

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES PUTATIVOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA À *Hemileia vastatrix*¹

Danúbia Rodrigues Alves²; Eveline Teixeira Caixeta³; Dênia Pires de Almeida⁴; Isabel Samila Lima Castro⁵; Pedro Ricardo Rossi Marques Barreiros⁶; Edson Mario de Andrade Silva⁷; Tiago Antônio de Oliveira Mendes⁸; Laércio Zambolim⁹

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, CAPES, CNPq, Fapemig, INCT-Café.

² Estudante, MS, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, danubia.alves@ufv.br.

³ Pesquisadora, DSc, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Café, Brasília, DF – Brasil, eveline.caixeta@embrapa.br.

⁴ Estudante, DSc, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, denia_pires@hotmail.com.

⁵ Estudante, MS, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, samilalcastro@gmail.com.

⁶ Estudante, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, pedro.barreirosufv@gmail.com.

⁷ Estudante, MS, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG – Brasil, mariodeandrade@gmail.com.

⁸ Professor, DSc, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, tiagomgmendes@yahoo.com.br.

⁹ Professor, PhD, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, zambolim@ufv.br.

RESUMO: A ferrugem causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* é a principal doença de importância econômica na cafeicultura. Essa doença está amplamente distribuída nas áreas cafeeiras em todo o mundo e devido à co-evolução planta-patógeno tem surgido novas raças que são capazes de suplantar a resistência de cultivares de café comercializadas como resistentes. Assim, devido ao sucesso da infecção de *Coffea* por esse patógeno, a busca por cafeeiros resistentes tem sido recorrente nos programas de melhoramento dessa cultura. Estudos com o Híbrido de Timor (HdT) tem sido de grande importância para progressos alcançados em pesquisas visando a resistência do cafeeiro à *H. vastatrix*. O HdT CIFIC 832/2 é importante na busca de genes de resistência no patossistema *Coffea* – *H. vastatrix*, por conter fatores genéticos que condicionam resistência a diferentes patógenos, características agrônômicas desejáveis e respostas mais rápidas à ferrugem. Assim, compreender a natureza da resistência duradoura em genótipos do HdT e descrever os genes envolvidos na defesa das plantas é fundamental para o uso eficiente dos recursos disponíveis nesse híbrido natural. Desse modo, os objetivos desse trabalho foram identificar genes possivelmente associados à resistência à *H. vastatrix* e caracterizar um gene putativo, a partir do sequenciamento de uma região do genoma do HdT CIFIC 832/2, análise de expressão gênica e estudos filogenéticos. Para isso foi realizado o sequenciamento do clone BAC 70-22F contendo a marca funcional de resistência, por meio da Plataforma Illumina MiSeq (*paired – end reads*). Posteriormente foi feita a montagem dos *contigs* usando o *software* SPAdes e a estratégia conhecida como montagem *de novo*. Em seguida, foi realizada a predição gênica com base no reconhecimento de regiões previamente caracterizadas de *Solanum lycopersicum* em *software* AUGUSTUS. Realizou-se a anotação gênica com base nos genomas de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea eugenioides*, utilizando a ferramenta BLAST. Foram anotados 991 genes do clone BAC 70-22F. A anotação gênica revelou a presença de genes candidatos relacionados ao mecanismo de resistência de hospedeiros contra patógenos. Com base na anotação gênica foi selecionado um possível receptor *like kinase* e desenhados *primers* para estudo do perfil de expressão gênica durante a interação *Coffea* - *H. vastatrix*. O possível *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase* GSO2, em estudo, exibiu um aumento significativo na expressão gênica pré-haustorial em genótipos incompatíveis. Na interação compatível, não houve diferença de expressão quando comparados os diferentes tempos após a infecção. Resistência pré-haustorial já foi observada para o mesmo patossistema, sugerindo uma rápida resposta de resistência em genótipos com interação incompatível. Análises filogenéticas realizadas demonstraram uma relação mais próxima desse gene e a espécie *C. arabica*. Os resultados sugerem que a região genômica clonada do HdT CIFIC 832/2 possui importantes genes candidatos a resistência do cafeeiro à *H. vastatrix* e apresentam informações relevantes para ampliar o conhecimento sobre o HdT e genes envolvidos no patossistema *Coffea* – *H. vastatrix*. Assim, as informações obtidas podem contribuir para futuros planejamentos de estratégias de melhoramento do cafeeiro.

PALAVRAS-CHAVE: bioinformática, *Coffea*, ferrugem do cafeeiro, Híbrido de Timor, sequenciamento.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PUTATIVE GENES ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO *Hemileia vastatrix*

ABSTRACT: The Coffee leaf rust (CLR) caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix* is the main economically important disease in coffee growing. This disease is widely distributed in coffee areas around the world and due to plant-pathogen co-evolution new breeds have emerged that are able to overcome the resistance of coffee cultivars marketed as resistant. Thus, due to the success of *Coffea* infection by this pathogen, the search for resistant coffee trees has been recurrent in breeding programs of this crop. Studies with the Híbrido de Timor (HdT) have been of great importance for progress in research aimed at resistance of coffee to *H. vastatrix*. HdT CIFIC 832/2 is important in the search for resistance genes in the *Coffea* - *H. vastatrix* pathosystem, as it contains genetic factors that condition

resistance to different pathogens, desirable agronomic traits and faster responses to rust. Thus, understanding the nature of lasting resistance in HdT genotypes and describing the genes involved in plant defense is critical to the efficient use of the resources available in this natural hybrid. Therefore, the objectives of this work were to identify genes possibly associated with resistance to *H. vastatrix* and to characterize a putative gene by sequencing a region of the HdT C1FC 832/2 genome, gene expression analysis and phylogenetic studies. For this, the sequencing of clone BAC 70-22F containing the functional resistance mark was performed by Illumina MiSeq Platform (paired – end reads). Subsequently, the contigs were assembled using SPAdes software and the strategy known as new assembly. Then, the genetic prediction was performed based on the recognition of previously characterized regions of *Solanum lycopersicum* in AUGUSTUS software. Genic annotation was performed based on the genomes of *Coffea arabica*, *Coffea canephora* and *Coffea eugenioides*, using the BLAST tool. 991 genes of clone BAC 70-22F were noted. The gene annotation revealed the presence of candidate genes related to the mechanism of host resistance against pathogens. Based on the gene annotation, a possible receptor like kinase was selected and primers designed to study the gene expression profile during the *Coffea - H. vastatrix* interaction. The possible *receptor-like LRR serine / threonine-protein kinase GSO2* under study showed a significant increase in pre-haustorial gene expression in incompatible genotypes. In the compatible interaction, there was no difference of expression when comparing the different times after infection. Pre-haustorial resistance has already been observed for the same pathosystem, suggesting a rapid resistance response in genotypes with incompatible interaction. Phylogenetic analyses showed a closer relationship between this gene and the species *C. arabica*. The results suggest that the cloned genomic region of the HdT C1FC 832/2 has important candidate genes for resistance of coffee to *H. vastatrix* and presents relevant information to broaden the knowledge about HdT and genes involved in the *Coffea - H. vastatrix* pathosystem. Thus, the information obtained may contribute to future planning of coffee breeding strategies.

KEY WORDS: bioinformatics, *Coffea*, coffee leaf rust, Híbrido de Timor, sequencing.

INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*, está entre as principais doenças dessa cultura, sendo responsável por significativas perdas econômica à cafeicultura mundial (AVELINO *et al.*, 2015; ZAMBOLIM, 2016). O sucesso da infecção do cafeeiro por esse patógeno depende da habilidade do fungo em suprimir as respostas de defesa das plantas (JONES e DANGL, 2006). Durante o processo de infecção, as ferrugens formam uma estrutura especializada chamada haustório. Essa estrutura desempenha um papel importante na interação planta-patógeno sendo responsável pela absorção de nutrientes a partir do hospedeiro. A resposta de resistência às ferrugens normalmente é observada após a formação desses haustórios, indicando que os genes Avr (Avr – avirulência) do patógeno são expressos nessa estrutura (DODDS *et al.*, 2009). A resistência das plantas de cafeeiro na interação com o fungo *H. vastatrix* é condicionada por no mínimo nove genes dominantes de efeito maior (NORONHA e BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT *et al.*, 1988) e se baseia no modelo gene-a-gene, proposto por Flor (1971). De acordo com esse modelo, ocorre o reconhecimento dos genes Avr das diferentes raças de *H. vastatrix*, por parte dos fatores de resistência do cafeeiro. Atualmente, o número de perfis de virulência da ferrugem do cafeeiro provavelmente vai muito além das raças caracterizadas. Devido à co-evolução planta-patógeno, têm surgido novas raças do patógeno capazes de suplantar a resistência de cultivares comercializadas como resistentes à ferrugem (TALHINHAS *et al.*, 2017). Dessa forma, a obtenção de cultivares com resistência durável tem sido um desafio para os programas de melhoramento do cafeeiro. Estudos com o Híbrido de Timor (HdT), um híbrido interespecífico natural entre *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (BETTENCOURT, 1973), tem sido de grande importância para os progressos alcançados em pesquisas visando a resistência de *Coffea* à *H. vastatrix*. Esse germoplasma tem sido utilizado em programas de melhoramento que visam resistência durável à ferrugem e outras doenças do cafeeiro (SILVA *et al.*, 2018). Compreender melhor a diversidade genética e a natureza da resistência duradoura em genótipos do HdT é fundamental para o uso eficiente dos recursos disponíveis nesse híbrido natural (SETOTAW *et al.*, 2010; TALHINHAS *et al.*, 2017). Os avanços da biotecnologia em conjunto com os estudos de bioinformática, aplicados ao melhoramento, têm auxiliado na compreensão e manipulação gênica (EDWARDS e BATLEY, 2004; MICHNO e STUPAR, 2018). Essas ferramentas possibilitam a ampliação do conhecimento dos genes que estão envolvidos durante a interação *Coffea - H. vastatrix*, podendo levar a identificação e até mesmo a clonagem de genes essenciais para a resistência do cafeeiro (ETIENNE *et al.*, 2002; FERNANDES-BRUM *et al.*, 2017).

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi identificar genes possivelmente associados à resistência à *H. vastatrix* e caracterizar um gene putativo, a fim de ampliar o conhecimento da resistência do cafeeiro a essa importante doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de identificar genes envolvidos na interação *Coffea-H. vastatrix* foi utilizada uma biblioteca de clones BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), mantida no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (Universidade Federal de Viçosa – MG). Esta biblioteca foi construída a partir do cafeeiro HdT C1FC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro) 832/2 (CAÇÃO *et al.*, 2013). O *screening* da biblioteca foi feito utilizando o marcador *putative probable*

receptor-like protein kinase At5g3920. Esse marcador foi previamente identificado por Florez *et al.* (2017) em estudos do transcriptoma da interação cafeeiro - *H. vastatrix*. Posteriormente, o clone identificado foi sequenciado por meio da plataforma Illumina MiSeq (*paired-end reads*).

Utilizando estratégias de bioinformática, realizou-se a montagem *de novo* das sequências de qualidade obtidas pelo sequenciamento com o programa FastQC. Posteriormente foi feita a montagem dos *contigs* e *scaffolds* usando o software SPAdes. Utilizando o software AUGUSTUS, os genes foram preditos a partir dos *contigs* para a obtenção da sua posição, número de exons, íntrons e transcritos. A predição gênica foi realizada com base no reconhecimento de regiões previamente caracterizadas de *Solanum lycopersicum*. Realizou-se a anotação gênica utilizando a ferramenta BLAST, com base nos genomas de *Coffea arabica* (var. Caturra), *Coffea eugenioides* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Coffea canephora* (clone IF 200) (COFFEE GENOME HUB - <http://coffee-genome.org/>). As sequências foram anotadas a partir do melhor alinhamento (*best hit*) com cada genoma.

A partir da anotação gênica foi selecionado um gene putativo candidato a *receptor like kinase (RLK)* e desenhados *primers*, utilizando software *GenScript* e o programa *Oligo Explore*, para estudo do perfil de expressão gênica desse gene durante a interação *Coffea - H. vastatrix*. O experimento para a análise de expressão gênica foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições biológicas. Utilizaram-se plantas jovens *C. arabica* var. Caturra CIFC 19/1 e HdT CIFC 832/1, as quais foram inoculadas com a raça XXXIII de *H. vastatrix*. As amostras foram coletadas em 0, 12, 24 e 72 horas após a inoculação (hai). Para efetuar a técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), em aparelho 7500 Real Time PCR Systems (*Applied Biosystems*), foi utilizado o sistema de detecção de fluorescência SYBR Green I.

Análises filogenéticas foram realizadas para o possível gene de resistência selecionados utilizando o software MEGA-X-10.0.5. O estudo filogenético foi efetuado com base nos melhores alinhamentos (BLAST) de sequências proteicas, do possível gene RLK com quatro genomas de *Coffea*: *C. arabica*1 var. Caturra (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); *C. arabica*2, var. Típica (dados não publicados); *C. arabica*3, var. Bourbon (WCR - <https://worldcoffeeresearch.org/>) e *Coffea canephora* clone IF 200 (COFFEE GENOME HUB - <http://coffee-genome.org/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o rastreamento com o marcador *putative probable receptor-like protein kinase At5g3920*, identificou-se o clone BAC 70-22F contendo a marca funcional desse gene. A montagem do clone BAC 70-22F resultou em 3.355 *scaffolds* e a anotação gênica identificou 991 genes putativos. Desses genes, 340 foram anotados com similaridade com o base no genoma de *C. arabica* (var. Caturra), 337 com o genoma de *C. eugenioides* e 314 com o genoma de *C. canephora* (clone IF 200).

A anotação gênica revelou a presença de genes candidatos relacionados ao mecanismo de resistência de hospedeiros contra patógenos (Tabela 1). Foram identificados genes envolvidos na modulação da defesa em diferentes etapas da infecção e genes como um análogo ao *putative late blight resistance protein homolog RIA-4*, que desencadeia um sistema de defesa, incluindo uma resposta hipersensível que restringe o crescimento do patógeno (HR). Também foram identificados possíveis inibidores de proteases, envolvidos na morte programada ou apoptose controlada por sinalização (*cysteine synthase*), entre outros genes putativos envolvidos no mecanismo de defesa de plantas.

Tabela 1. Anotação dos principais genes associados à resistência no clone 70-22F.

ORFs	Genoma	Locos	Anotação
<i>Contig_250_g151</i>	<i>Coffea arabica</i>	NC_039917.1	<i>Putative receptor-like protein kinase At3g47110 isoform X1</i>
<i>Contig_877_g568</i>	<i>Coffea eugenioides</i>	NC_040045.1	<i>LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2</i>
<i>Contig_1782_g1045</i>	<i>Coffea arabica</i>	NC_039919.1	<i>Putative late blight resistance protein homolog RIA-4</i>
<i>Contig_2488_g1376</i>	<i>Coffea arabica</i>	NC_039903.1	<i>Cysteine synthase%2C chloroplastic/chromoplastic-like isoform X2</i>

Com base na anotação gênica, foi selecionado um gene análogo de resistência (*RGA*), identificado na região genômica do HdT CIFC 832/2 (BAC 70-22F), para a caracterização do perfil de expressão gênica e estudos filogenéticos. O gene escolhido, putativo *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2*, é candidato a receptores *like kinase (RLK)*. Os *RLKs* são receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que permitem a identificação de uma ampla gama de patógenos, levando à imunidade desencadeada por padrões moleculares associados à patógenos (PTI) (SEKHWAL *et al.*, 2015).

A expressão do gene putativo *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2* analisado entre interações incompatível e compatível e mensurados em horários iguais de infecção, revelou diferença significativa às 12 e 24 hai (Figura 1). Na interação compatível não houve diferença de expressão quando comparados os diferentes tempos após

infecção (Figura 1). Na interação incompatível, observou-se um aumento de expressão do gene às 12 hai, momento em que também houve diferença significativa entre as interações incompatível e compatível (Figura 1). Esse padrão de expressão sugere uma resistência pré-haustorial. O fungo *H. vastatrix* estabelece uma relação biotrófica com o seu hospedeiro em poucas horas após a inoculação, entretanto, a produção de haustório ocorre logo que o fungo entra nos estômatos e, provavelmente, antes de chegar à cavidade subestomática, ou seja, aproximadamente às 24 hai (RAMIRO *et al.*, 2009). Resistência pré-haustorial já foi observada para o mesmo patossistema, sugerindo uma rápida resposta de resistência em genótipos com interação incompatível.

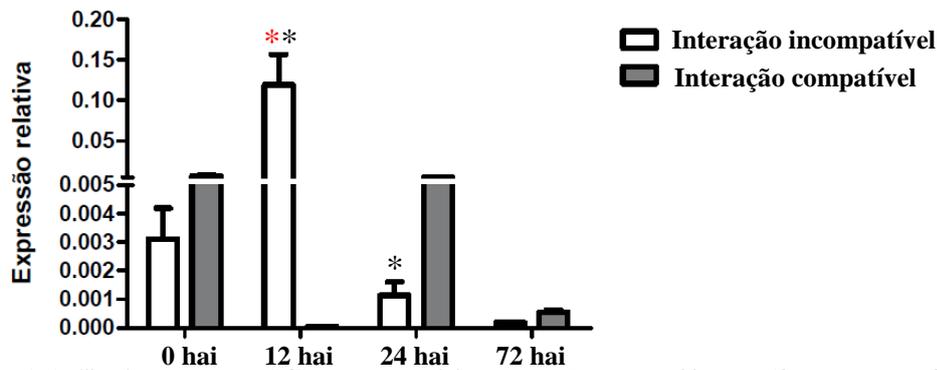


Figura 1. Análise de expressão por PCR em tempo real do putative *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase* GSO2. O padrão de expressão foi mensurado em 0 hora (amostras não inoculadas), 12, 24 e 72 horas após a inoculação (hai) de uredinísporos frescos (*H. vastatrix* – raça XXXIII) em plantas incompatíveis (HdT CIFC 832/1) e compatíveis (*C. arabica* var. Caturra CIFC 19/1). (*) Diferença significativa no nível de expressão entre interações na mesma hai. (**) Diferença significativa em relação às amostras não inoculadas (0h) na mesma interação.

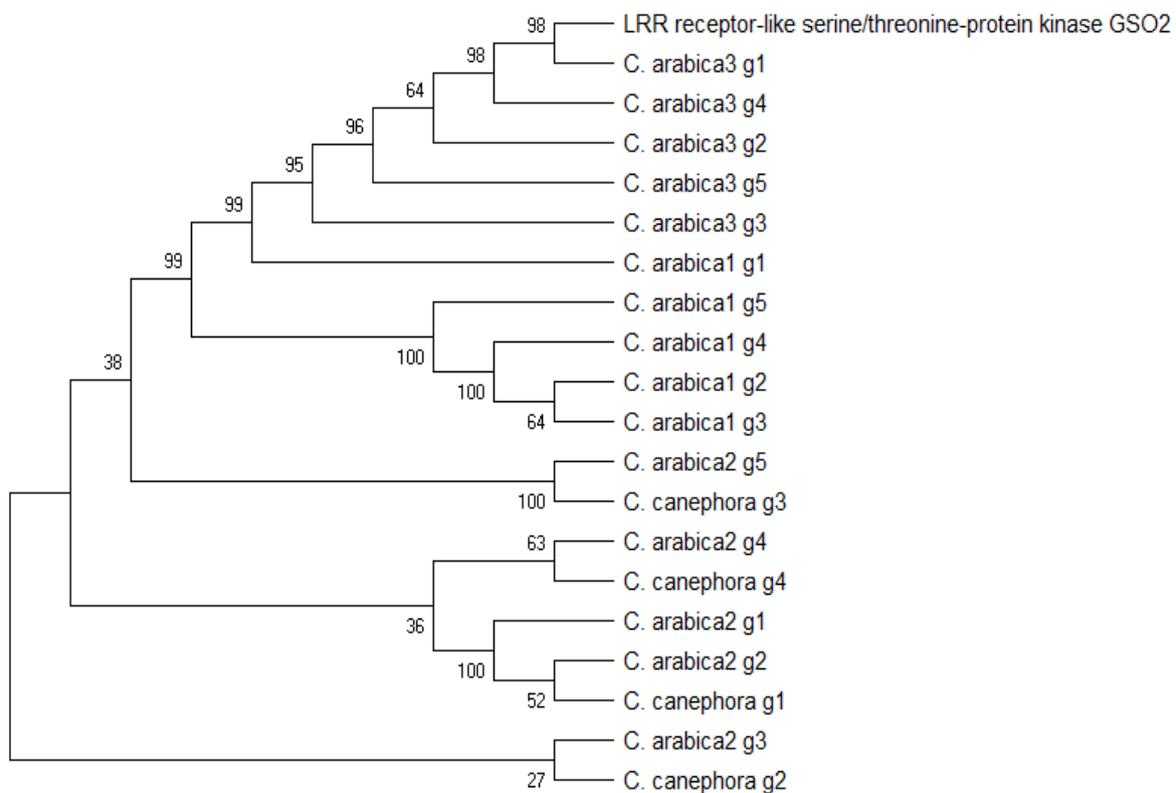


Figura 2. Árvore filogenética baseada em alinhamento de sequências proteicas. Putativo *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase* GSO2. *C. arabica1*: sequências proteicas da variedade Caturra (NCBI). *C. arabica2*: sequências proteicas da variedade Típica (dados não publicados). *C. arabica3*: sequências proteicas da variedade Bourbon (WCR). *C. canephora*: sequências proteicas do clone IF 200 (*Coffee Genome Hub*).

No estudo filogenético o gene putativo *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase* GSO2 ficou agrupado em um clado, com alto valor de *bootstrap*, com dois genes do genoma de *C. arabica3* (var. Bourbon) (Figura 2). O gene *C. arabica3* g1 está anotado como um gene não caracterizado e o gene *C. arabica3* g2 está anotado como *LRR receptor-*

like serine/threonine-protein kinase GSO2. Observou-se que o gene putativo *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase* GSO2, em estudo, não ficou próximo de genes do genoma de *C.canephora*.

Esse resultado sugere que esse gene putativo possui relação mais próxima com os genes do genoma de *C. arabica*3 (var. Bourbon). A provável origem desse híbrido tetraploide fértil é a partir da fecundação de um gameta não reduzido de *C. canephora* com um gameta de *C. arabica* e posteriores eventos de retrocruzamentos com *C. arabica* (BETTENCOURT, 1973; LASHERMES *et al.*, 2000). Essa origem proposta para o HdT, corrobora para a maior similaridade de sequências encontradas entre o clone BAC e o genoma de *C. arabica*. Entretanto, os genótipos derivados do Híbrido de Timor apresentam alta diversidade genética (SETOTAW *et al.*, 2010).

CONCLUSÕES

1 - Neste trabalho foi caracterizada uma região genômica do HdT CIFIC 832/2, correspondente ao clone BAC 70-22F e potenciais genes com associação à resistência desse cafeeiro à *H. vastatrix* foram encontrados.

2 - Dentre esses genes, um gene se destacou, sendo ele um possível *receptor-like kinases* (RLK) com perfil de expressão correspondente a uma resposta de resistência pré-haustorial.

3 - As análises de expressão gênica mostraram um perfil de expressão coerente com os já apresentados para o patossistema *Coffea* – *H. vastatrix*.

4 - As análises filogenéticas desse gene demonstraram maior similaridade com o genoma da espécie *C. arabica*.

5 - Essas informações são relevantes para ampliar o conhecimento sobre genes de resistência do cafeeiro à *H. vastatrix* e auxiliará na melhor compreensão da diversidade genética em genótipos do HdT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVELINO, J.; CRISTANCHO, M.; GEORGIU, S.; IMBACH, P.; AGUILAR, L.; BORNEMANN, G.; LÄDERACH, P.; ANZUETO, F.; HRUSKA, A.J.; MORALES, C. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, v. 7, n. 2, p. 303-321. 2015.
- BETTENCOURT, A.J. Considerações sobre o “Híbrido de Timor”. Campinas: Instituto Agrônomo, 20p. (Circular nº 23). (1973).
- BETTENCOURT, A.J.; RODRIGUES JÚNIOR, C.J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases In: CLARKE, R.J. and MACRAE, R (Ed.). *Coffee: Volume 4 – Agronomy*. London: Elsevier Applied Science, cap. 6, p.199-234. (1988).
- CAÇÃO, S.M.B; SILVA, N.V.; DOMINGUES, D.S; VIEIRA, L.G.E.; DINIZ, L.E.C.; ALVEZ, C.S.G.; ANDRADE, A.C.; CARPETIERI-PIPOLO, V.; PEREIRA, L;F.P. Construction and characterization of a BAC library from the *Coffea arabica* genotype Timor Hybrid CIFIC 832/2. *Genetica*, v. 141, n. 4-6, p. 217-226. (2013).
- COFFEE GENOME HUB. Disponível em: <<http://coffee-genome.org/coffecanephora>> Acesso em 20 de março de 2018.
- DODDS, P.N.; RAFIQI, M.; GAN, P.H.P.; HARDHAM, A.R.; JONES, D.A.; ELLIS, E.G. Effectores of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist*. 183: 993-1000. 2009.
- EDWARDS, D.; BATLEY, J. Plant bioinformatics: from genome to phenome. *Trends in biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 232-237. (2004).
- ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; DUSSERT, S.; FERNANDEZ, D.; LASHERMES, P.; BERTRAND, B. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 38, n. 2, p. 129-138. (2002).
- FERNANDES-BRUM, C.N.; REZENDE, P.M.; RIBEIRO, T.H.C.; de OLIVEIRA, R.R.; de SOUZA CARDOSO, T.C.; do AMARAL, L.R. GOMES, M.S.; CHALFUN-JUNIOR, A. A genome-wide analysis of the RNA-guided silencing pathway in coffee reveals insights into its regulatory mechanisms. *PloS one*, v. 12, n. 4, p. e0176333. (2017).
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, v. 9, n. 1, p. 275-296. (1971).
- FLOREZ, J.C.; MOFATTO, L.S.; DO LIVRAMENTO, R.F.L.; FERREIRA, S.S.; ZAMBOLIM, E.M.; CARAZZOLLE, M.F.; ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E.T. High throughput transcriptome analysis of coffee reveals prehaustorial resistance in response to *Hemileia vastatrix* infection. *Plant Molecular Biology*, v. 95, p. 607-623. 2017.
- JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. *nature*, v. 444, n. 7117, p. 323. (2006).
- LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B.; COMBES, M. C.; DUSSERT, S.; GRAZIOSI, G.; ANTHONY, F. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). *Theoretical and applied genetics*, v. 100, n. 1, p. 139-146. (2000).
- MICHNO, J.M.; STUPAR, R.M. The importance of genotype identity, genetic heterogeneity, and bioinformatic handling for properly assessing genomic variation in transgenic plants. *BMC biotechnology*, v. 18, n. 1, p. 38. 2018.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em 20 de março de 2018.

- NORONHA-WAGNER, M.; BETTENCOURT, A. Genetic study of the resistance of *coffea* spp. to leaf rust: i. identification and behavior of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. Canadian Journal of Botany, v. 45, n. 11, p. 2021-2031. (1967).
- RAFIQI, M.; BERNOUX, M.; ELLIS, J.G.; DODDS, P.N. In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. In: Seminars in cell & developmental biology. Academic Press, p. 1017-1024. (2009).
- RAMIRO, D.A.; Escoute, J.; Petitot, A.S.; Nicole, M.; Maluf, M.P.; Fernandez, D. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. Plant Pathology, v. 58, n. 5, p. 944-955. (2009).
- RIBAS, A.F.; CENCI, A.; COMBES, M.C.; ETIENNE, H.; LASHERMES, P. Organization and molecular evolution of a disease-resistance gene cluster in coffee trees. BMC genomics, v. 12, n. 1, p. 240. (2011).
- SEKHWAL, M.; LI, P.; LAM, I.; WANG, X.; CLOUTIER, S.; YOU, F. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. International journal of molecular sciences, v. 16, n. 8, p. 19248-19290. (2015).
- SETOTAW, T.A.; TEXEIRA, C.E.; FERREIRA, P.G.; ZAMBOLIM, E.M.; PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, N.S. Breeding potential and genetic diversity of " Híbrido do Timor" coffee evaluated by molecular markers. Crop breeding and applied biotechnology, v. 10, n. 4, p. 298-304. (2010).
- SILVA, R.A.; ZAMBOLIM, L.; CASTRO, I.S.L.; RODRIGUES, H.S.; CRUZ, C.D.; CAIXETA, E.T. The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. Euphytica, v. 214, n. 9, p. 153. (2018).
- TALHINHAS, P.; BATISTA, D.; DINIZ, I.; VIEIRA, A.; SILVA, D.N.; LOUREIRO, A., TAVERES, S.; PEREIRA, A.P.; AZINHEIRA, H.G.; GUERRERA-GUINARÃES, L.; VÁRZEA, V.; SILVA, M.C. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. Molecular plant pathology, v. 18, n. 8, p. 1039-1051. (2017).
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. Tropical Plant Pathology, v. 41, n. 1, p. 1-8. (2016).
- WORLD COFFEE RESEARCH. Disponível em: <(https://worldcoffeeresearch.org/> Acesso em 20 de março de 2018.