelo hospedeiro contra o patógeno. O efetor de *M. perniciosa* MpChi, opera dentro do apoplasto sequestrando fragmentos de quitina livres oriundas da parede celular fúngica para prevenir a imunidade desencadeada por PAMPs do hospedeiro (FIORIN *et al.*, 2018). Hospedeiros e patógenos utilizam proteases e inibidores de protease durante suas interações para combater uns aos outros (VAN DER HOORN, 2008). O Avr2, um fator de virulência genuíno de *C. fulvum* atua no apoplasto inibindo várias proteases Cys necessárias para a defesa basal da planta (VAN ESSE *et al.*, 2008). Os efetores apoplásticos geralmente são proteínas ricas em cisteína, que contribuem para a sua estabilidade no apoplasto da planta (LANVER *et al.*, 2017). Desse modo, as plantas liberam proteases de cisteína contra o patógeno. E o patógeno libera efetores que inibem a atividade dessas proteases.

No citoplasma essas proteínas podem interferir em componentes de sinalização intracelular relacionados à defesa ou interagir com a proteína hospedeira. See1 é uma proteína efetora de *U. maydis*, que atua no núcleo do hospedeiro, necessária para a reativação da síntese de DNA, ao interagir com a proteína do hospedeiro SGT1, uma etapa importante para a formação de tumor vegetativo nas folhas de milho (REDKAR *et al.*, 2015). MoHTR1 e MoHTR2 empregados pelo *M. oryzae*, são proteínas que também atuam no núcleo e funcionam reprogramando a transcrição de um grande número de genes associados à imunidade do arroz (KIM *et al.*, 2020). Os cloroplastos desempenham papéis importantes na imunidade das plantas e nas respostas ao estresse por meio da ativação dos principais sinais de defesa, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) (SERRANO; AUDRAN; RIVAS, 2016). A expressão de Pst_12806 de *Puccinia striiformis* em plantas, reduz a produção de EROs derivados do cloroplasto do hospedeiro, perturbando a fotossíntese e imunidade basal no arroz (XU *et al.*, 2019). O efetor Avr-Pita de *M. oryzae* aumenta a atividade da COX, diminuindo o acúmulo de EROs, suprimindo a imunidade inata do hospedeiro ao perturbar o metabolismo de EROs nas mitocôndrias (HAN, J. *et al.*, 2021). A produção de EROs é uma das primeiras respostas de PTI que restringem a invasão de patógenos e ativação de defesas das plantas (LIU, X. *et al.*, 2020; TORRES, 2010). Dessa forma, a neutralização de EROs é fundamental para o sucesso do processo de colonização pelo patógeno (SEGAL; WILSON, 2018).

4.3. Abordagens experimentais utilizadas para a caracterização de efetores

De acordo com os estudo selecionados, as técnicas que permitiram demonstrar a ação das proteínas efetoras nos tecidos vegetais tinham como intuito verificar a contribuição do efetor para virulência do patógeno, bem como sua localização e alvo.

Desse modo, ensaios de necrose foram utilizados para determinar as atividades da proteína, que podem indicar interações entre o efetor do fungo e o alvo na planta ou até mesmo pode ser uma resposta induzida somente pelo efetor estudado. Um exemplo foi a expressão transitória da proteína BEC1019, de *Blumeria graminis*, que desencadeou morte celular em *Nicotiana benthamiana* (ZHANG, Y. *et al.*, 2019). Ensaios de supressão podem ser utilizados para verificar se há alterações na resposta imune da planta que é induzida por um elicitador conhecido. MoHEG13 de *M. oryzae*, atua como um supressor de morte celular, pois quando infiltrado em *N. benthamiana* demonstra antagonizar a morte celular induzida por Nep1 (MOGGA *et al.*, 2016). Além disso, MoHEG13 apresenta uma função de virulência, pois mutante knockout apresentou progressão atenuada da doença quando inoculado em cevada.

Abordagens baseadas no silenciamento de genes estão sendo bem exploradas e foram aplicadas para determinar a função do gene em relação à virulência do patógeno. Para investigar a função de PstGSRE1 na infecção por *Puccinia striiformis*, foi utilizado o silenciamento gênico induzido pelo vírus do mosaico da cevada (BSMV), os resultados demonstram que o silenciamento de PstGSRE1 reduz significativamente a virulência de *P. striiformis* (QI, T. *et al.*, 2019). O efetor ZtSSP2 de *Mycosphaerella graminicola*, interage com uma ubiquitina ligase do trigo (TaE3UBQ) para promover a doença (KARKI *et al.*, 2021). O silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) de TaE3UBQ resulta em um aumento da suscetibilidade a *M. graminicola*. Este estudo demonstra como um efetor provavelmente tem como alvo o sistema de ubiquitina hospedeiro para auxiliar na colonização bem-sucedida. A expressão heteróloga de Ecp6 aumenta significativamente a virulência do patógeno vascular *Fusarium oxysporum* em tomate (BOLTON *et al.*, 2008). Além disso, por meio do silenciamento de genes mediado por RNA de interferência (RNAi), os autores demonstram que Ecp6 é fundamental para a virulência de *C. fulvum* em tomate.

Muitos estudos buscaram o alvo da proteína dentro das células vegetais e a localização subcelular da proteína efetora. Li e colaboradores (2020), realizaram o ensaio Y2H e de BiFC para demonstrar que UVI_02019870 interage com OsCPL1, que foi previsto como um precursor do cloroplasto para regular as vias de sinalização do cloroplasto. Além disso, usando

imagens de células vivas, foi documentado a localização de AVR-Pia marcada com proteína fluorescente verde (GFP), o que indica que AVR-Pia se acumula em complexos interfaciais biotróficos antes de ser entregue ao citosol da planta (SORNKOM *et al.*, 2017).

5. CONCLUSÃO

A revisão permitiu sistematizar os efetores de fungos fitopatogênicos já caracterizados na literatura e compreender seus mecanismos de ação nos patossistemas. Destacamos que o modo de ação dos efetores fúngicos é baseado na relação do patógeno com as plantas hospedeiras. Desse modo, os fungos biotróficos, secretam efetores que vão manter o sistema imune do hospedeiro suspenso enquanto o fungo coloniza os tecidos vegetais. Para isso inibem a ativação ou respostas precoces de PTI de modo geral. Os necrotróficos liberam efetores que vão induzir a morte celular hospedeira e fazer com que o patógeno obtenha nutrientes de células mortas. Dessa forma, utilizam efetores que vão manipular as vias de defesa existentes do hospedeiro, como por exemplo, a resposta hipersensível. Os hemibiotróficos agem inicialmente como os biotróficos, empregando efetores para suprimir as respostas de defesa da planta, e posteriormente, na fase necrotrófica da infecção, esses fungos liberam efetores que vão induzir respostas de morte celular vegetal.

As funções efetoras conhecidas são resultado de uma combinação de abordagens experimentais. Sendo que alguns patógenos possuem um grande arsenal de efetores caracterizados, como *M. oryzae*. Em outros casos, patógenos que também possuem importância econômica para culturas, como os representantes do filo basidiomycota, carecem de caracterização funcional. Ressaltamos a necessidade de estudos para a elucidação dessas funções que podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças fúngicas em plantas.

Portanto, os dados sumarizados nesta revisão juntamente com o modelo biológico proposto que destaca a localização de alguns efetores proteicos caracterizados, contribui para embasar estudos que visem a utilização desses efetores em aplicações biotecnológicas.

Tabela 2. Lista de fitopatógenos fúngicos e seus efetores caracterizados, incluindo seu modo de ação e seu alvo de interação no hospedeiro.

Patógeno	Hospedeiro	Efetor	Interação	Funções associadas	Referências
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Triticum aestivum</i>	ToxA	Tsn1	Facilita a infecção na presença do Tsn1 no hospedeiro; induz a morte de células vegetais	(MCDONALD <i>et al.</i> , 2018; NAVATHE <i>et al.</i> , 2019)
		AvrA10	Mla10	Induz morte celular em variedades de cevada Mla10	
		AvrK1	Mlk1	Induz morte celular em variedades de cevada Mlk1	
<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	CSEP0064 / BEC1054	PR10	Interage com a proteína PR10 relacionada à patogênese; reprime a imunidade da planta e interfere na degradação do RNA ribossômico do hospedeiro	(PENNINGTON <i>et al.</i> , 2019)
		BEC1019	Desconhecido	Aumenta a suscetibilidade do trigo	
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	<i>Triticum aestivum</i>	BEC1019	Desconhecido	Aumenta a suscetibilidade do trigo	(ZHANG, Y. <i>et al.</i> , 2019)
<i>Cercospora beticola</i>	<i>Beta vulgaris</i>	CbNip1	Desconhecido	Induz morte de células vegetais	(EBERT <i>et al.</i> , 2021)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	<i>Cucumis sativus</i>	NIS1	BAK1 e BIK1	Interage com as quinases BAK1 e BIK1; suprime a resposta de hipersensibilidade	(IRIEDA <i>et al.</i> , 2019)
<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	AVR2	Cf2, Rcr3 e Pip1	Interage com Cf-2; inibe proteases cisteína do tomate Rcr3 e Pip3, necessárias para a defesa basal da planta	(DIXON <i>et al.</i> , 1996; VAN ESSE <i>et al.</i> , 2008)
		AVR4	Cf4	Interage com Cf-4; proteção da parede celular fúngica contra quitinases	

	AVR9	Cf9	É necessário para a virulência em um hospedeiro suscetível e desencadeia a resistência em tomateiros portadores do gene de resistência Cf9.	(VAN KAN; VAN DEN ACKERVEKEN; DE WIT, 1991)
	ECP1	Desconhecido	Suprime as respostas de defesa do hospedeiro	(LAUGÉ, Richard <i>et al.</i> , 1997)
	ECP2	Cf-ECP2	Interage com ECP2; suprime a ativação das respostas de defesa da planta	(LAUGÉ, R <i>et al.</i> , 1998; LAUGÉ, Richard <i>et al.</i> , 1997)
	ECP3	Desconhecido	Resposta de hipersensibilidade	(LAUGÉ, R <i>et al.</i> , 2000)
	ECP4	Desconhecido	Resposta de hipersensibilidade	(LAUGÉ, R <i>et al.</i> , 2000)
	ECP5	Desconhecido	Resposta de hipersensibilidade	(LAUGÉ, R <i>et al.</i> , 2000)
	ECP6	Desconhecido	Suprime a imunidade desencadeada por quitina em plantas	(BOLTON <i>et al.</i> , 2008)
	ECP7	Desconhecido	Desconhecido	(BOLTON <i>et al.</i> , 2008)
<i>Erysiphe</i> <i>quercicola</i>	<i>Hevea</i> <i>brasiliensis</i>	EqCmu	Desconhecido	Suprime o acúmulo do ácido salicílico (HE, Qiguang <i>et al.</i> , 2021)
<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	<i>Solanum</i> <i>lycopersicum</i>	Avr1 (six4)	1-1	Confere resistência cultivares com o 1-1 ou desempenha sua função de virulência em cultivares suscetíveis (HOUTERMAN <i>et al.</i> , 2009)
		Avr2 (Six3)	1-2	Confere resistência cultivares com o 1-2 ou desempenha sua função de virulência em cultivares suscetíveis (HOUTERMAN <i>et al.</i> , 2009)
		Avr3 (Six1)	1-3	Confere resistência cultivares com o 1-3 ou desempenha sua função de virulência em cultivares suscetíveis (REP <i>et al.</i> , 2004; VAN DER DOES <i>et al.</i> , 2008)

		Six5	l-2	Six5 facilita o movimento do Avr2 via plasmodesmo	(CAO <i>et al.</i> , 2018; MA <i>et al.</i> , 2015)
		Six6	l-2	Suprime a morte celular mediada por l-2	(GAWEHNS <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Musa acuminata</i>	SIX8	Desconhecido	É necessário para a virulência	(AN <i>et al.</i> , 2019)
		AvrLm1	Rlm1	Interage com Rlm1	(GOUT <i>et al.</i> , 2006)
		AvrLm3	Rlm3	Interage com Rlm3	(PLISSONNEAU <i>et al.</i> , 2016)
<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	AvrLm4-7	Rlm4 e Rlm7	Interage com Rlm4 e Rlm7	(PARLANGE <i>et al.</i> , 2009)
		AvrLm6	Rlm6	Interage com Rlm6	(FUDAL <i>et al.</i> , 2007)
		AVR-Pita	Pi-ta	Confere avirulência para cultivares de arroz que contêm Pi-ta; suprime a imunidade inata aumentando a atividade COX na mitocôndria	(HAN, J. <i>et al.</i> , 2021; ORBACH <i>et al.</i> , 2000)
		ACE1	Desconhecido	Elimina o reconhecimento do fungo por cultivares resistentes	(BÖHNERT <i>et al.</i> , 2004)
		AvrPiz-t	Piz-t e APIP5	Interage com Piz-t. Suprime a atividade transcricional de APIP5 para inibi a imunidade desencadeada por PAMP	(PARK <i>et al.</i> , 2012; WANG, R. <i>et al.</i> , 2016)
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	AVR1-CO39	Pi-CO39	Resistência em cultivares de arroz que carregam o Pi-CO39R	(RIBOT <i>et al.</i> , 2013)
		AvrPi54 (Mo-01947_9)	Pi54	Resistência em cultivares de arroz que carregam o gene Pi54	(RAY <i>et al.</i> , 2016)
		MoHEG13	Desconhecido	Suprime a morte de células vegetais	(MOGGA <i>et al.</i> , 2016)
		MoHEG16	Desconhecido	Interfere na infecção do hospedeiro	(MOGGA <i>et al.</i> , 2016)

MSP1	desconhecido	Induz morte celular incluindo acúmulo de H ₂ O ₂	(WANG, Yiming <i>et al.</i> , 2016)
Avr-Pia	Pi-a	Interage com Pi-a	(YOSHIDA <i>et al.</i> , 2009)
AVR-Pii	Pi-i	Interage com Pi-i; atenua a explosão de ROS e desempenha um papel essencial na interrupção da imunidade inata do hospedeiro ao interagir com os-NADP-ME2	(SINGH <i>et al.</i> , 2016; YOSHIDA <i>et al.</i> , 2009)
Avr-Pik	Pi-k	Interage com Pi-k	(YOSHIDA <i>et al.</i> , 2009)
MoChi1	OsMBL1	Compete com OsMBL1 pela ligação de quitina; suprime as ROS induzidas por quitina	(HAN, Y. <i>et al.</i> , 2019)
NIS1	BAK1 e BIK1	Interage com as quinases BAK1 e BIK1; suprime a resposta de hipersensibilidade	(IRIEDA <i>et al.</i> , 2019)
MoHrip1	Desconhecido	Inativação das respostas imunes do hospedeiro	(NIE <i>et al.</i> , 2019)
Slp1	Desconhecido	Sequestra oligossacarídeos de quitina para prevenir a imunidade desencadeada por PAMPs	(MENTLAK <i>et al.</i> , 2012)
MC69	Desconhecido	Suprime morte celular hospedeira	(SAITO <i>et al.</i> , 2012; SHARPEE <i>et al.</i> , 2017)
BAS1	Desconhecido	Desconhecido	(MOSQUERA <i>et al.</i> , 2009)
BAS2	Desconhecido	Desconhecido	(MOSQUERA <i>et al.</i> , 2009)
SPD5 (BAS4)	Desconhecido	Suprime morte celular hospedeira	(MOSQUERA <i>et al.</i> , 2009; SHARPEE <i>et al.</i> , 2017)
SPD6 (BAS3)	Desconhecido	Suprime morte celular hospedeira	(MOSQUERA <i>et al.</i> , 2009; SHARPEE <i>et al.</i> , 2017)

<i>Melampsora lini</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	SPD8(BAS 162)	Desconhecido	Suprime morte celular hospedeira	(MOSQUERA <i>et al.</i> , 2009; SHARPEE <i>et al.</i> , 2017)
		MoAa91	CEBiP	Compete com CEBiP pela ligação de quitina; suprime a resposta imune de planta induzida por quitina	(LI, Y. <i>et al.</i> , 2020)
		MoHTR1	Desconhecido	Reprograma a transcrição de genes associados à imunidade em arroz	(KIM <i>et al.</i> , 2020)
		MoHTR2	Desconhecido	Reprograma a transcrição de genes associados à imunidade em arroz	(KIM <i>et al.</i> , 2020)
		PWL1	Desconhecido	Desconhecido	(KANG; SWEIGARD; VALENT, 1995)
		PWL2	Desconhecido	Desconhecido	(KANG; SWEIGARD; VALENT, 1995)
		MoCDIP1	Desconhecido	Induz morte de células vegetais	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
		MoCDIP2	Desconhecido	Induz morte de células vegetais	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
		MoCDIP3	Desconhecido	Induz morte de células vegetais	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
		MoCDIP4	Desconhecido	Induz morte de células vegetais	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
		MoCDIP5	Desconhecido	Induz morte de células vegetais	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
		AvrM;	M	Interage com M; induz morte de células vegetais	(CATANZARITI <i>et al.</i> , 2006)
		AvrP123;	P1, P2 e P3	Interage com P1, P2 e P3	(CATANZARITI <i>et al.</i> , 2006)
		AvrP4	P4	Induz morte de células vegetais	(CATANZARITI <i>et al.</i> , 2006)
		AvrL567	L5, L6 e L7	Interage com L5, L6 e L7	(DODDS <i>et al.</i> , 2006)
		AvrL567-A	LuCKX1.1	Aumenta a atividade enzimática de LuCKX1.1	(WAN <i>et al.</i> , 2019)

<i>Moniliophthora perniciosa</i>	<i>Theobroma cacao</i>	MpChi	Desconhecido	Sequestra fragmentos de quitina para suprimir a imunidade desencadeada por PAMPs	(FIORIN <i>et al.</i> , 2018)
		Mg1LysM	Desconhecido	Confere proteção da parede celular fúngica contra quitinases	(MARSHALL <i>et al.</i> , 2011; SÁNCHEZ-VALLET <i>et al.</i> , 2020)
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Mg3LysM	Desconhecido	Bloqueia a ativação de respostas de defesa de plantas induzidas por quitina; protege as hifas fúngicas contra a hidrólise da quitinases	(LEE <i>et al.</i> , 2014; MARSHALL <i>et al.</i> , 2011; SÁNCHEZ-VALLET <i>et al.</i> , 2020)
		ZtSSP2	E3 (TaE3UBQ)	Interage com E3 (TaE3UBQ) para auxiliar na infecção bem sucedida	(KARKI <i>et al.</i> , 2021)
<i>Parastagonospora nodorum</i>		SnToxA	Tsn1	Interage com Tsn1; induz mudanças no metabolismo secundário da planta e morte celular vegetal	(DU FALL; SOLOMON, 2013; FARIS <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Triticum aestivum</i>	SnTox1	Snn1	Interage com Snn1; induz a morte de células vegetais; se liga à quitina presente nas paredes das células fúngicas, protegendo-as contra quitinases	(LIU, Z. <i>et al.</i> , 2016)
		SnTox3	Snn3	Interage com Snn3; induz a morte de células vegetais	(WINTERBERG <i>et al.</i> , 2014)
		SnTox7	Snn7	Interage com Snn7; induz morte de células vegetais	(SHI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	<i>Glycine max</i>	Pp EC23	Gm SPL12l	Interage com o fator de transcrição da soja Gm SPL12l para suprimir as respostas imunes da soja	(QI, M. <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pseudocercospora fuliginea</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pf-Avr4	Cf-4	Interage com Cf-4; se liga à quitina da parede celular fúngica, protegendo-a contra quitinases	(KOHLER <i>et al.</i> , 2016)
<i>Puccinia graminis</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Shr7	Desconhecido	Suprime a produção de ROS	(RAMACHANDRAN <i>et al.</i> , 2017)

		PgtSR1	Desconhecido	Altera a abundância de sRNAs envolvidos em processos de defesa	(YIN <i>et al.</i> , 2019)
<i>Puccinia striiformis</i>	<i>Triticum aestivum</i>	PstGSRE1	TaLOL2	Interrompe a localização nuclear do fator de transcrição TaLOL2; suprime a morte celular mediada por ROS	(QI, T. <i>et al.</i> , 2019)
		Pst_12806)	TaISP	Se liga à TaISP reduzindo o acúmulo de ROS	(XU <i>et al.</i> , 2019)
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	<i>Triticum aestivum</i>	ToxA	Tsn1	Induz morte de células vegetais	(FARIS <i>et al.</i> , 2010)
		ToxB	Desconhecido	Induz clorose em cultivares de trigo sensíveis a toxinas	(FIGUEROA <i>et al.</i> , 2015)
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Oryza sativa, Cucumis sativus, Glycine max</i>	RsLysM	Desconhecido	Se liga à quitina presente nas paredes das células fúngicas suprimindo a imunidade acionada por quitina	(DÖLFORS <i>et al.</i> , 2019)
		<i>Beta vulgaris</i>	RsRlpA	Desconhecido	Inibidor de protease que promove a virulência por meio da supressão da resposta hipersensível
<i>Rhynchosporium secalis</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	NIP1	Rrs1	Confere resistência cultivares com o Rrs1 ou desempenha sua função de virulência em cultivares suscetíveis	(GIERLICH <i>et al.</i> , 1999; ROHE <i>et al.</i> , 1995)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ampla gama de hospedeiros	SsSSVP1	QCR8	Induz morte programada em células vegetais	(LYU <i>et al.</i> , 2016)
<i>Uromyces fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	RTP1	Desconhecido	Inibidor de protease de cisteína	(KEMEN <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ustilaginoidea virens</i>	<i>Oryza sativa</i>	SCRE2	INF1	Suprime morte celular induzida por INF1	(FANG <i>et al.</i> , 2019)
		UvHrip1	Desconhecido	Suprime a expressão de genes relacionados à defesa	(WANG, Yingling <i>et al.</i> , 2020)
		UVI_02019 870	OsCPL1	Proteína indutora de resposta hipersensível	(LI, S. <i>et al.</i> , 2020)

<i>Ustilago hordei</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	UhAvr1	Ruh1	Desencadeia HR em cultivares de cevada com o Ruh1 ou desempenha sua função de virulência em cultivares suscetíveis	(LINNING <i>et al.</i> , 2009; MONTENEGRO ALONSO <i>et al.</i> , 2020)
		Tin2	ZmTTK1	Estabiliza a quinase de milho TKK1 para estimular positivamente a produção de antocianina no tecido infectado e suprimir a biossíntese de lignina;	(TANAKA <i>et al.</i> , 2014)
		See1	SGT1	Participa da reativação da síntese de DNA das folhas de milho contribuindo para a formação de tumor vegetativo	(REDKAR <i>et al.</i> , 2015)
		Pep1	POX12	Suprime a imunidade da planta por meio da inibição da atividade da peroxidase do hospedeiro	(DOEHELMANN <i>et al.</i> , 2009; HEMETSBERGER <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ustilago maydis</i>	<i>Zea mays</i>	ApB73	Desconhecido	Envolvido na formação de galhas no hospedeiro	(STIRNBERG; DJAMEI, 2016)
		Cce1	Desconhecido	Inibe a ativação ou respostas precoces de PTI	(SEITNER <i>et al.</i> , 2018)
		Sta1	Desconhecido	Modifica a parede celular das hifas	(TANAKA <i>et al.</i> , 2020)
		Jsi1	TPL/TPRs	Sequestra a sinalização de jasmonato/ etileno da planta	(DARINO <i>et al.</i> , 2021)
		pit2	Desconhecido	Interage diretamente com protease de cisteína	(DOEHELMANN <i>et al.</i> , 2011)
		Cmu1	Desconhecido	Reduz o SA disponível	(DJAMEI <i>et al.</i> , 2011)
<i>Valsa mali</i>	<i>Malus domestica</i>	VmHEP1			
		VmHEP2			
		VmHEP3	Desconhecido	Contribuem para a virulência total de maneira redundante; VmHEP1 e VmHEP2 são complementares durante a infecção	(ZHANG, M. <i>et al.</i> , 2019);
		VmHEP4			

VmHEP5

<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Vd2LysM	Desconhecido	Suprime as respostas imunes induzidas por quitina e protege as hifas contra a degradação por enzimas hidrolíticas de plantas	(KOMBRINK <i>et al.</i> , 2017)
		VdAve1	Ve1	Manipula o microbioma do hospedeiro por meio da supressão de bactérias antagônicas	(SNELDERS <i>et al.</i> , 2020)
		VdDpb4	VdIsw2	Interage com VdIsw2	(WANG, S. <i>et al.</i> , 2020)

Arquivo adicional 1. Descrição do protocolo de revisão sistemática.

Título	Caracterização de efetores proteicos fúngicos nas interações planta-patógeno: uma revisão sistemática
Objetivo	Identificar as proteínas efetoras de fungos biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos caracterizadas até o momento, bem como seus mecanismos de ação no desenvolvimento das doenças fúngicas de plantas.
Principais perguntas	<ol style="list-style-type: none">1. Quais países produziram mais estudos sobre caracterização de proteínas efetoras?2. Quais foram os fungos fitopatogênicos mais estudados?3. Quais foram as proteínas efetoras caracterizadas nesses estudos?4. Qual a localização celular desses efetores nas plantas?5. Quais os mecanismos de ação desses efetores no desenvolvimento de doenças fúngicas?6. Quais foram as técnicas utilizadas para a caracterização desses efetores?
String de busca	(Effector OR avirulence OR virulence) AND pathogen AND plant AND (fungus OR fungi)
Critério de seleção de fonte de busca	Artigos científicos indexados em periódicos do tipo peer review.
Método de pesquisa	Utilização de string de busca para encontrar os artigos nas bases de dados.
Banco de dados para pesquisa	Science Direct; PubMed; Web Of Science.
Critérios de Inclusão	Artigos que apresentem as palavras chaves que compõe a string de pesquisa.
Critérios de Exclusão	Artigos que não estejam alinhados com o objetivo da revisão sistemática; Artigos de

	revisão; Teses e dissertações; Capítulos de livro; Trabalhos técnicos, resumos simples e expandidos.
Definição dos tipos de estudos	Com base nos critérios de inclusão e exclusão.
Seleção inicial dos estudos	Artigos que contêm no título, resumo ou palavras-chave, os termos: “Effector” OR “avirulence” OR “virulence” AND “pathogen” AND “plant” AND “fungus” OR “fungi”
Seleção final dos estudos	Apresentar os critérios de inclusão e nenhum critério de exclusão.
Estratégia de Extração de dados	País de estudo, patógeno estudado, estilo de vida do patógeno, proteína efetora caracterizada no estudo, localização do efetor na planta e sua função na virulência.
Sumarização dos dados	Através de gráficos, fluxogramas, tabelas e figuras.

REFERÊNCIAS

AN, Bang *et al.* The effector SIX8 is required for virulence of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense tropical race 4 to Cavendish banana. **Fungal biology**, Netherlands, v. 123, n. 5, p. 423–430, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.03.001>

BAI, Shiwei *et al.* Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. e1002752–e1002752, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002752>

BALINT-KURTI, Peter. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1163–1178, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>

BIGEARD, Jean; COLCOMBET, Jean; HIRT, Heribert. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular plant**, England, v. 8, n. 4, p. 521–539, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>

BÖHNERT, Heidi U *et al.* A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. **The Plant cell**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 2499–2513, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022715>

BOLTON, Melvin D *et al.* The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. **Molecular microbiology**, England, v. 69, n. 1, p. 119–136, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06270.x>

CALDWELL, Patrina H Y; BENNETT, Trish. Easy guide to conducting a systematic review. **Journal of Paediatrics and Child Health**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 853–856, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpc.14853>

CAO, Lingxue *et al.* The *Fusarium oxysporum* Avr2-Six5 Effector Pair Alters Plasmodesmatal Exclusion Selectivity to Facilitate Cell-to-Cell Movement of Avr2. **Molecular plant**, England, v. 11, n. 5, p. 691–705, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.02.011>

CATANZARITI, Ann-Maree *et al.* Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **The Plant cell**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 243–256, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035980>

CHAROVA, Spyridoula N *et al.* The RsRlpA Effector Is a Protease Inhibitor Promoting *Rhizoctonia solani* Virulence through Suppression of the Hypersensitive Response. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 21, p. 8070, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21218070>

CHEN, Songbiao *et al.* Identification and characterization of in planta-expressed secreted effector proteins from *Magnaporthe oryzae* that induce cell death in rice. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 26, n. 2, p. 191–202, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0117-R>

CHEN, Songbiao *et al.* Identification and Characterization of In planta-Expressed Secreted Effector Proteins from *Magnaporthe oryzae* That Induce Cell Death in Rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 191–202, 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0117-R>

CUI, Haitao; TSUDA, Kenichi; PARKER, Jane E. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annual review of plant biology**, United States, v. 66, p. 487–511, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>

DA COSTA SANTOS, Cristina Mamédio; DE MATTOS PIMENTA, Cibele Andruccioli; NOBRE, Moacyr Roberto Cuce. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. **Revista latino-americana de enfermagem**, Brazil, v. 15, n. 3, p. 508–511, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0104-11692007000300023>

DA SILVA, Adielle R *et al.* Corrigendum to: Systematic review of defense responses against *Phytophthora* and strategies to manage *Phytophthora* diseases in citrus. **Functional plant biology : FPB**, Australia, v. 48, n. 10, p. 1086, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1071/FP20349_CO

DARINO, Martin *et al.* *Ustilago maydis* effector Jsi1 interacts with Topless corepressor, hijacking plant jasmonate/ethylene signaling. **New Phytologist**, [s. l.], v. 229, n. 6, p. 3393–3407, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.17116>

DE JONGE, Ronnie *et al.* Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. **Science**, [s. l.], v. 329, n. 5994, p. 953–955, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1190859>

DEAN, Ralph *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

DIXON, M S *et al.* The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. **Cell**, United States, v. 84, n. 3, p. 451–459, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81290-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81290-8)

DJAMEI, Armin *et al.* Metabolic priming by a secreted fungal effector. **Nature**, England, v. 478, n. 7369, p. 395–398, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature10454>

DODDS, Peter N *et al.* Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 23, p. 8888 LP – 8893, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0602577103>

DOEHLEMANN, Gunther *et al.* Pep1, a Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis*, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. e1000290, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000290>

DOEHLEMANN, Gunther *et al.* Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. **Molecular microbiology**, England, v. 81, n. 3, p. 751–766, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07728.x>

DÖLFORS, Fredrik *et al.* A LysM effector protein from the basidiomycete *Rhizoctonia solani* contributes to virulence through suppression of chitin-triggered immunity. **Molecular Genetics and Genomics**, [s. l.], v. 294, n. 5, p. 1211–1218, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01573-9>

DOU, Daolong; ZHOU, Jian-Min. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. **Cell host & microbe**, United States, v. 12, n. 4, p. 484–495, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.003>

DU FALL, Lauren A; SOLOMON, Peter S. The necrotrophic effector SnToxA induces the synthesis of a novel phytoalexin in wheat. **The New phytologist**, England, v. 200, n. 1, p. 185–200, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nph.12356>

EBBOLE, Daniel J. Magnaporthe as a model for understanding host-pathogen interactions. **Annual review of phytopathology**, United States, v. 45, p. 437–456, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094346>

EBERT, Malaika K *et al.* Identification and characterization of *Cercospora beticola* necrosis-inducing effector CbNip1. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 301–316, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.13026>

FANG, Anfei *et al.* A Novel Effector Gene SCRE2 Contributes to Full Virulence of *Ustilaginoidea virens* to Rice. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00845>

FARIS, Justin D *et al.* A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 30, p. 13544–13549, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1004090107>

FIGUEROA, Melania *et al.* Persistence of the Host-Selective Toxin Ptr ToxB in the Apoplast. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 28, n. 10, p. 1082–1090, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-15-0097-R>

FIORIN, Gabriel Lorencini *et al.* Suppression of Plant Immunity by Fungal Chitinase-like Effectors. **Current Biology**, [s. l.], v. 28, n. 18, p. 3023-3030.e5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.055>

FLOR, H H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 275–296, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>

FLOR, H H. The Complementary Genic Systems in Flax and Flax Rust**Joint contribution from the Field Crops Research Branch, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture and the North Dakota Agricultural Experiment Station. In: DEMEREC, M B T - Advances in Genetics (org.). [S. l.]: Academic Press, 1956. v. 8, p. 29–54. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60498-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60498-8)

FONES, Helen N *et al.* Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. **Nature Food**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 332–342, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0075-0>

FRIESEN, Timothy L; MEINHARDT, Steven W; FARIS, Justin D. The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, England, v. 51, n. 4, p. 681–692, 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03166.x>

FUDAL, I *et al.* Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of AvrLm6. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 20, n. 4, p. 459–470, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0459>

GAWEHNS, F *et al.* The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 27, n. 4, p. 336–348, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-13-0330-R>

GIERLICH, Angela *et al.* Heterologous Expression of the Avirulence Gene Product, NIP1, from the Barley Pathogen *Rhynchosporium secalis*. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 64–73, 1999. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/prep.1999.1098>

GOUT, Lilian *et al.* Lost in the middle of nowhere: the AvrLm1 avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. **Molecular microbiology**, England, v. 60, n. 1, p. 67–80, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05076.x>

GUO, Xinrui *et al.* Functional Identification of Novel Cell Death-inducing Effector Proteins from *Magnaporthe oryzae*. **Rice**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 59, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0312-z>

HAN, Jingluan *et al.* The Fungal Effector Avr-Pita Suppresses Innate Immunity by Increasing COX Activity in Rice Mitochondria. **Rice (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00453-4>

HAN, Yijuan *et al.* A *Magnaporthe* Chitinase Interacts with a Rice Jacalin-Related Lectin to Promote Host Colonization. **Plant physiology**, [s. l.], v. 179, n. 4, p. 1416–1430, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.18.01594>

HE, Qiguang *et al.* A novel chorismate mutase from *Erysiphe quercicola* performs dual functions of synthesizing amino acids and inhibiting plant salicylic acid synthesis. **Microbiological research**, Germany, v. 242, p. 126599, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126599>

HE, Qin *et al.* All Roads Lead to Susceptibility: The Many Modes of Action of Fungal and Oomycete Intracellular Effectors. **Plant communications**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 100050, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100050>

HEMETSBERGER, Christoph *et al.* The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. **New Phytologist**, [s. l.], v. 206, n. 3, p. 1116–1126, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.13304>

HOANG, Cuong V; BHASKAR, Chibbhi K; MA, Lay-Sun. A Novel Core Effector Vp1 Promotes Fungal Colonization and Virulence of *Ustilago maydis*. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 7, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7080589>

HOUTERMAN, Petra M *et al.* The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, England, v. 58, n. 6, p. 970–978, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x>

IRIEDA, Hiroki *et al.* Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 496–505, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1807297116>

JONES, Jonathan D G; DANGL, Jeffery L. The plant immune system. **Nature**, [s. l.], v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature05286>

JOOSTEN, Matthieu H A J; COIZINSEN, Ton J; DE WIT, Pierre J G M. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. **Nature**, [s. l.], v. 367, n. 6461, p. 384–386, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/367384a0>

KANG, S; SWEIGARD, J A; VALENT, B. The PWL host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 8, n. 6, p. 939–948, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/mpmi-8-0939>

KARKI, Sujit Jung *et al.* A small secreted protein from *Zymoseptoria tritici* interacts with a wheat E3 ubiquitin ligase to promote disease. **Journal of experimental botany**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 58

733–746, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa489>

KEMEN, Eric *et al.* A novel structural effector from rust fungi is capable of fibril formation. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, England, v. 75, n. 5, p. 767–780, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tpj.12237>

KIM, Seongbeom *et al.* Two nuclear effectors of the rice blast fungus modulate host immunity via transcriptional reprogramming. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 5845, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19624-w>

KOHLER, Amanda C *et al.* Structural Analysis of an Avr4 Effector Ortholog Offers Insight into Chitin Binding and Recognition by the Cf-4 Receptor. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1945–1965, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00893>

KOMBRINK, Anja *et al.* *Verticillium dahliae* LysM effectors differentially contribute to virulence on plant hosts. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 596–608, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12520>

LANVER, Daniel *et al.* *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. **Nature reviews. Microbiology**, England, v. 15, n. 7, p. 409–421, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.33>

LAUGÉ, R *et al.* Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, England, v. 23, n. 6, p. 735–745, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00843.x>

LAUGÉ, R *et al.* Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 15, p. 9014–9018, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9014>

LAUGÉ, Richard *et al.* The In Planta-Produced Extracellular Proteins ECP1 and ECP2 of *Cladosporium fulvum* Are Virulence Factors. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 725–734, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.6.725>

LEE, Wing-Sham *et al.* *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 27, n. 3, p. 236–243, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0201-R>

LEMARIÉ, Séverine *et al.* Both the Jasmonic Acid and the Salicylic Acid Pathways Contribute to Resistance to the Biotrophic Clubroot Agent *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis*. **Plant & cell physiology**, Japan, v. 56, n. 11, p. 2158–2168, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv127>

LI, Shuai *et al.* **UVI_02019870, a Puptive Effector from *Ustilaginoidea virens*, Interacts with a Chloroplastic-Like Protein OsCPL1.** [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.32604/phyton.2020.010671>

LI, Wei *et al.* The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AvrPiz-t encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene Piz-t. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 22, n. 4, p. 411–420, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0411>

LI, Xiao *et al.* A putative effector of the rubber-tree powdery mildew fungus has elicitor activity that can trigger plant immunity. **Planta**, [s. l.], v. 255, n. 2, p. 33, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03818-7>

LI, Ying *et al.* *Magnaporthe oryzae* Auxiliary Activity Protein MoAa91 Functions as Chitin-Binding Protein To Induce Appressorium Formation on Artificial Inductive Surfaces and Suppress Plant Immunity. **mBio**, [s. l.], v. 11, 2020.

LINNING, R *et al.* Marker-based cloning of the region containing the UhAvr1 avirulence gene from the basidiomycete barley pathogen *Ustilago hordei*. **Genetics**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 99–111, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1534/genetics.166.1.99>

LIU, Xinyu *et al.* A self-balancing circuit centered on MoOsm1 kinase governs adaptive responses to host-derived ROS in *Magnaporthe oryzae*. **eLife**, [s. l.], v. 9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.61605>

LIU, Xinyu; ZHANG, Zhengguang. A double-edged sword: reactive oxygen species (ROS) during the rice blast fungus and host interaction. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. n/a, n. n/a, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/febs.16171>

LIU, Zhaojun *et al.* SnTox1, a *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector, is a dual-function protein that facilitates infection while protecting from wheat-produced chitinases. **The New phytologist**, England, v. 211, n. 3, p. 1052–1064, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nph.13959>

LO PRESTI, Libera *et al.* Fungal effectors and plant susceptibility. **Annual review of plant biology**, United States, v. 66, p. 513–545, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-aplant-043014-114623>

LYU, Xueliang *et al.* A Small Secreted Virulence-Related Protein Is Essential for the Necrotrophic Interactions of *Sclerotinia sclerotiorum* with Its Host Plants. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. e1005435, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005435>

MA, Lisong *et al.* The AVR2-SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. **The New phytologist**, England, v. 208, n. 2, p. 507–518, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nph.13455>

MARSHALL, Rosalind *et al.* Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat . **Plant Physiology**, [s. l.], v. 156, n. 2, p. 756–769, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.111.176347>

MCDONALD, Megan C *et al.* The discovery of the virulence gene ToxA in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana*. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 432–439, 2018. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12535](https://doi.org/10.1111/mpp.12535)

MENTLAK, Thomas A *et al.* Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by *Magnaporthe oryzae* Is Necessary for Rice Blast Disease . **The Plant Cell**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 322–335, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092957>

METHLEY, Abigail M *et al.* PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and

sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. **BMC health services research**, [s. l.], v. 14, p. 579, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12913-014-0579-0>

MOGGA, Valerie *et al.* *Magnaporthe oryzae* effectors MoHEG13 and MoHEG16 interfere with host infection and MoHEG13 counteracts cell death caused by Magnaporthe-NLPs in tobacco. **Plant cell reports**, Germany, v. 35, n. 5, p. 1169–1185, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1943-9>

MONTENEGRO ALONSO, Ana Priscilla *et al.* UhAVR1, an HR-Triggering Avirulence Effector of *Ustilago hordei*, Is Secreted via the ER-Golgi Pathway, Localizes to the Cytosol of Barley Cells during in Planta-Expression, and Contributes to Virulence Early in Infection. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 6, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof6030178>

MOSQUERA, Gloria *et al.* Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as Biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. **The Plant cell**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 1273–1290, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055228>

MUKA, Taulant *et al.* A 24-step guide on how to design, conduct, and successfully publish a systematic review and meta-analysis in medical research. **European journal of epidemiology**, Netherlands, v. 35, n. 1, p. 49–60, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10654-019-00576-5>

NAVATHE, Sudhir *et al.* ToxA–Tsn1 Interaction for Spot Blotch Susceptibility in Indian Wheat: An Example of Inverse Gene-for-Gene Relationship. **Plant Disease**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 71–81, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1066-RE>

NIE, Hai-Zhen *et al.* The Secreted Protein MoHrip1 Is Necessary for the Virulence of *Magnaporthe oryzae*. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20071643>

ORBACH, M J *et al.* A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. **The Plant cell**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 2019–2032, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2019>

P., Métraux J *et al.* Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in

Cucumber. **Science**, [s. l.], v. 250, n. 4983, p. 1004–1006, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1004>

PAGE, Matthew J *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **BMJ (Clinical research ed.)**, [s. l.], v. 372, p. n71, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>

PARK, Chan-Ho *et al.* The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. **The Plant cell**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 4748–4762, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105429>

PARLANGE, Francis *et al.* *Leptosphaeria maculans* avirulence gene AvrLm4-7 confers a dual recognition specificity by the Rlm4 and Rlm7 resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino acid change. **Molecular microbiology**, England, v. 71, n. 4, p. 851–863, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06547.x>

PENNINGTON, Helen G *et al.* The fungal ribonuclease-like effector protein CSEP0064/BEC1054 represses plant immunity and interferes with degradation of host ribosomal RNA. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. e1007620, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007620>

PLISSONNEAU, Clémence *et al.* A game of hide and seek between avirulence genes AvrLm4-7 and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans*. **The New phytologist**, England, v. 209, n. 4, p. 1613–1624, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nph.13736>

QI, Mingsheng *et al.* A Small Cysteine-Rich Protein from the Asian Soybean Rust Fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, Suppresses Plant Immunity. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. e1005827–e1005827, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005827>

QI, Tuo *et al.* Stripe Rust Effector PstGSRE1 Disrupts Nuclear Localization of ROS-Promoting Transcription Factor TaLOL2 to Defeat ROS-Induced Defense in Wheat. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1624–1638, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.09.010>

RAMACHANDRAN, Sowmya R *et al.* Effectors from Wheat Rust Fungi Suppress Multiple Plant Defense Responses. **Phytopathology**, United States, v. 107, n. 1, p. 75–83, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0083-R>

RAY, Soham *et al.* Analysis of *Magnaporthe oryzae* Genome Reveals a Fungal Effector, Which Is Able to Induce Resistance Response in Transgenic Rice Line Containing Resistance Gene, Pi54. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 7, p. 1140, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01140>

REDKAR, Amey *et al.* A Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis* Guides Maize Leaf Cells to Form Tumors. **The Plant cell**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1332–1351, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131086>

REP, Martijn *et al.* 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**, England, v. 53, n. 5, p. 1373–1383, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x>

RIBOT, Cécile *et al.* The *Magnaporthe oryzae* effector AVR1-CO39 is translocated into rice cells independently of a fungal-derived machinery. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, England, v. 74, n. 1, p. 1–12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tpj.12099>

RIDOUT, Christopher J *et al.* Multiple Avirulence Paralogues in Cereal Powdery Mildew Fungi May Contribute to Parasite Fitness and Defeat of Plant Resistance. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 2402–2414, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043307>

ROHE, M *et al.* The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrs1 resistance genotype. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 14, n. 17, p. 4168–4177, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00090.x>

SAITO, Hiromasa *et al.* Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. **PLoS pathogens**,

[s. l.], v. 8, n. 5, p. e1002711, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002711>

SÁNCHEZ-VALLET, Andrea *et al.* A secreted LysM effector protects fungal hyphae through chitin-dependent homodimer polymerization. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. e1008652, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008652>

SEGAL, Lauren M; WILSON, Richard A. Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 110, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.12.003>

SEITNER, Denise *et al.* The core effector Cce1 is required for early infection of maize by *Ustilago maydis*. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 2277–2287, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12698>

SERRANO, Irene; AUDRAN, Corinne; RIVAS, Susana. Chloroplasts at work during plant innate immunity. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 67, n. 13, p. 3845–3854, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erw088>

SHAO, Dandan *et al.* Effectors of Plant Necrotrophic Fungi. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, p. 995, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.687713>

SHARPEE, William *et al.* Identification and characterization of suppressors of plant cell death (SPD) effectors from *Magnaporthe oryzae*. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 850–863, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12449>

SHI, Gongjun *et al.* The Wheat Snn7 Gene Confers Susceptibility on Recognition of the *Parastagonospora nodorum* Necrotrophic Effector SnTox7. **The plant genome**, United States, v. 8, n. 2, p. eplantgenome2015.02.0007, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.02.0007>

SINGH, Raksha *et al.* *Magnaporthe oryzae* Effector AVR-Pii Helps to Establish Compatibility by Inhibition of the Rice NADP-Malic Enzyme Resulting in Disruption of Oxidative Burst and Host Innate Immunity. **Molecules and cells**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 426–438, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0094>

SNELDERS, Nick C *et al.* Microbiome manipulation by a soil-borne fungal plant pathogen using effector proteins. **Nature plants**, England, v. 6, n. 11, p. 1365–1374, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00799-5>

SOARES, Julianna M S *et al.* **Genetic Improvement for Resistance to Black Sigatoka in Bananas: A Systematic Review.** [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.657916>

SONAH, Humira; DESHMUKH, Rupesh K; BÉLANGER, Richard R. Computational prediction of effector proteins in fungi: opportunities and challenges. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 7, p. 126, 2016.

SORNKOM, Worawan *et al.* Fluorescent reporter analysis revealed the timing and localization of AVR-Pia expression, an avirulence effector of *Magnaporthe oryzae*. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1138–1149, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12468>

STIRNBERG, Alexandra; DJAMEI, Armin. Characterization of ApB73, a virulence factor important for colonization of Zea mays by the smut *Ustilago maydis*. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 1467–1479, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12442>

TANAKA, Shigeyuki *et al.* A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. **eLife**, [s. l.], v. 3, p. e01355–e01355, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.01355>

TANAKA, Shigeyuki *et al.* The functionally conserved effector Sta1 is a fungal cell wall protein required for virulence in *Ustilago maydis*. **New Phytologist**, [s. l.], v. 227, n. 1, p. 185–199, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.16508>

TANAKA, Shigeyuki; KAHMANN, Regine. Cell wall–associated effectors of plant-colonizing fungi. **Mycologia**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 247–260, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1831293>

THOMMA, Bart P H J; NÜRNBERGER, Thorsten; JOOSTEN, Matthieu H A J. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 4–15, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602>

TORRES, Miguel Angel. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 138, n. 4, p. 414–429, 2010. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x>

VAN DEN BURG, Harrold A *et al.* *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 19, n. 12, p. 1420–1430, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1420>

VAN DER DOES, H Charlotte *et al.* Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. **Fungal genetics and biology : FG & B**, United States, v. 45, n. 9, p. 1257–1264, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.06.002>

VAN DER HOORN, Renier A L. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annual review of plant biology**, United States, v. 59, p. 191–223, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835>

VAN DER HOORN, Renier A L; KAMOUN, Sophien. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 2009–2017, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>

VAN ESSE, H Peter *et al.* The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. **The Plant cell**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1948–1963, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059394>

VAN KAN, J A; VAN DEN ACKERVEKEN, G F; DE WIT, P J. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 4, n. 1, p. 52–59, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/mpmi-4-052>

WAN, Li *et al.* Structural and functional insights into the modulation of the activity of a flax cytokinin oxidase by flax rust effector AvrL567-A. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 211–222, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12749>

WANG, Ruyi *et al.* Immunity to Rice Blast Disease by Suppression of Effector-Triggered

Necrosis. **Current biology : CB**, England, v. 26, n. 18, p. 2399–2411, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.072>

WANG, Sheng *et al.* *Verticillium dahliae* chromatin remodeling facilitates the DNA damage repair in response to plant ROS stress. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. e1008481, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008481>

WANG, Yiming *et al.* *Magnaporthe oryzae*-Secreted Protein MSP1 Induces Cell Death and Elicits Defense Responses in Rice. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 29, n. 4, p. 299–312, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-15-0266-R>

WANG, Yingling *et al.* A putative effector UvHrip1 inhibits BAX-triggered cell death in *Nicotiana benthamiana*, and infection of *Ustilaginoidea virens* suppresses defense-related genes expression. **PeerJ**, [s. l.], v. 8, p. e9354–e9354, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.9354>

WINTERBERG, Britta *et al.* The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves. **BMC plant biology**, [s. l.], v. 14, p. 215, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0215-5>

XU, Qiang *et al.* An effector protein of the wheat stripe rust fungus targets chloroplasts and suppresses chloroplast function. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 5571, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13487-6>

YANG, Chao *et al.* Activation of ethylene signaling pathways enhances disease resistance by regulating ROS and phytoalexin production in rice. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, England, v. 89, n. 2, p. 338–353, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tpj.13388>

YANG, Jing *et al.* The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 10, p. 1349, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349>

YIN, Chuntao *et al.* A novel fungal effector from *Puccinia graminis* suppressing RNA silencing and plant defense responses. **The New phytologist**, England, v. 222, n. 3, p. 1561–1572, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nph.15676>

YOSHIDA, Kentaro *et al.* Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. **The Plant cell**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 1573–1591, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066324>

ZHANG, Mian *et al.* Hce2 domain-containing effectors contribute to the full virulence of *Valsa mali* in a redundant manner. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 843–856, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12796>

ZHANG, Yi *et al.* The Highly Conserved Barley Powdery Mildew Effector BEC1019 Confers Susceptibility to Biotrophic and Necrotrophic Pathogens in Wheat. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20184376>

CAPÍTULO II

Uma proteína efetora de *Moniliophthora roreri* induz morte celular e afeta a produção de EROs em plantas

Taís Araújo Santos, Ariana Silva Santos, Carlos Priminho Pirovani

RESUMO

A Monilíase do cacaueiro causada pelo basidiomycota *Moniliophthora roreri*, é uma doença altamente invasiva que causa baixos rendimentos e perdas totais de produção. As moléculas efetoras liberadas por fitopatógenos podem interferir na defesa da planta através de uma variedade de mecanismos. Devido a isto, estudos de caracterização de efetores vêm sendo frequentemente realizados. Proteínas candidatas a efetoras têm sido previstas no genoma de *M. roreri*, no entanto, os estudos funcionais ainda são escassos. Diante disto, o objetivo foi caracterizar funcionalmente uma proteína candidata a efetora de *M. roreri* homóloga à BASIDINA, caracterizada em *M. perniciosa*. Esta proteína demonstrou ser um potencial efetor ao afetar a fisiologia das células hospedeiras. Os resultados das análises da sequência proteica demonstraram que MOROR_12486 possui características comuns a outras proteínas efetoras descritas na literatura, como presença de peptídeo sinal, baixa massa molecular, ausência de domínios conservados e localização extracelular. A estirpe *Rosetta* (DE3) de *Escherichia coli* foi transformada com o vetor pET28a contendo uma ORF otimizada para expressão da rMOROR_12486. Uma proteína de aproximadamente 20 kDa foi expressa mediante adição de IPTG, o que corresponde à massa molecular estimada para a proteína rMOROR_12486 com a His-Tag derivada do vetor. A identidade dessa proteína foi confirmada por espectrometria de massas. Dessa forma, a proteína recombinante marcada com His₆ foi purificada por cromatografia de afinidade a partir da fração insolúvel do extrato de *E. coli*. Os espectros de dicroísmo circular demonstraram que rMOROR_12486 não perde a conformação quando é tratada a 95 °C, indicando que se trata de uma proteína termoestável. Além disso, rMOROR_12486 desencadeia morte celular e atua elicitando respostas de defesa ao induzir o acúmulo de H₂O₂ em *Solanum lycopersicum*, indicativo de uma resposta de defesa hipersensível, sugerindo seu reconhecimento por receptores imunes em plantas não hospedeiras. Os resultados demonstram que rMOROR_12486 é o homólogo da BASIDINA, de forma semelhante, induziu o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e morte celular nos tecidos vegetais do tomateiro. Essas proteínas podem representar novos efetores com conservação funcional no filo basidiomycota. Sendo assim, os resultados descritos aqui contribuem para estudos mais detalhados em um futuro próximo.

Palavras-chave: Efetor, fitopatógeno, *Frosty Pod Rot*, *Theobroma cacao*

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que as interações entre fungos patogênicos e plantas, são benéficas apenas para o fungo. As plantas possuem várias estratégias de defesa para impedir o desenvolvimento desses patógenos, como a imunidade desencadeada por PAMP (PTI) que é acionada após o reconhecimento de moléculas fúngicas, tais como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões localizados na membrana plasmática (PRRs) (BIGEARD et al., 2015). Os fitopatógenos podem empregar um arsenal de efetores para aumentarem sua capacidade de estabelecer a infecção. Os efetores são moléculas que alteram a estrutura e função da célula hospedeira, contribuindo para a virulência do patógeno ou desencadeando respostas de defesa ao ser reconhecidos pelo sistema imune das plantas, agindo como um fator de avirulência (SELIN et al., 2016). Neste cenário, a imunidade desencadeada por efetores (ETI), entra em ação, sendo considerada um sistema de defesa mais específico e indispensável em plantas, ao gerar uma resposta hipersensível (HR) geralmente com morte celular no local da infecção (DODDS; RATHJEN, 2010).

A resposta de defesa hipersensível é encontrada em todas as plantas superiores e está associada à resistência, embora, em situações específicas, possa ter outras consequências, como suscetibilidade a patógenos (BALINT-KURTI, 2019). A PTI e ETI podem ser distintas, temporalmente e espacialmente, mas estão intimamente relacionadas com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e morte celular programada (PCD) (GECHEV; HILLE, 2005; KOU; QIU; TAO, 2019; TORRES; JONES; DANGL, 2006).

Moniliophthora é um dos gêneros economicamente mais importantes entre os fungos fitopatogênicos devido à capacidade de causar sérios danos nos seus hospedeiros. A Monilíase do cacaueiro causada pelo basidiomycota *Moniliophthora roreri*, é uma doença altamente invasiva que causa baixos rendimentos e até perda total de produção (JOHNSON et al., 2017; PHILLIPS-MORA et al., 2015). O patógeno progride por estágios biotrófico e necrotrófico durante a infecção em *Theobroma* ssp. e *Herrania* ssp. (BAILEY et al., 2018).

Notavelmente este patógeno precisa utilizar diferentes estratégias para adquirir nutrientes nos tecidos vegetais. Primeiramente, desativa ou suspende o sistema imunológico do hospedeiro para estabelecer uma relação parasitária com as células vivas, e posteriormente, induz necrose no

tecido vegetal caracterizado pelo último estágio da doença. Para estabelecer essa relação o patógeno necessita empregar diferentes moléculas nos distintos estágios da infecção, dentre esses, os efetores.

Atualmente têm sido visto um grande progresso no conhecimento das funções efetoras, demonstrando como diferentes efetores fúngicos manipulam a imunidade da planta de diversas maneiras (HAN *et al.*, 2021; HE *et al.*, 2021; LI, X. *et al.*, 2022; YING *et al.*, 2022). Alguns contribuem para a patogenicidade do patógeno induzindo a morte celular, enquanto outros efetores podem suprimir esse mecanismo que é desencadeado principalmente pelo reconhecimento do sistema imune do hospedeiro para promover a virulência (EBERT *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2021).

O filo basidiomycota possui diversas espécies de fungos fitopatogênicas que vêm sendo estudados com relação aos mecanismos de ação de seus efetores no estabelecimento das doenças. Alguns efetores desse grupo foram caracterizados funcionalmente, a exemplo dos efetores do hemibiotrófico *Rhizoctonia solani*. A proteína efetora RsLysM de *R. solani* é capaz de suprimir a EROS induzidas pela quitina (DÖLFORS *et al.*, 2019). Nesse caso, o fungo depende da perturbação da imunidade desencadeada pela quitina para estabelecer uma infecção bem-sucedida. Em outro estudo foi demonstrado que efetor AGLIP1 em *R. solani* desencadeia a morte celular em plantas desempenhando um papel significativo na virulência do patógeno (LI, S. *et al.*, 2019). Além disso, esse patógeno também emprega o efetor RsRlpA, um inibidor de protease que promove a virulência através da supressão da resposta hipersensível (CHAROVA *et al.*, 2020).

Nesse mesmo contexto, é possível que efetores também sejam empregados em diferentes estágios da Monilíase do cacaueiro. Porém, estudos de atividade efetora ainda são escassos para o *M. roreri*, apesar de várias proteínas candidatas a efetoras terem sido previstas no seu genoma (BARBOSA *et al.*, 2018).

O patossistema *Moniliophthora* - *Theobroma cacao* L. estabelece uma interação hemibiotrófica que precisa ser estudada. Aqui, nos concentramos em um candidato a efetor de *M. roreri* homólogo à proteína efetora BASIDINA caracterizada em *M. perniciosa* (FARIAS, 2020). Esta proteína de *M. perniciosa* possui grande potencial em interferir no sistema imune ao induzir morte celular, acúmulo de EROS e danos nas membranas foliares. Dessa forma, hipotetizamos que seu homólogo em *M. roreri* também desempenhe um papel importante elicitando respostas da

planta. Portanto, este estudo traz a caracterização de um efetor que pode ser conservado entre os fungos *Moniliophthora*, fornecendo novos insights sobre as estratégias comuns empregadas por membros deste gênero.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Seleção do candidato a efetor

Proteínas candidatas a efetoras foram preditas a partir do sequenciamento genômico de cinco isolados de subpopulações de *M. perniciosa* e *M. roreri* (BARBOSA *et al.*, 2018). Uma dessas proteínas, denominada como BASIDINA, foi caracterizada pelo nosso grupo demonstrando ser um potencial efetor de *M. perniciosa* (FARIAS, 2020). A sequência da BASIDINA foi utilizada no BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para procurar homólogos em outras espécies de fungos patogênicos de plantas. A análise da sequência indicou que BASIDINA compartilha alta similaridade (91%) com a proteína hipotética Moror_12486 (número de acesso GenBank: ESK95757.1) de *M. roreri*, que foi selecionada para este estudo, pois presumimos que a conservação de sequências em diferentes espécies patogênicas de plantas pode indicar um efetor conservado.

2.2. Análises *in silico*

A sequência de aminoácidos da proteína Moror_12486 foi utilizada para prever o peptídeo sinal de secreção pelo SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>). TMHMM 2.0 foi utilizado para prever hélices transmembranares (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). O programa DeepLoc-1.0 foi usado para fazer predições a respeito da localização subcelular da proteína (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-1.0>). O servidor CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>) previu a estrutura secundária da proteína. Foi averiguado se a proteína possui regiões desordenadas através do PONDR (<http://www.pondr.com>). A análise de domínios conservados foi realizada através do programa Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) e InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>). Para a predição de propriedades físico-químicas da estrutura primária da proteína foi utilizado a ferramenta Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). A sequência de aminoácidos

de Moror_12486 foi utilizada para prever as características efetoras e localização usando EffectorP 3.0 (SPERSCHNEIDER; DODDS, 2021).

2.3. Transformação e expressão da proteína recombinante em *Escherichia coli*

O vetor pET28a(+) (BIOMATIK) contendo a ORF sintética de Moror_12486 (pET28a-6xHis-Moror_12486), nos sítios de restrição *NdeI* e *XhoI*, foi utilizado para transformação e expressão em *E. coli*. O plasmídeo recombinante foi inserido na estirpe *Rosetta (DE3)* por choque térmico, posteriormente as células foram inoculadas em placas com Luria-Bertani contendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina e 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clorafenicol, e depois incubadas a 37°C.

As células contendo o plasmídeo recombinante foram inoculadas em 5 mL e depois 400 mL de meio LB suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina e 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clorafenicol, onde foram incubadas a 37 °C e 180 rpm, até a densidade óptica a 600 nm (OD_{600nm}) de 0,8 fosse atingida. As células foram então induzidas mediante adição de IPTG (isopropil β -d-tiogalactosídeo) na concentração final de 0,4 nmol L⁻¹ e em seguida incubadas a 18 °C e 180 rpm por 14h para indução da proteína recombinante. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm 4 °C por 10 minutos.

O sedimento celular resultante foi ressuspensos em 10 mL de tampão lise (Tris HCL pH 7,4 contendo 100 mg mL⁻¹ de lisozima) e incubado a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, a suspensão de células foi submetida a sonicação (pulso 8s ON e 20s OFF, amplitude de 70%) e centrifugada a 14.000 rpm a 4 °C por 20 min. Os pellets contendo os corpos de inclusão (fração insolúvel) e o sobrenadante com proteína solúvel foram recolhidos e analisados por SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio), sendo coradas com azul de comassie coloidal 0,08% (NEUHOFF *et al.*, 1988).

2.4. Espectrometria de massas

A proteína foi submetida a análise de espectrometria de massas para confirmação da sua identidade. Resumidamente, após à eletroforese (SDS-PAGE), a banda de interesse correspondente ao peso molecular da proteína foi incisada do gel. O fragmento de gel foi descorado com solução contendo acetonitrila para a remoção do corante. A tripsina foi adicionada para digestão, mantendo

o material a 37°C por 16 h, para posterior análise no espectrômetro de massas (6545 Series Q-TOF 1290 LC/MS Systems Agilent).

2.5. Purificação da proteína recombinante

Após as células serem lisadas por sonicação e centrifugadas. O pellet foi ressuspensos em 10 mL de tampão (6 mol L⁻¹ de ureia e 10 mmol L⁻¹ de Tris HCL pH 7,4) e filtrado através de membrana de 0,45 µm. A proteína recombinante foi purificada, por cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel His Trap FF crude (GeHealthcare), sendo eluída com tampão de eluição variando de 50 a 500 mmol L⁻¹ de imidazol. A pureza e homogeneidade das frações foi verificada por SDS-PAGE.

A proteína desnaturada foi dialisada contra tampão Tris HCL 10 mmol L⁻¹ pH 7,4 com concentrações decrescentes de ureia de forma a reduzir a sua molaridade até zero para o correto redobramento. E por fim, a proteína foi dialisada duas vezes contra o tampão Tris 10 mmol L⁻¹. A concentração de proteína foi determinada pela razão entre a absorbância a 280 nm e o coeficiente de extinção calculado pela ferramenta ProtParam.

2.6. Espectroscopia de dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos com um spectropolarímetro Jasco J-815. As amostras foram dialisadas em Tris 5 mmol L⁻¹ antes da coleta de dados. Os dados foram coletados entre os comprimentos de onda de 190-240 nm, em intervalos de 1,0 nm, a 25 e 95 °C, usando uma cubeta de 1,00 mm. Cada espectro foi resultado da média de seis repetições consecutivas de varreduras.

2.7. Ensaio de morte celular

O ensaio foi realizado usando a proteína recombinante expressa de forma heteróloga para testar a atividade de morte celular em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Foram utilizadas um total de seis plantas de tomate com oito semanas após plantio e mantidas em casa de vegetação na Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil. Folhas secundárias de três plantas foram borrifadas com 500 uL da proteína purificada e outras folhas secundárias de três plantas

foram borrifadas com 500 uL do tampão da última diálise. As folhas foram avaliadas e fotografadas às 6, 12, 24 horas até o quinto dia após o tratamento.

2.8. Detecção de H₂O₂

Para detectar a presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado o método de coloração de 3-3' diaminobenzidina (DAB) (THORDAL-CHRISTENSEN *et al.*, 1997). Um total de quatro plantas de tomates em condições de casa de vegetação foram selecionadas para a detecção de H₂O₂. Dessas plantas, duas foram previamente borrifadas com 500 uL da proteína recombinante, e duas borrifadas com os controles, tampão Tris HCL e água. Após 24 horas as folhas tratadas foram destacadas em discos de 1 cm de diâmetro e corados com 1 mg mL⁻¹ de DAB dissolvido em água destilada acidificada com HCL (pH 3,8). Posteriormente, os discos foliares foram submetidos a vácuo por 30 min e em seguida foram colocados na mesma solução por 24 h no escuro. Os tecidos foliares foram fervidos em etanol 96% e 50%, respectivamente durante 30 min para remover os traços de DAB e clorofila. Os resultados foram observados e fotografados através de estereomicroscópio.

3. RESULTADOS

3.1. As análises *in silico* prever a proteína MOROR_12486 uma candidata a efetora

Os resultados demonstraram que a proteína Moror_12486 possui características preditas comuns a outras proteínas efetoras descritas na literatura, como presença de peptídeo sinal, baixa massa molecular (162 aminoácidos) (17,09 kDa), ausência de domínios conservados e localização extracelular (90%). A proteína foi predita com probabilidade de ser efetora com localização subcelular apoplástica. A estrutura secundária da proteína apresentou 46% de folhas β e 24% α -hélice. Além disso, a proteína estudada possui duas regiões de desordem na sua sequência, com uma porcentagem de 4,32 % de desordem, conforme predição. Dessa forma, selecionamos o candidato efetor Moror_12486 para caracterização funcional.

3.2. Expressão e purificação de rMOROR_12486

A construção com a ORF Moror_12486 clonada em pET-28a foi inserida com sucesso na estirpe *Rosetta* (DE3) de *E. coli*. Uma proteína de aproximadamente 20 kDa foi expressa mediante

adição de IPTG, o que corresponde ao tamanho da proteína rMOROR_12486 (Proteína MOROR_12486 recombinante) com adição de seis histidinas (Figura 1). A identidade da proteína, após digestão com tripsina das bandas do gel correspondentes a 20 kDa, foi confirmada por espectrometria de massas.

Nossas tentativas de purificar rMOROR_12486 na fração solúvel para facilitar a caracterização funcional, falharam repetidamente, devido ao baixo acúmulo da proteína nessa fração. Para obter a proteína rMOROR_12486 em maiores rendimentos, corpos de inclusão foram isolados de células de *E. coli* e solubilizados utilizando ureia. Dessa forma a proteína recombinante com cauda de His₆ foi purificada por cromatografia de afinidade a partir da fração insolúvel do extrato bacteriano. A análise em SDS-PAGE revelou uma única banda de 20 kDa correspondente à rMOROR_12486 purificada (Figura 2). Em seguida, a proteína foi redobrada por diálise, e o seu perfil e funcionalidade foi confirmada através de análises de CD e testes funcionais, respectivamente.

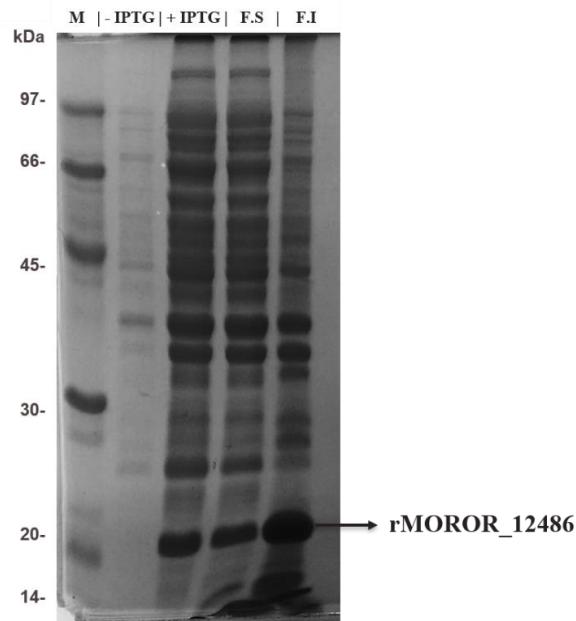


Figura 1. Perfil da proteína rMOROR_12486 em SDS-PAGE 12,5% corado com coomassie blue. M corresponde ao padrão de massa molecular em kDa; - IPTG, lisado bacteriano antes da indução da proteína; +IPTG, lisado bacteriano após indução da proteína; FS, Fração solúvel; FI, fração insolúvel; A seta indica as bandas de proteínas de aproximadamente 20 kDa correspondente a

proteína rMOROR_12486 contendo a cauda de histidina. A identidade da proteína das bandas do gel correspondentes a 20kDa foi confirmada por espectrometria de massas.

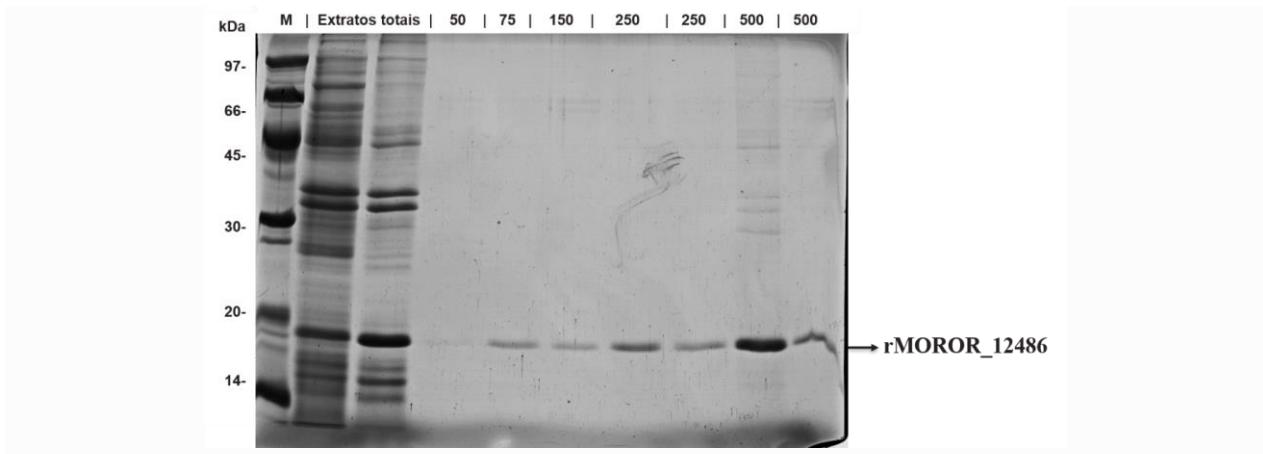


Figura 2. Perfil de frações de purificação da proteína rMOROR_12486 em SDS-PAGE 12,5% corado com coomassie blue. M corresponde ao padrão de massa molecular em kDa; Extratos totais corresponde ao extrato total bacteriano antes da purificação. Após a passagem do extrato bacteriano pela coluna de níquel, a proteína foi eluida em um gradiente de imidazol que variou de 50 a 500 mmol L⁻¹. A seta indica uma banda evidenciando a purificação da proteína rMOROR_12486.

3.3. rMOROR_12486 induz morte celular em plantas de tomate

Plantas de tomate foram empregadas nos ensaios de morte celular. Um volume de 500 µL da proteína rMOROR_12486 (4,1 µmol L⁻¹ e 5,3 µmol L⁻¹) foi borrifada na folha. A atividade da proteína foi determinada através da observação dos sintomas no local da aplicação. A planta borrifada com a rMOROR_12486 demonstrou mudanças macroscópicas, como murcha foliar, necrose e secagem total dos folíolos após três dias. A planta controle borrifada com o tampão Tris HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,4, não apresentou sintomas (Figura 3).

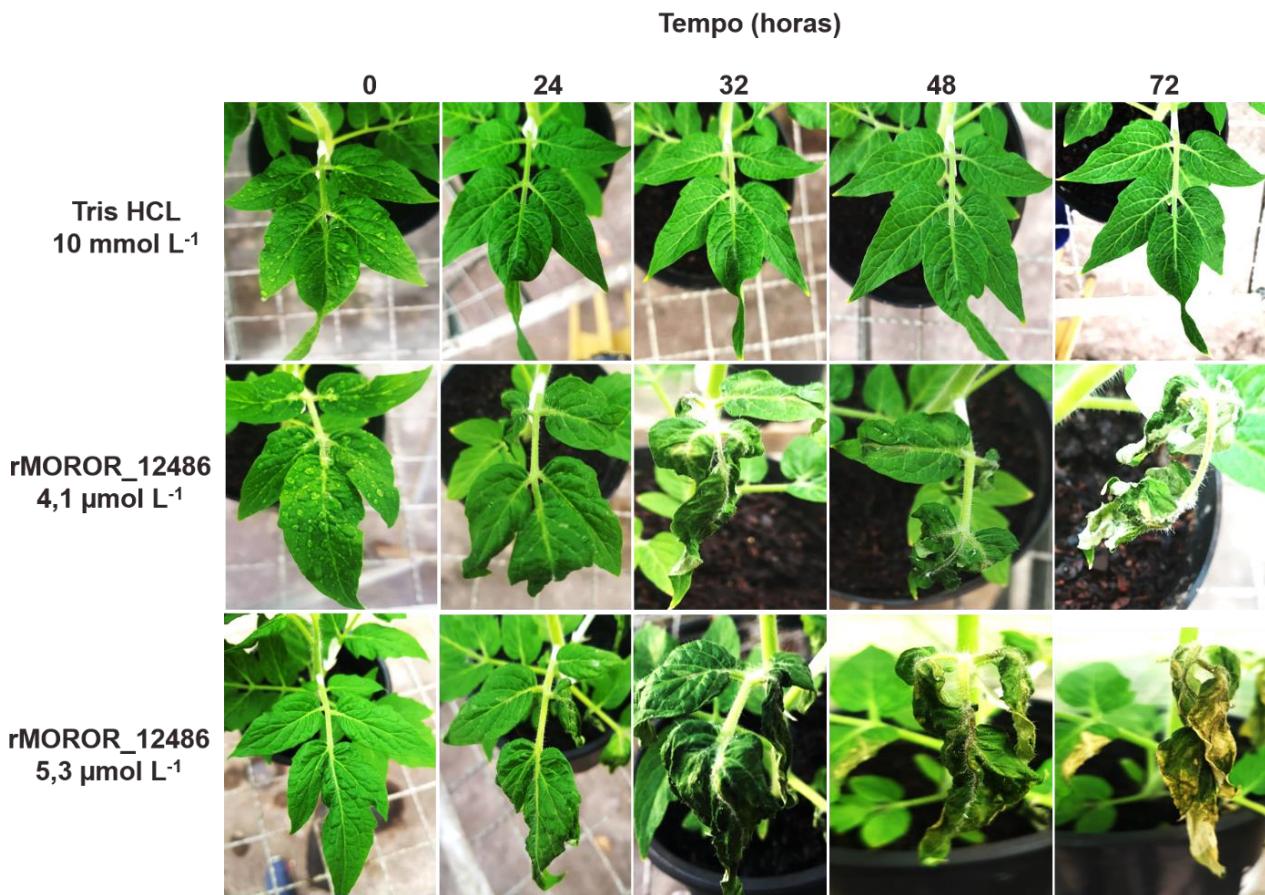


Figura 3. O candidato a efetor de *M. roreri* induz morte celular em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum*). As folhas foram borrifadas com a proteína rMOROR_12486 purificada produzida por expressão heteróloga em *E. coli* nos tempos de 0, 24, 32 48 e 72 horas. Após 24 h é possível observar o aparecimento evidente de murcha foliar e nos demais tempos, necrose e secagem dos folíolos. O controle negativo utilizado foi o tampão da última dialise (Tris HCL mmol L⁻¹).

3.4. O acúmulo de H₂O₂ é aumentado na presença de rMOROR_12486

A produção de H₂O₂ foi monitorada por coloração com DAB. As plantas de tomate foram tratadas com a proteína rMOROR_12486 purificada, com água e tampão Tris HCL, e depois submetidas ao DAB e água como controle negativo. A aparência da coloração marrom revela a polimerização do DAB impulsionada pelo H₂O₂. Em comparação com o controle foi possível observar através da coloração que a proteína rMOROR_12486 induziu o acúmulo de H₂O₂ no tecido vegetal, claramente observados no estereomicroscópio (Figura 4).

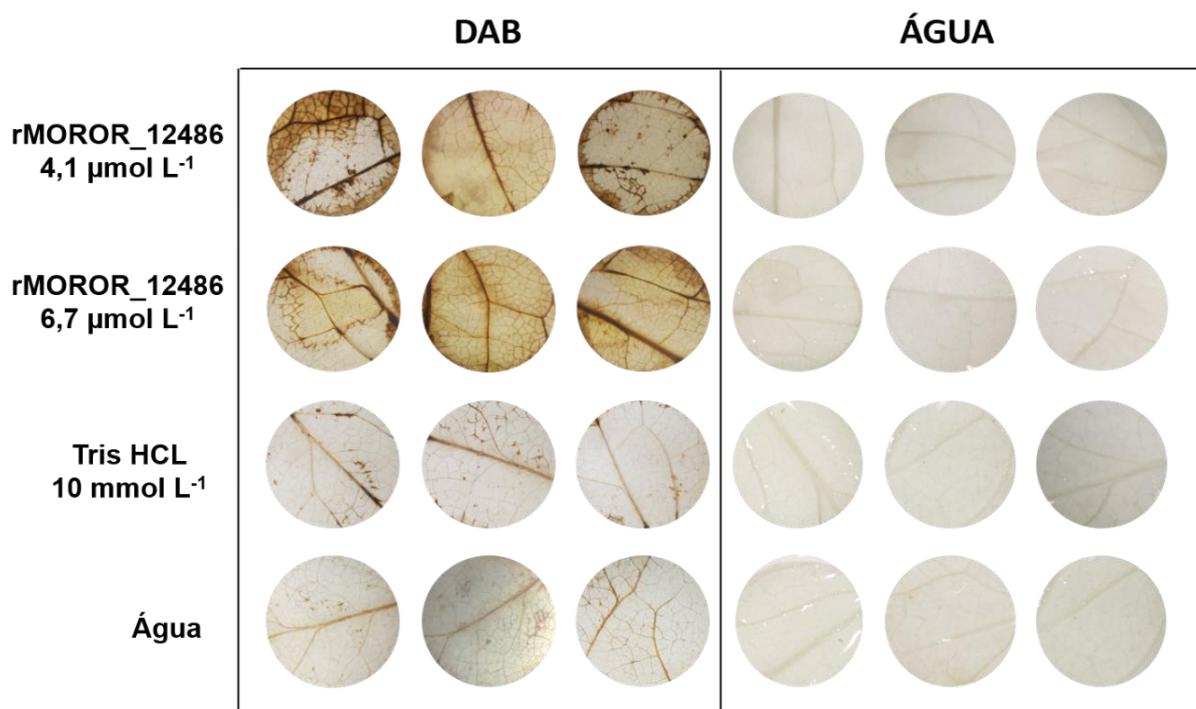


Figura 4. Acúmulo de H_2O_2 em folhas de tomate. Na sequência de cima para baixo da figura temos os seguintes tratamentos: folhas tratadas com rMOROR_12486; folhas tratadas com tampão Tris HCL 10 mmol L^{-1} e folhas tratadas com água. Os tratamentos foram submetidos ao DAB (lado esquerdo da figura) e água destilada (lado direito da figura). Os tecidos vegetais tratados com rMOROR_12486 destaca-se pelo acúmulo de H_2O_2 , o que não acontece nas folhas tratadas com tampão e água, respectivamente.

3.5. Análise de espectroscopia de CD da estrutura secundária de rMOROR_12486

Analisamos a proteína purificada utilizando espectroscopia de CD para verificar a estrutura de rMOROR_12486. Os resultados demonstram a presença de um pico positivo na absorbância de 194 e um negativo de 218 nm. A estimativa do conteúdo de α -hélice e folhas β do espectro de CD usando K2D3 (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d3/>) obteve valores de 30 % β e 7 % α . Esses valores foram próximos aos previstos a partir da análise de sequência, onde houve também predominância de folhas β , indicando que a proteína se recuperou dos corpos de inclusão desnaturados com ureia. Além disso, os espectros demonstraram que a proteína não perde a conformação quando é tratada a 95°C, indicando que se trata de uma proteína termoestável (Figura 5A). De acordo com os resultados obtidos, as folhas de tomates foram tratadas com 100 μL 6,7

$\mu\text{mol L}^{-1}$ da proteína após sua permanência em banho-maria a 80 °C, para validar sua termoestabilidade. A proteína tratada termicamente causou necrose no local da aplicação após três dias (Figura 5B). Esse aumento no tempo pode ser explicado devido ao volume da proteína que foi aplicada na folha.

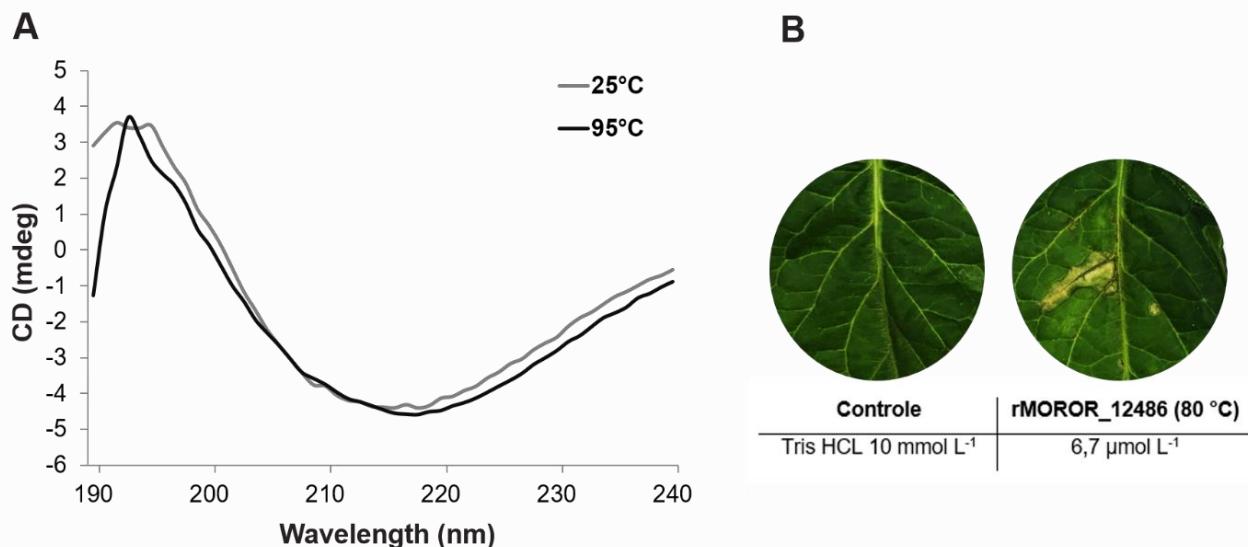


Figura 5. Curva de termoestabilidade e espectros dicroicos da proteína rMOROR_12486 (190-240 nm) com variação da temperatura de 25 °C para 95 °C. (A) A linha cinza mostra os espectros a 25 °C e linha preta a 95 °C, demonstrando que a proteína não se desnatura quando é tratada a 95°C. (B) Proteína rMOROR_12486 submetida a 80 °C para validar a sua termoestabilidade. A concentração proteica foi de 6,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o controle tampão Tris HCL 5 mmol L⁻¹ com pH 7,4.

4. DISCUSSÃO

Os resultados das análises da sequência da proteína de MOROR_12486 se encaixam nos critérios estabelecidos para uma proteína ser considerada efetora, pois não possui domínios transmembrana, não possui semelhança com outros domínios de proteínas, apresenta um tamanho relativamente pequeno e presença de sinal de endereçamento para a rota secretora (DALIO *et al.*, 2017; SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2016; SPERSCHNEIDER *et al.*, 2015).

A previsão inicial de regiões desordenadas apontou para MOROR_12486 com regiões intrinsecamente desestruturadas. Essa flexibilidade pode ser necessária para permitir a funcionalidade dessa proteína. De fato, várias proteínas efetoras são intrinsecamente desordenadas

e esse recurso pode ser essencial para a translocação efetora, mimetismo da função do hospedeiro e principalmente evasão do sistema imunológico da planta (MARÍN; UVERSKY; OTT, 2013). Além disso, os resultados do CD parecem confirmar o que foi previsto para a estrutura da sequência proteica. Sendo que a proteína possui predominância de folha- β demonstrando ser termoestável, pois os espectros de 95 °C foram similares aos de 25 °C. Em conjunto essas características são adequadas ao papel de uma proteína efetora.

A proteína rMOROR_12486 de *M. roreri* foi purificada a partir de *E. coli*, e provocou atividade de murcha e necrose em plantas modelos de tomate dependente do tempo e das concentrações utilizadas, que pode ser indicativa de morte celular programada do tipo HR. A produção de EROs, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma característica inicial da HR (LAMB; DIXON, 1997; VAN BREUSEGEM; DAT, 2006). Dessa forma, testamos se rMOROR_12486 poderia induzir o acúmulo de EROs em plantas.

Vale salientar, que a explosão oxidativa geralmente aparece nas plantas hospedeiras ou não hospedeiras após infecção por um fitopatógeno ou tratamento com um elicitor (CHEN *et al.*, 2012). As EROs derivadas do hospedeiro incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O^{2-}) desempenham um papel importante contra patógenos, atuando na transdução de sinal durante as interações, ativando genes responsivos à defesa, fortalecendo ou modificando a parede celular, deposição de calose, entre outros (DUAN *et al.*, 2022; ELLINGER *et al.*, 2013; LIU; ZHANG, 2021; SINGH *et al.*, 2016). Outras evidências mostram que altos níveis de H_2O_2 estão envolvidos na indução da morte celular (VAN BREUSEGEM; DAT, 2006). Dessa forma, as EROs podem assumir diferentes funções dependendo do tipo de estímulo.

Através da reação de polimerização do DAB foi possível observar o acúmulo de H_2O_2 em tecidos foliares de tomate após tratamento com o efetor rMOROR_12486. A coloração DAB também foi utilizada em outros estudos, como exemplo, para revelar o acúmulo de H_2O_2 em folhas de tabaco tratadas com a proteína indutora de resposta hipersensível de *M. oryzae* (MoHrip1). A proteína recombinante MoHrip1 pode eliciar a HR em folhas e induzir a produção de múltiplas moléculas sinalizadora, como EROs, bem como a expressão de genes PR para aumentar a resistência sistêmica do arroz (CHEN *et al.*, 2012).

Assim, como MOROR_12486 outros efetores fúngicos foram caracterizados através de ensaios de morte celular vegetal acompanhada da produção de EROs. Por exemplo, o ensaio de infiltração com diferentes concentrações da proteína purificada BcCrh1 de *Botrytis cinerea*, causou morte celular em *Nicotiana benthamiana* e folhas de tomate, além do acúmulo de H₂O₂ (BI *et al.*, 2021). Ou seja, além da atividade indutora de morte celular, foi demonstrado que BcCrh1 também desencadeia respostas de defesa da planta. Outro estudo demonstrou que a proteína efetora RsSCR10 do fitopatógeno *R. solani*, apresenta atividade elicitora estando envolvida na indução da morte de células vegetais (NIU *et al.*, 2021). A capacidade de RsSCR10 em ativar a resposta imune foi demonstrada pela confirmação da expressão de genes PR, ativação de H₂O₂ e deposição de calose.

Os efetores são empregados durante a colonização e infecção do patógeno nos tecidos hospedeiros e sua expressão está estreitamente relacionada aos diferentes estágios da doença. Até agora apresentamos casos em que a produção de EROs juntamente com a morte celular funcionem como respostas de defesa da planta. Mas isso só é possível se o efetor for um elicitor expresso na fase biotrófica da infecção e esse fenótipo apresentado assegure a resistência da planta ao inibir o crescimento do patógeno no local de ataque, sendo um grande obstáculo para os fungos na fase biotrófica (LYU *et al.*, 2016). No entanto, para necrotróficos, a morte celular pode ser benéfica em vez de prejudicial (SHAO *et al.*, 2021). Dessa forma, os hemibiotróficos, como *M. roreri* também podem empregar efetores que induzem morte celular pela planta contribuindo para a virulência do patógeno na fase necrotrófica da infecção.

O candidato a efetor Ds70057 de *Dothistroma septosporum*, desencadeia morte celular indicativo de uma HR em plantas hospedeiras e não hospedeiras (HUNZIKER *et al.*, 2021). Houve uma alta expressão desse efetor nos estágios médio e tardio (necrotrófico) da doença. Desse modo, os autores sugeriram que pode se tratar de um efetor necrotrófico que desencadeia a morte celular para auxiliar o patógeno na destruição do tecido vegetal.

Os resultados mostraram que rMOROR_12486 o homólogo da BASIDINA de *M. perniciosa*, de forma semelhante, induziu o acúmulo de EROs e morte celular nos tecidos vegetais do tomateiro, o que é consistente com outros estudos que fornecem evidências que efetores conservados desempenham papéis semelhantes em diferentes patógenos (KARKI *et al.*, 2021).

O efetor CEC3, possui homólogos em quatro diferentes espécies do gênero fitopatogênico *Colletotrichum* (TSUSHIMA *et al.*, 2021). O efetor CEC3 e seus homólogos induz morte celular e expansão nuclear, indicando que seu papel funcional é conservado no gênero. Pep1 é efetor essencial de *Ustilago maydis* que suprime a PTI e é funcionalmente conservado em diferentes patossistemas monocotiledôneas e dicotiledôneas (HEMETSBERGER *et al.*, 2015). Essa descoberta apoia a existência de proteínas efetoras conservadas que visam mecanismos de defesa conservados e constituem elementos-chave no sucesso evolutivo de grupos de patógenos. Os homólogos do efetor BEC1019 são altamente conservados em fungos associados ao desenvolvimento biotrófico e também estão envolvidos na virulência fúngica necrotrófica, de forma semelhante, aumentando a colonização desses patógenos no trigo (ZHANG *et al.*, 2019). Dessa forma, o efetor conservado BEC1019 poderia servir como um alvo de amplo espectro para o controle de diferentes patógenos.

Finalmente, propomos que MOROR_12486 atua como um elicitor ao induzir respostas de defesa da planta, como o acúmulo de H₂O₂, seguido de morte celular nos tecidos vegetais. Entretanto, outros estudos nos ajudarão a determinar se MOROR_12486 age como um efetor necrotrófico que ativa as vias de defesas existentes na planta a favor do patógeno ou se de fato o efetor é expresso na fase biotrófica da infecção e dessa forma o fenótipo visível de morte celular seria uma resposta de resistência da planta. Por outro lado, a morte celular induzida por HR pode não ser causada por uma interação MOROR_12486/alvo específico, mas por resistência não-hospedeira ativada pela detecção do efetor, sugerindo seu reconhecimento por receptores imunes em plantas não hospedeiras.

5. CONCLUSÃO

A aplicação de rMOROR_12486 em plantas de tomate desencadeia a morte celular e induz respostas de defesa, como acúmulo de H₂O₂, indicativo de uma resposta de defesa hipersensível, sugerindo seu reconhecimento por receptores imunes em plantas não hospedeiras, o que aponta para MOROR_12486 como uma proteína efetora que pode desempenhar um papel importante em *M. roreri*.

A indução de morte celular e o acúmulo de H₂O₂ observado com a ação da MOROR_12486 foi o mesmo encontrado na proteína efetora BASIDINA de *M. perniciosa*. Mesmo se tratando de

espécies distintas de *Moniliophthora*, que pouco variam em especificidade de hospedeiro, assim como a proteína efetora BASIDINA, MOROR_12486 pode representar um novo efetor com conservação funcional no filo basidiomycota.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, Bryan A *et al.* *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1580–1594, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- BALINT-KURTI, Peter. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1163–1178, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>
- BARBOSA, Ceslaine Santos *et al.* Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 509, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4875-7>
- BI, Kai *et al.* The *Botrytis cinerea* Crh1 transglycosylase is a cytoplasmic effector triggering plant cell death and defense response. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 2166, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22436-1>
- CHAROVA, Spyridoula N *et al.* The RsRlpA Effector Is a Protease Inhibitor Promoting *Rhizoctonia solani* Virulence through Suppression of the Hypersensitive Response. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 21, p. 8070, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21218070>
- CHEN, Mingjia *et al.* Purification and characterization of a novel hypersensitive response-inducing elicitor from *Magnaporthe oryzae* that triggers defense response in rice. **PloS one**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e37654–e37654, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037654>
- DALIO, Ronaldo J D *et al.* Effector Biology in Focus: A Primer for Computational Prediction and Functional Characterization. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 22–33, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-17-0174-FI>

DODDS, Peter N; RATHJEN, John P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 539–548, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg2812>

DÖLFORS, Fredrik *et al.* A LysM effector protein from the basidiomycete *Rhizoctonia solani* contributes to virulence through suppression of chitin-triggered immunity. **Molecular Genetics and Genomics**, [s. l.], v. 294, n. 5, p. 1211–1218, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01573-9>

DUAN, Guihua *et al.* MoSDT1 triggers defense response through modulating phosphorylated proteins in rice. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 15–30, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01201-4>

EBERT, Malaika K *et al.* Identification and characterization of *Cercospora beticola* necrosis-inducing effector CbNip1. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 301–316, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.13026>

ELLINGER, Dorothea *et al.* Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 161, n. 3, p. 1433–1444, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.112.211011>

FARIAS, Keilane Silva. EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE UM POTENCIAL EFETOR DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa*. [s. l.], v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2020.

GECHEV, Tsanko S; HILLE, Jacques. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **The Journal of cell biology**, [s. l.], v. 168, n. 1, p. 17–20, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200409170>

HAN, Jingluan *et al.* The Fungal Effector Avr-Pita Suppresses Innate Immunity by Increasing COX Activity in Rice Mitochondria. **Rice (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00453-4>

HE, Qiguang *et al.* A novel chorismate mutase from *Erysiphe quercicola* performs dual functions of synthesizing amino acids and inhibiting plant salicylic acid synthesis. **Microbiological**

research, Germany, v. 242, p. 126599, 2021. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126599>

HEMETSBERGER, Christoph *et al.* The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. **New Phytologist**, [s. l.], v. 206, n. 3, p. 1116–1126, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.13304>

HUNZIKER, Lukas *et al.* Apoplastic effector candidates of a foliar forest pathogen trigger cell death in host and non-host plants. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 19958, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99415-5>

JOHNSON, E S *et al.* First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot on Theobroma cacao in Jamaica. **New Disease Reports**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 2, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2017.036.002>

KARKI, Sujit Jung *et al.* A small secreted protein from *Zymoseptoria tritici* interacts with a wheat E3 ubiquitin ligase to promote disease. **Journal of experimental botany**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 733–746, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa489>

KOU, Yanjun; QIU, Jiehua; TAO, Zeng. **Every Coin Has Two Sides: Reactive Oxygen Species during Rice–*Magnaporthe oryzae* Interaction.** [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20051191>

LAMB, Chris; DIXON, Richard A. THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, United States, v. 48, p. 251–275, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>

LYU, Xueliang *et al.* A Small Secreted Virulence-Related Protein Is Essential for the Necrotrophic Interactions of Sclerotinia sclerotiorum with Its Host Plants. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. e1005435, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005435>

LAMB, Chris; DIXON, Richard A. THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, United States, v. 48, p. 251–275, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>

LI, Shuai *et al.* The Effector AGLIP1 in *Rhizoctonia solani* AG1 IA Triggers Cell Death in Plants and Promotes Disease Development Through Inhibiting PAMP-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 2228, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02228>

LI, Xiao *et al.* A putative effector of the rubber-tree powdery mildew fungus has elicitor activity that can trigger plant immunity. **Planta**, [s. l.], v. 255, n. 2, p. 33, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03818-7>

LIU, Xinyu; ZHANG, Zhengguang. A double-edged sword: reactive oxygen species (ROS) during the rice blast fungus and host interaction. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. n/a, n. n/a, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.16171>

MA, Tao *et al.* *Plasmopara viticola* effector PvRXLR111 stabilizes VvWRKY40 to promote virulence. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 231–242, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.13020>

MARÍN, Macarena; UVERSKY, Vladimir N; OTT, Thomas. Intrinsic Disorder in Pathogen Effectors: Protein Flexibility as an Evolutionary Hallmark in a Molecular Arms Race. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 3153–3157, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116319>

NEUHOFF, V *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, Germany, v. 9, n. 6, p. 255–262, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elps.1150090603>

NIU, Xianyu *et al.* A Novel, Small Cysteine-Rich Effector, RsSCR10 in *Rhizoctonia solani* Is Sufficient to Trigger Plant Cell Death. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.684923>

PHILLIPS-MORA, W *et al.* First report of frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Bolivia. **New Disease Reports**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 29, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.031.029>

SELIN, Carrie *et al.* Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and

Challenges. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 7, p. 600, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00600>

SINGH, Rachana *et al.* Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 7, p. 1299, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01299>

SONAH, Humira; DESHMUKH, Rupesh K; BÉLANGER, Richard R. Computational prediction of effector proteins in fungi: opportunities and challenges. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 7, p. 126, 2016.

SHAO, Dandan *et al.* Effectors of Plant Necrotrophic Fungi. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, p. 995, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.687713>

SPERSCHNEIDER, Jana *et al.* Advances and Challenges in Computational Prediction of Effectors from Plant Pathogenic Fungi. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. e1004806, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004806>

SPERSCHNEIDER, Jana; DODDS, Peter N. EffectorP 3.0: Prediction of Apoplastic and Cytoplasmic Effectors in Fungi and Oomycetes. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 146–156, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-21-0201-R>

THORDAL-CHRISTENSEN, Hans *et al.* Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1187–1194, 1997. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x>

TORRES, Miguel Angel; JONES, Jonathan D G; DANGL, Jeffery L. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 373–378, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.106.079467>

TSUSHIMA, Ayako *et al.* The Conserved *Colletotrichum* spp. Effector Candidate CEC3 Induces Nuclear Expansion and Cell Death in Plants. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682155>

VAN BREUSEGEM, Frank; DAT, James F. Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 384–390, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.106.078295>

YING, Li *et al.* *Magnaporthe oryzae* Auxiliary Activity Protein MoAa91 Functions as Chitin-Binding Protein To Induce Appressorium Formation on Artificial Inductive Surfaces and Suppress Plant Immunity. **mBio**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. e03304-19, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.03304-19>

ZHANG, Yi *et al.* The Highly Conserved Barley Powdery Mildew Effector BEC1019 Confers Susceptibility to Biotrophic and Necrotrophic Pathogens in Wheat. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20184376>

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- AIME, M C; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, England, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.5.1012>
- ALEXANDER, Patricia A. Methodological Guidance Paper: The Art and Science of Quality Systematic Reviews. **Review of Educational Research**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 6–23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3102/0034654319854352>
- ALMEIDA, Fausto; RODRIGUES, Marcio L; COELHO, Carolina. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 214, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>
- AROMATARIS, Edoardo; PEARSON, Alan. The Systematic Review: An Overview. **AJN The American Journal of Nursing**, [s. l.], v. 114, n. 3, 2014. Disponível em: https://journals.lww.com/ajnonline/Fulltext/2014/03000/The_Systematic_Review__An_Overview.aspx
- AVERY, Simon V *et al.* The fungal threat to global food security. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 123, n. 8, p. 555–557, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.03.006>
- BAILEY, Bryan A *et al.* Differential gene expression by *Moniliophthora roreri* while overcoming cacao tolerance in the field. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 711–729, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12134>
- BAILEY, Bryan A *et al.* *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1580–1594, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- BAILEY, Bryan A.; MEINHARDT, Lyndel W. **Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>
- BALINT-KURTI, Peter. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences.

Molecular plant pathology, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1163–1178, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>

BARBOSA, Ceslaine Santos *et al.* Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 509, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4875-7>

BAUM, David A *et al.* Phylogenetic relationships of Malvatheca (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. **American journal of botany**, United States, v. 91, n. 11, p. 1863–1871, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1863>

BIGEARD, Jean; COLCOMBET, Jean; HIRT, Heribert. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular plant**, England, v. 8, n. 4, p. 521–539, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>

BÖHM, Hannah *et al.* Immune receptor complexes at the plant cell surface. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 20, p. 47–54, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.007>

BOLLER, Thomas; FELIX, Georg. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 379–406, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>

BOLTON, Melvin D *et al.* The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. **Molecular microbiology**, England, v. 69, n. 1, p. 119–136, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06270.x>

CALDWELL, Patrina H Y; BENNETT, Trish. Easy guide to conducting a systematic review. **Journal of Paediatrics and Child Health**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 853–856, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpc.14853>

CAMPUZANO, H. Fluctuación de poblaciones de esporas de *Monilia roreri* Cif. et Par., y viabilidad durante un ciclo completo de afección. **Noticias Fitopatológicas**, [s. l.], v. 5, p. 107, 92

1976.

CANTU, Dario *et al.* 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**, [s. l.], v. 14, p. 270, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-270>

CATANZARITI, Ann-Maree *et al.* Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **The Plant cell**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 243–256, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035980>

CHAROVA, Spyridoula N *et al.* The RsRlpA Effector Is a Protease Inhibitor Promoting *Rhizoctonia solani* Virulence through Suppression of the Hypersensitive Response. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 21, p. 8070, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21218070>

CHAUDHARI, Prateek *et al.* Effector biology during biotrophic invasion of plant cells. **Virulence**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 703–709, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/viru.29652>

CHEN, Songbiao *et al.* Identification and characterization of in planta-expressed secreted effector proteins from *Magnaporthe oryzae* that induce cell death in rice. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 26, n. 2, p. 191–202, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0117-R>

CILAS, Christian; BASTIDE, Philippe. **Challenges to Cocoa Production in the Face of Climate Change and the Spread of Pests and Diseases**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy10091232>

CUI, Haitao; TSUDA, Kenichi; PARKER, Jane E. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annual review of plant biology**, United States, v. 66, p. 487–511, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>

DA SILVA, Adielle R *et al.* Corrigendum to: Systematic review of defense responses against Phytophthora and strategies to manage Phytophthora diseases in citrus. **Functional plant biology : FPB**, Australia, v. 48, n. 10, p. 1086, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1071/FP20349_CO

DALIO, Ronaldo J D *et al.* Effector Biology in Focus: A Primer for Computational Prediction and Functional Characterization. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 22–33, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-17-0174-FI>

DANGL, Jeffery L; JONES, Jonathan D G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, [s. l.], v. 411, n. 6839, p. 826–833, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35081161>

DE WIT, Pierre J G M. Cladosporium fulvum Effectors: Weapons in the Arms Race with Tomato. **Annual review of phytopathology**, United States, v. 54, p. 1–23, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-011516-040249>

DEAN, Ralph *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

DELGADO-OSPINA, Johannes *et al.* The Role of Fungi in the Cocoa Production Chain and the Challenge of Climate Change. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 202, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7030202>

DJAMEI, Armin *et al.* Metabolic priming by a secreted fungal effector. **Nature**, England, v. 478, n. 7369, p. 395–398, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature10454>

DODDS, Peter N *et al.* Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 23, p. 8888 LP – 8893, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0602577103>

DOEHLEMANN, Gunther *et al.* Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. **Molecular microbiology**, England, v. 81, n. 3, p. 751–766, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07728.x>

DRENTH, André; GUEST, David I. Fungal and Oomycete Diseases of Tropical Tree Fruit Crops. **Annual review of phytopathology**, United States, v. 54, p. 373–395, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095944>

ELMORE, Manjula G *et al.* De novo transcriptome of *Phakopsora pachyrhizi* uncovers putative effector repertoire during infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 110, p. 101464, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101464>

EVANS, Harry C. Cacao diseases—the trilogy revisited. **Phytopathology**, [s. l.], v. 97, n. 12, p. 1640–1643, 2007.

FANG, Yufeng; TYLER, Brett M. Efficient disruption and replacement of an effector gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 127–139, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12318>

FARIAS, keilane silva. EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE UM POTENCIAL EFETOR DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa*. [s. l.], v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2020.

FELIX, Georg *et al.* Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **Plant Journal**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 265–276, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x>

FERNANDEZ, Jessie; ORTH, Kim. Rise of a Cereal Killer: The Biology of *Magnaporthe oryzae* Biotrophic Growth. **Trends in microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 582–597, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.12.007>

FIORIN, Gabriel Lorencini *et al.* Suppression of Plant Immunity by Fungal Chitinase-like Effectors. **Current Biology**, [s. l.], v. 28, n. 18, p. 3023-3030.e5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.055>

FLOR, H H. The Complementary Genic Systems in Flax and Flax Rust**Joint contribution from the Field Crops Research Branch, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture and the North Dakota Agricultural Experiment Station. In: DEMEREC, M B T - Advances in Genetics (org.). [S. l.]: Academic Press, 1956. v. 8, p. 29–54. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60498-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60498-8)

GARNICA, Diana P *et al.* The Ins and Outs of Rust Haustoria. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. e1004329, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004329>

GAWEHNS, F *et al.* The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 27, n. 4, p. 336–348, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-13-0330-R>

GIRALDO, Martha C; VALENT, Barbara. Filamentous plant pathogen effectors in action. **Nature reviews. Microbiology**, England, v. 11, n. 11, p. 800–814, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3119>

HAMANN, Thorsten. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 3, p. 77, 2012.

HEMETSBERGER, Christoph *et al.* The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. **New Phytologist**, [s. l.], v. 206, n. 3, p. 1116–1126, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.13304>

HOUTERMAN, Petra M; CORNELISSEN, Ben J C; REP, Martijn. Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. e1000061, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000061>

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA. Produção Agrícola Municipal - PAM. [s. l.], 2020.

IDNURM, Alexander *et al.* Spontaneous and CRISPR/Cas9-induced mutation of the osmosensor histidine kinase of the canola pathogen *Leptosphaeria maculans*. **Fungal Biology and Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0043-0>

JASWAL, Rajdeep *et al.* Effector Biology of Biotrophic Plant Fungal Pathogens: Current Advances and Future Prospects. **Microbiological research**, Germany, v. 241, p. 126567, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126567>

JOHNSON, E S *et al.* First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot on *Theobroma*

cacao in Jamaica. **New Disease Reports**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 2, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2017.036.002>

JONES, Jonathan D G; DANGL, Jeffery L. The plant immune system. **Nature**, [s. l.], v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature05286>

KÄMPER, Jörg *et al.* Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature**, [s. l.], v. 444, n. 7115, p. 97–101, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature05248>

KANJA, Claire; HAMMOND-KOSACK, Kim E. Proteinaceous effector discovery and characterization in filamentous plant pathogens. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1353–1376, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12980>

KARASOV, Talia L; HORTON, Matthew W; BERGELSON, Joy. Genomic variability as a driver of plant-pathogen coevolution? **Current opinion in plant biology**, [s. l.], v. 18, p. 24–30, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.12.003>

KEMEN, Eric *et al.* A novel structural effector from rust fungi is capable of fibril formation. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, England, v. 75, n. 5, p. 767–780, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tpj.12237>

KHANG, Chang Hyun *et al.* Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. **The Plant cell**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1388–1403, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069666>

KOHLER, Amanda C *et al.* Structural Analysis of an Avr4 Effector Ortholog Offers Insight into Chitin Binding and Recognition by the Cf-4 Receptor. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1945–1965, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00893>

KUNZE, Gernot *et al.* The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in *Arabidopsis* Plants. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 3496–3507, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026765>

LO PRESTI, Libera *et al.* Fungal effectors and plant susceptibility. **Annual review of plant**

biology, United States, v. 66, p. 513–545, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-aplant-043014-114623>

LYU, Xueliang *et al.* A Small Secreted Virulence-Related Protein Is Essential for the Necrotrophic Interactions of *Sclerotinia sclerotiorum* with Its Host Plants. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. e1005435, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005435>

MACHO, Alberto P.; ZIPFEL, Cyril. Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 263–272, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.028>

MARSHALL, Rosalind *et al.* Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat . **Plant Physiology**, [s. l.], v. 156, n. 2, p. 756–769, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.111.176347>

MEINHARDT, Lyndel W *et al.* Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. **BMC genomics**, [s. l.], v. 15, p. 164, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-164>

MENDGEN, Kurt; HAHN, M; DEISING, Holger. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual review of phytopathology**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 367–386, 1996.

MOFFAT, Caroline S. Breakthrough to fast-track yellow spot research. [s. l.], 2014. Disponível em: <https://grdc.com.au/news-and-media/news-and-media-releases/west/2014/07/breakthrough-to-fast-track-yellow-spot-research>

MOFFAT, Caroline S. Samples from growers boost yellow spot research. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://grdc.com.au/news-and-media/news-and-media-releases/north/2017/06/samples-from-growers-boost-yellow-spot-research>

MOFFAT, Caroline S; SEE, Pao Theen; OLIVER, Richard P. Generation of a ToxA knockout strain of the wheat tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 918–926, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12154>

MUKA, Taulant *et al.* A 24-step guide on how to design, conduct, and successfully publish a systematic review and meta-analysis in medical research. **European journal of epidemiology**, Netherlands, v. 35, n. 1, p. 49–60, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10654-019-00576-5>

MUNN, Zachary *et al.* Systematic review or scoping review? Guidance for authors when choosing between a systematic or scoping review approach. **BMC Medical Research Methodology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 143, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12874-018-0611-x>

NGOU, Bruno Pok Man *et al.* Estradiol-inducible AvrRps4 expression reveals distinct properties of TIR-NLR-mediated effector-triggered immunity. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 2186–2197, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erz571>

NGOU, Bruno Pok Man *et al.* Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. **Nature**, [s. l.], v. 592, n. 7852, p. 110–115, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03315-7>

ORBACH, M J *et al.* A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. **The Plant cell**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 2019–2032, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2019>

OSORIO-GUARÍN, Jaime A *et al.* Genome-Wide Association Study Reveals Novel Candidate Genes Associated with Productivity and Disease Resistance to Moniliophthora spp. in Cacao (*Theobroma cacao* L.). **G3 (Bethesda, Md.)**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1713–1725, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1534/g3.120.401153>

PARK, Chan-Ho *et al.* The Magnaporthe oryzae effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. **The Plant cell**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 4748–4762, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105429>

PETRE, Benjamin *et al.* Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Target Diverse Plant Cell Compartments. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 28, n. 6, p. 689–700, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0003-R>

PHILLIPS-MORA, W *et al.* First report of frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Bolivia. **New Disease Reports**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 29, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.031.029>

PHILLIPS-MORA, W; WILKINSON, M J. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. **Phytopathology**, United States, v. 97, n. 12, p. 1644–1647, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1644>

PLIEGO, Clara *et al.* Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 26, n. 6, p. 633–642, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-13-0005-R>

PLOETZ, Randy. Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters. **The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview**. Em: Bailey B., Meinhardt L. (eds) **Cacao Diseases**, [s. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>

PORTO, Brenda Neves *et al.* Genome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* reveal expression dynamics of candidate effectors dependent on host compatibility. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. e0215598, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215598>

PRADHAN, Amrita *et al.* Fungal effectors, the double edge sword of phytopathogens. **Current genetics**, United States, v. 67, n. 1, p. 27–40, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01118-3>

QI, Tuo *et al.* Stripe Rust Effector PstGSRE1 Disrupts Nuclear Localization of ROS-Promoting Transcription Factor TaLOL2 to Defeat ROS-Induced Defense in Wheat. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1624–1638, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.09.010>

ROCAFORT, Mercedes; FUDAL, Isabelle; MESARICH, Carl H. Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 56, p. 9–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.004>

RODRIGUEZ-MORENO, Luis *et al.* Tools of the crook- infection strategies of fungal plant pathogens. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 664–674, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tpj.13810>

SANABRIA, Natasha M.; HUANG, Ju Chi; DUBERY, Ian A. Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense. **Self/Nonself - Immune Recognition and Signaling**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 40–54, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/self.1.1.10442>

SÁNCHEZ-MORA, Fernando; GARCÉS-FIALLOS, Felipe. Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al . en el cultivo de cacao Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al . in the crop of cocoa. **Scientia Agropecuaria**, [s. l.], v. 3, p. 249–258, 2012.

SÁNCHEZ MORA, Fernando David; GARCÉS FIALLOS, Felipe Rafael. Moniliophthora roreri en el cultivo de cacao Moniliophthora roreri. **Scientia Agropecuaria**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 249–258, 2012.

SANTOS, Adriadna Souza *et al.* Water stress in *Musa* spp.: A systematic review. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. e0208052, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208052>

SAUNDERS, Diane G O *et al.* Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. **PloS one**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. e29847, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029847>

SCHIRAWSKI, Jan *et al.* Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 330, n. 6010, p. 1546–1548, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1195330>

SEE, Pao Theen *et al.* Heterologous Expression of the *Pyrenophora tritici-repentis* Effector Proteins ToxA and ToxB, and the Prevalence of Effector Sensitivity in Australian Cereal Crops. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 182, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00182>

SEITNER, Denise *et al.* The core effector Cce1 is required for early infection of maize by *Ustilago maydis*. **Molecular plant pathology**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 2277–2287, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12698>

SELIN, Carrie *et al.* Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and Challenges. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 7, p. 600, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00600>

SHAO, Dandan *et al.* Effectors of Plant Necrotrophic Fungi. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, p. 995, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.687713>

SISTEMA BRASILEIRO DE AGRONEGÓCIO - SBA. **Moniliase acende alerta para produtores de cacau no Brasil**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://sba1.com/noticias/noticia/14807/Moniliase-acende-alerta-para-produtores-de-cacau-no-Brasil>.

SOARES, Julianna M S *et al.* **Genetic Improvement for Resistance to Black Sigatoka in Bananas: A Systematic Review**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.657916>

SONAH, Humira; DESHMUKH, Rupesh K; BÉLANGER, Richard R. Computational prediction of effector proteins in fungi: opportunities and challenges. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 7, p. 126, 2016.

SPERSCHNEIDER, Jana *et al.* ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. **New Phytologist**, [s. l.], v. 217, n. 4, p. 1764–1778, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.14946>

SPERSCHNEIDER, Jana *et al.* Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 2094–2110, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12682>

STAEL, Simon *et al.* Plant innate immunity – sunny side up? **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 3–11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.002>

STOTZ, Henrik U *et al.* Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. **Trends in plant science**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 491–500, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.04.009>

TORRES-PAL, C.; RAMIREZ-LE, M. Expression of Hydrolytic Enzymes During Interaction of Moniliophthora roreri, Causal Agent of Frosty Pod Rot and Theobroma cacao Pods. **Plant Pathology Journal**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 49–56, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/ppj.2016.49.56>

TSUDA, Kenichi *et al.* Network Properties of Robust Immunity in Plants. **PLOS Genetics**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. e1000772, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>

UHSE, Simon; DJAMEI, Armin. Effectors of plant-colonizing fungi and beyond. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. e1006992, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006992>

VAN DE WOUW, Angela P; IDNURM, Alexander. Biotechnological potential of engineering pathogen effector proteins for use in plant disease management. **Biotechnology advances**, England, v. 37, n. 6, p. 107387, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.009>

VAN DER HOORN, Renier A L; KAMOUN, Sophien. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 2009–2017, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>

VAN ESSE, H Peter *et al.* The Cladosporium fulvum virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. **The Plant cell**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1948–1963, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059394>

Molecular plant-microbe interactions : MPMI, United States, v. 27, n. 3, p. 196–206, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0313-IA>

WANG, Shumei *et al.* Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from Phytophthora infestans haustoria by distinct secretion pathways. **New Phytologist**, [s. l.], v. 216, n. 1, p. 205–215, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.14696>

WESTGATE, Martin J; LINDENMAYER, David B. The difficulties of systematic reviews. **Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology**, United States, v. 31, n. 5, p. 1002–1007, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cobi.12890>

XU, Qiang *et al.* Haustoria – arsenals during the interaction between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 83–94, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12882>

YEATS, Trevor H; ROSE, Jocelyn K C. The Formation and Function of Plant Cuticles. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 5–20, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.113.222737>

YING, Li *et al.* Magnaporthe oryzae Auxiliary Activity Protein MoAa91 Functions as Chitin-Binding Protein To Induce Appressorium Formation on Artificial Inductive Surfaces and Suppress Plant Immunity. **mBio**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. e03304-19, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.03304-19>

YUAN, Minhang *et al.* Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. **Nature**, [s. l.], v. 592, n. 7852, p. 105–109, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03316-6>