



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE ARIYOSHI

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES E VALIDAÇÃO DE  
MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS À  
RESISTÊNCIA À FERRUGEM (*HEMILEIA VASTATRIX*) DO  
CAFEIEIRO**

---

Londrina  
2014

CAROLINE ARIYOSHI

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES E VALIDAÇÃO DE  
MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS À  
RESISTÊNCIA À FERRUGEM (*HEMILEIA VASTATRIX*) DO  
CAFEEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

A718a Ariyoshi, Caroline.

Análise transcricional de genes e validação de marcadores moleculares relacionados à resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro / Caroline Ariyoshi. – Londrina, 2014.  
71 f. : il.

Orientador: Luiz Filipe Protasio Pereira.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Café – Resistência a doenças e pragas – Aspectos genéticos – Teses. 2. Fungos-da-ferrugem – Teses. 3. *Hemileia vastatrix* – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. I. Pereira, Luiz Filipe Protasio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 631.52:633.73

CAROLINE ARIYOSHI

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES E VALIDAÇÃO DE  
MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA  
À FERRUGEM (*HEMILEIA VASTATRIX*) DO CAFEEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
– Embrapa

---

Prof. Dr. Juarez Pires Tomaz  
Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR

---

Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Londrina, 27 de março de 2014.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira pela constante orientação neste trabalho, pelas portas abertas, confiança depositada e amizade.

Ao Dr. Douglas Silva Domingues, por toda colaboração no trabalho.

Ao Dr. Gustavo Hiroshi Sera por ter cedido gentilmente o material vegetal utilizado no trabalho, além de ter ajudado na elaboração do projeto.

À todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia (LBI) do IAPAR por todo carinho e amizade, principalmente à Livia Maria Nogueira e Viviane Yumi Baba, as quais ajudaram substancialmente na evolução do trabalho.

Gostaria de agradecer também à Masako T. Braghinique que me recebeu tão gentilmente e atenciosamente no Instituto Agrônomo de Campinas/Centro de Café Alcides Carvalho.

E em especial "*in memoriam*" ao Dr. Valdir Diola, que possibilitou todo o embasamento do projeto e sempre foi extremamente solícito e gentil nas dicas e explicações para a elaboração do trabalho.

À minha família querida. Minha mãe Fátima, por ser o meu alicerce em todos os momentos. Meu pai Haisen, por ter sido sempre um exemplo a seguir em honestidade e caráter. Minha irmã Mirian, por ser a minha grande amiga nessa vida. E minha irmãzinha Lara, pela alegria e carinho.

Ao namorado Luis Gustavo Casarini pela paciência, carinho e dedicação.

À todas as amigas que me apoiaram durante minha caminhada: Helena Peggau de Góes, Gisela Lima da Fonseca, Maria Cecília Ferronato, Eveline Salvático e Juliana Bombarda.

À Deus.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, à Coordenadora Ana Lúcia Dias e a Secretária Suely Miranda.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná pela estrutura física e ao LBI pela oportunidade de colaboração com o projeto, aprendizado, amizades realizadas e crescimento não só profissional como pessoal.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Consórcio Pesquisa Café e Fundação Araucária pelo apoio financeiro neste projeto.

ARIYOSHI, C. **Análise transcricional de genes e validação de marcadores moleculares relacionados à resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café e possui o segundo maior mercado consumidor. Entre os principais objetivos do melhoramento genético de cafeeiros estão os estudos visando resistência de cultivares à ferrugem, doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Híbrido de Timor (HDT), uma planta derivada do cruzamento interespecífico natural entre *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, apresenta resistência à maioria das raças fisiológicas de *H. vastatrix*. Sendo as progênes de HDT estimadas nos programas de melhoramento. Com o objetivo de aumentar e auxiliar o conhecimento sobre os mecanismos de resistência a essa doença, foi feita a caracterização de genes relacionados ao *lôcus* de resistência e também a validação de marcadores moleculares SCARs relacionados à resistência à ferrugem, provenientes de HDT. Primeiramente foi verificada a amplificação de genes relacionados à resistência à ferrugem em clones BACs de HDT– CIFC 832/2. Pela técnica de PCR dois genes, *NBS-LRR* (sinalização) e *PR5* (resposta de defesa) foram amplificados no *lôcus* de resistência. A análise *in silico* de um dos BAC também detectou a presença do gene *NBS-LRR*. Através de qPCR a expressão diferencial de *NBS-LRR* e *PR5* foi avaliada nas cultivares resistente IAPAR 59 (com introgressão de HDT) e suscetível Catuaí Vermelho, ambas inoculadas com *H. vastatrix* raça II. *NBS-LRR* e *PR5* apresentaram picos de expressão significativamente maiores na cultivar IAPAR 59 72 h após a inoculação. Na validação dos marcadores SCARs foram utilizados dois pares de *primers* que flanqueiam um gene de resistência em uma distância de recombinação menor que 1,6 cM, previamente descritos na literatura. Foram avaliados genótipos derivados de IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98, IPR 104, IPR 107 e de uma geração F4 IAPAR 59 X (Etiópia x Catuaí), provenientes do programa de melhoramento do IAPAR. Entre 23 genótipos derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 107, IPR 97, IPR 98, IPR 104, somente 10 apresentaram amplificação, e 21 entre 22 amostras de F4 IAPAR 59 X (Etiópia x Catuaí). Os resultados demonstram a possibilidade do uso de Marcadores Moleculares em Seleção Assistida e reforçam a importância dos genes *NBS-LRR* e *PR5* para resistência à ferrugem em cafeeiros.

**Palavras-chave:** Híbrido de Timor. Seleção assistida por marcadores. Genes de resistências. IAPAR 59.

ARIYOSHI, C. **Transcriptional analysis of genes and validation of molecular markers associated with resistance to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) coffee**. 2014, 71 p. Dissertation (Master's Degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

Brazil is the major coffee producer and exporter in the world and has the second largest consumer market. Among the main objectives of coffee breeding programs are studies to improve cultivars resistant to rust, disease caused by the fungus *Hemileia vastatrix*. Timor Hybrid (HDT) a natural interspecific cross between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* shows resistant to most physiological races of *H. vastatrix*. Then the progenies of HDT are estimated in breeding programs. In order to enhance our understanding of the resistance mechanisms to this disease, we tried to identify genes linked to the resistant *locus* and also the validation of markers SCARs related to resistance to rust, from HDT. Amplification of genes related in resistance to rust in BAC clones HDT-CIFC 832/2, correlated with resistance *loci* was verified. Using PCR techniques, two resistant related genes, NBS-LRR (signaling) and PR5 (defense response), were amplified in BACs physical mapped to the rust resistance *loci*. The NBS-LRR was also detected *in silico* analysis of sequences of one BAC clone. Using qPCR we observed differential expression of genes NBS-LRR and PR5 in resistant cultivar IAPAR 59 (introgressed with HDT) when compared with the susceptible cultivar Catuaí Vermelho, both inoculated with *H. vastatrix*. NBS-LRR and PR5 showed significantly higher expression in IAPAR 59 at 72 h after inoculation. In the validation of the markers SCARs two pairs of primers flanking a resistance gene at a distance of less than 1.6 cM of recombination, previously described in the literature, were used. Genotypes derived from IAPAR 59, IPR 99, IPR 107, IPR 97, IPR 98, IPR 104 and one generation F4 IAPAR 59 X (Ethiopia x Catuaí) from IAPAR's coffee breeding program, were evaluated. Among 23 genotypes derived from IAPAR 59, IPR 99, IPR 107, IPR 97, IPR 98 and IPR 104 only 10 showed amplification, and 21 of 22 samples from F4 IAPAR 59 X (Ethiopia x Catuaí). The results show the possibility to use Molecular Marker in Assisted Selection into breeding programs, and also support the role of NBS-LRR and PR5 in rust resistance.

**Key-words:** Timor hybrid. Marker assisted selection. Resistance genes. IAPAR 59.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – A - Origem da espécie tetraploide de *C. arabica*, B - e de seus cultivares comerciais (VIDAL et al., 2010).....18
- Figura 2** – A- Mapa genético saturado por marcadores AFLP, B - Mapa genético de alta densidade pelos marcadores SCARs (DIOLA et al., 2011) .....25

### ARTIGO A

- Figura 1** – Relação do mapa físico e genético contendo marcadores associados a um gene de resistência à ferrugem em *C. arabica*. Esquema do ordenamento dos clones BAC com mais de um marcador identificado, segundo a ordem dos marcadores SCARs sobre o mapa genético. A barra superior indica os clones identificados (ex: clone 1b7; placa 1, na linha b na coluna 7). A barra inferior indica os marcadores SCARs identificados no clone BAC (DIOLA et al., 2011).....39
- Figura 2** – Amplificação dos genes *NBS-LRR* (A) e *PR5* (B) e ordenamento de seus respectivos clones BAC de amplificação em relação ao gene *R. M*, marcador; Colunas 1 a 8 clones BACs selecionados; 1) 4I13; 2) 149I17; 3), 73Q22; 4) 10L24; linhas 5, 14F3; linhas 6, 2F21; linhas 7, 15O18; 8, 115p12; B, controle negativo .....43
- Figura 3** – Acesso EU196037.1 depositado banco de dados *GenBank*. A sequência nucleotídica de 571 pb corresponde a um gene de sinalização pertencente à família *NBS-LRR* com domínio de ligação do tipo *TIR*.....44
- Figura 4** – Níveis de transcrição do gene *PR5* em cafeeiro em 0h, 24h, 48h e 72h pós-inoculação. Valores representam a média +/- erro padrão (n=3). Letras minúsculas comparam colunas do mesmo genótipo. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade .....46

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 5</b> – Níveis de transcrição do gene <i>NBS-LRR</i> em cafeeiros em 0h, 24h, 48h e 72h pós-inoculação. Valores representam a média +/- erro padrão (n=3). Letras maiúsculas comparam colunas de genótipos diferentes e letras minúsculas comparam colunas do mesmo genótipo. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ..... | 47 |
| <b>Figura 6</b> – Níveis de transcrição do gene <i>PR5</i> em cafeeiros em 0h, 24h, 48h e 72h pós-inoculação. Valores representam a média +/- erro padrão (n=3). Letras minúsculas comparam colunas do mesmo genótipo. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade .....  | 49 |
| <b>Figura 7</b> – Níveis de transcrição do gene <i>PR5</i> em cafeeiros em 0h, 24h, 48h e 72h pós-inoculação. Valores representam a média +/- erro padrão (n=3). Letras maiúsculas comparam colunas de genótipos diferentes e letras minúsculas comparam colunas do mesmo genótipo. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade .....     | 50 |
| <b>Figura 8</b> – Análise fenotípica de cultivares suscetível (A – Catuaí Vermelho) e resistente (B – IAPAR 59) à <i>H. vastatrix</i> em discos foliares. A presença de esporos indica o completo ciclo reprodutivo e a interação compatível planta/patógeno .....   | 50 |

## ARTIGO B

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Amplificação das marcas M19 e M20 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M, marcador; colunas 1-23, genótipos derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98, IPR 104 e IPR 107; colunas 24 e 26, Híbrido de Timor (832/1 e 832/2); colunas 25 e 27, amostras de Catuaí Vermelho; colunas 28 e 29, amostras de Mundo Novo; linha C, controle sem DNA; linha C+, controle positivo (clone BAC do genótipo Híbrido de Timor 832/2) ..... | 64 |
|---|----|

- Figura 2** – Amplificação das marcas M19 e M20 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M, marcador; colunas 1-22, amostras da geração F4 de IAPAR 59X(Etiópia x Catuaí); colunas 23, Híbrido de Timor 832/2; C+, controle positivo (clone BAC do genótipo HDT 832/2); C-, controle sem DNA .....66
- Figura 3** – Genótipos apresentando os aspectos de análise fenotípica: Catuaí Vermelho (A) e (C) como genótipo suscetível, IAPAR 59 (B) e (D) como genótipo resistente. A presença de esporos em (A) e (C) indica o completo ciclo reprodutivo e a interação compatível planta/patógeno.....67

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO A

- Tabela 1** – Relação dos *primers* desenhados para as sequências selecionadas dos genes relacionados a resistência à ferrugem em cafeeiro (DIOLA et al., 2013).....40
- Tabela 2** – Genótipos de cafeeiros e seus respectivos genes de resistência .....40
- Tabela 3** – Genótipos de cafeeiros e seus respectivos genes de resistência .....52

### ARTIGO B

- Tabela 1** – Relação entre genótipos derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98, IPR 104 e IPR 107 e ampliações para as marcas moleculares M19 e M20.....65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| AFLP              | Do inglês, <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>                  |
| ATP               | Adenosina trifosfato  |
| avr1-avr9         | Genes de avirulência  |
| BAC               | Do inglês, <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>                         |
| BLASTn            | Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide</i>            |
| C                 | Valor de expressão  |
| CC                | Do inglês, <i>Coil-Coiled</i>   |
| cDNA              | DNA complementar  |
| CIFC              | Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro                         |
| cM                | Centimorgan   |
| CONAB             | Companhia Nacional de Abastecimento                                       |
| Cq                | Do inglês, <i>Quantification cycles</i>                                   |
| CTAB              | Brometo de cetiltrimetilamônio  |
| DArTs             | Do inglês, <i>Diversity Arrays Technology</i>                             |
| DEPC              | Dietil policarbonato  |
| DNA               | Ácido desoxirribonucleico   |
| DNase             | Enzima desoxirribonuclease  |
| dntp              | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  |
| EST               | Do inglês, <i>Express Sequence Tags</i>                                   |
| FAO               | Do inglês, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| GAPDH             | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase                                     |
| GTP               | Guanosina trifosfato  |
| HR                | Reação de hipersensibilidade  |
| HDT               | Híbrido de Timor  |
| IAC               | Instituto Agrônomo de Campinas  |
| IAPAR             | Instituto Agrônomo do Paraná  |
| ICO               | Do inglês, <i>International Coffee Organization</i>                       |
| LRRs              | Do inglês, <i>Leucine-Rich Repeat</i>                                     |
| kb                | quilobase   |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de Magnésio   |
| MAPA              | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento                       |

|             |   |
|-------------|---|
| MIQE        | Do inglês, <i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i> |
| NBDs        | Do inglês, <i>Nucleotide Binding Domains</i>  |
| NBSs        | Do inglês, <i>Nucleotide Binding Sites</i>  |
| NCBI        | Do ingles, <i>National Center for Biotechnology Information</i>                                 |
| $p$         | P valor   |
| pb          | Pares de bases  |
| PCR         | Reação em cadeia da polimerase  |
| PR-proteins | Do inglês, <i>Pathogenesis-related proteins</i>   |
| qPCR        | PCR quantitativo em Tempo Real  |
| RAPD        | Do ingles, <i>Random Amplified Polymorphic</i>  |
| RE          | Taxa de expressão relativa  |
| RFLP        | Do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>                                      |
| RNA         | Ácido ribonucleico  |
| SCAR        | Do inglês, <i>Sequence Characterized Amplified Regions</i>                                      |
| SSR         | Do inglês, <i>Simple Sequence Repeats</i>   |
| SNPs        | Do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>  |
| STS         | Do inglês, <i>Sequence Tagged Sites</i>   |
| Sh1 - Sh9   | Genes de resistência  |
| TAE         | Tris-acido acetico EDTA   |
| TIR         | Do ingles, <i>Toll/Interleukin-1 receptor like</i>  |
| UFV         | Universidade Federal de Viçosa  |
| UV          | Ultravioleta  |
| VNTR        | Do inglês, <i>Variable Number of Tandem Repeats</i>   |
| v1-v9       | Genes de virulência   |
| YAC         | Do inglês, <i>Yeast Artificial Chromossome</i>  |

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 14 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 16 |
| 2.1      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 16 |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 17 |
| 3.1      | CAFÉ.....  | 17 |
| 3.1.1    | Aspectos Econômicos.....   | 17 |
| 3.1.2    | Características Botânicas do Cafeeiro .....  | 17 |
| 3.1.3    | A Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro .....  | 18 |
| 3.1.4    | Resistência do Cafeeiro à Ferrugem Alaranjada .....  | 20 |
| 3.1.4.1  | <i>Coffea arabica</i> cv. IAPAR 59 - origem e características .....  | 20 |
| 3.1.4.2  | <i>Coffea arabica</i> cv. catuaí vermelho – origem e características.....  | 21 |
| 3.2      | RESISTÊNCIA MOLECULAR À PATÓGENOS EM PLANTAS .....   | 21 |
| 3.3      | MARCADORES MOLECULARES .....   | 22 |
| 3.3.1    | Marcadores Moleculares Relacionados à Resistência à Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro .....  | 24 |
| 3.4      | CARACTERIZAÇÃO DE CLONES BACs DOS <i>LOCI</i> DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM .....  | 25 |
| <b>4</b> | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 27 |
| <b>5</b> | <b>ARTIGO A: ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE REGIÃO GÊNICA ENVOLVIDA NA RESISTÊNCIA À <i>H. Vastatrix</i> Em <i>C. Arabica</i></b> ..... | 34 |
| 5.1      | INTRODUÇÃO.....  | 37 |
| 5.2      | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 39 |
| 5.3      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 42 |
| 5.4      | CONCLUSÃO .....  | 51 |
| 5.5      | ANÁLISES EM ANDAMENTO .....  | 51 |
| 5.6      | REFERÊNCIAS .....  | 52 |

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| <b>6</b>  | <b>ARTIGO B: VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS À RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO CAFEIRO (<i>Hemileia vastatrix</i>) EM GENÓTIPOS COM INTROGRESSÃO DE HÍBRIDO DE TIMOR</b> ..... | <b>57</b> |
| 6.1   | INTRODUÇÃO.....  | 60        |
| 6.2   | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 61        |
| 6.3   | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 63        |
| 6.4   | CONCLUSÃO .....  | 67        |
| 6.5   | ANÁLISES EM ANDAMENTO .....  | 67        |
| 6.6   | REFERÊNCIAS .....  | 68        |
| <b>ANEXO</b> .....  |  | <b>70</b> |
| ANEXO A – Germinação de uredósporosde <i>H. vastatrix</i> raça II em água, evidenciando presença de haustórios, visualização em luz de microscópio..... |  | 71        |

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador de café no cenário mundial (ICO, 2014). A primeira estimativa para a produção da safra cafeeira em 2014 indica que o país deverá colher entre 46,53 e 50,15 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado. Dentre os Estados Brasileiros com maior produção destacam-se: Minas Gerais (55,01%), Espírito Santo (24,8%), São Paulo (9,2%), Bahia (4,2%), Rondônia (3,3%), e Paraná (1,3%) (CONAB, 2014).

Dentre os principais fatores responsáveis por interferir na eficiência do processo produtivo do cafeeiro estão a incidência de pragas e doenças, as deficiências nutricionais, o manejo inadequado das plantas (GARCIA et al., 2003), além de estresses ambientais, como o hídrico e térmico (CARVALHO et al., 2013).

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* BERK. et BROOME, é uma das mais importantes patologias do cafeeiro e afeta significativamente a produção mundial. O cultivo de grandes áreas com cafeeiros oferece um ambiente especial para a rápida evolução da ferrugem, e recentemente, novas raças com grande número de fenótipos suscetíveis têm sido detectadas no Brasil (CABRAL et al., 2009). Embora a ferrugem possa ser controlada através da aplicação de fungicidas, cultivares portadores de genes de resistência são mais econômicas e ambientalmente viáveis (ZAMBOLIM et al., 2003).

Com o objetivo de aumentar e auxiliar o conhecimento sobre os genes de resistência a essa doença, estudos para validação de marcadores e caracterização de sequências de *loci* relacionados à resistência à ferrugem em cafeeiros são de grande importância na redução do tempo para a detecção de genótipos superiores em programas de melhoramento.

Dentre uma série de trabalhos desenvolvidos para a identificação de marcadores relacionados à resistência à ferrugem, dois apresentam grande relevância. No primeiro estudo, Mahé et al. (2007) identificaram o gene de resistência  $S_h3$ , derivado de *Coffea liberica*. Enquanto que no segundo trabalho, Diola et al. (2011) observaram um gene  $S_h$  relacionado à resistência à raça II de ferrugem derivado de *C. arabica* Híbrido de Timor. Ambos os trabalhos trouxeram implicações potenciais na aplicação de estratégias de seleção para o melhoramento do cafeeiro, visando a resistência durável, além de abordarem estudos relacionados

à identificação, estrutura e função dos genes que codificam para a resistência ao patógeno.

Neste contexto, no presente estudo desenvolveu-se um trabalho de caracterização dos *loci* de resistência, através da análise de clones genômicos de BAC de Híbrido de Timor relacionados a um gene de resistência, e da análise de expressão diferencial do mesmo em diferentes genótipos. Também foram validados marcadores moleculares relacionados à região gênica de resistência à ferrugem em genótipos melhorados de *C. arabica* com introgressão de Híbrido de Timor.

## 2 OBJETIVOS

- Caracterizar os *loci* de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro.
- Validar marcadores moleculares relacionados à resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar genes presentes em clones BAC (Híbrido de Timor 832/2) relacionados aos *loci* de resistência e/ou de sinalização.
- Analisar a expressão de genes presentes nos *loci* de resistência à ferrugem identificados nos clones BACs (Híbrido de Timor 832/2) em genótipos resistentes e suscetíveis.
- Relacionar marcadores moleculares a análises fenotípicas de resistência à ferrugem do cafeeiro.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CAFÉ

##### 3.1.1 Aspectos Econômicos

O café é uma das culturas agrícolas mais importantes no mundo, com mais de 10 milhões de hectares de terras dedicadas à sua produção em regiões tropicais e subtropicais (FAO, 2011). O comércio global do café no ano de 2012 totalizou cerca de 144.5 milhões sacas de 60 Kg (MAPA, 2013) e movimentou cerca de 15,4 bilhões de dólares (ICO, 2012). De toda a produção mundial, o Brasil colaborou na última safra com 50.8 milhões de sacas de 60Kg. Deste total, cerca de 28.7 milhões de sacas (56.5%) foram exportadas e 20 milhões (39.7%) foram utilizadas para consumo interno (MAPA, 2013). Além do Brasil, Colômbia, Vietnã e Indonésia são os principais produtores e exportadores do produto. Além disso, a cultura também é importante para muitos países não tropicais, que são altamente envolvidos na industrialização e comércio do café, aliado ao fato de serem grandes consumidores da bebida (MONDEGO et al., 2011).

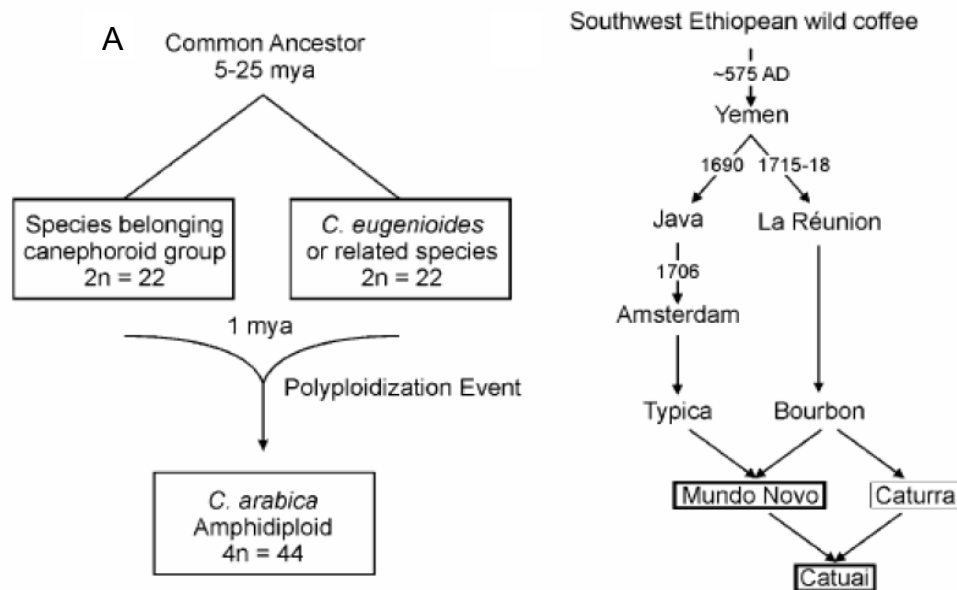
##### 3.1.2 Características Botânicas do Cafeeiro

O cafeeiro é uma planta arbustiva e perene do gênero *Coffea*, pertencente à família Rubiaceae. Foram descritas 124 espécies do gênero *Coffea* (DAVIS et al., 2011), mas a produção comercial do café envolve predominantemente duas espécies: *Coffea arabica* L. (70%) e *Coffea canephora* (Pierre ex Froehner), (30%). *C. arabica* destaca-se por apresentar melhor qualidade, proporcionando bebida de maior valor comercial e alcançando preços superiores aos de *C. canephora*. *C. arabica* é a única espécie tetraplóide do gênero ( $2n = 4x = 44$  cromossomos) e autógama. As demais espécies são diplóides ( $2n = 2x = 22$  cromossomos) e em sua maioria auto-incompatíveis (CARVALHO et al., 1985). *C. arabica* se originou na Etiópia, a partir da hibridização natural entre duas espécies ancestrais diplóide, *C. eugenioide* e provavelmente *C. canephora* (ambas  $2n = 22$ ) (LASHERMES et al., 1999). No híbrido resultante teria ocorrido uma duplicação do número de cromossomos, originando uma nova planta tetraploide com  $2n = 4x =$

44. Cultivares de *C. arabica* derivam, na grande maioria, das variedades Typica e Bourbon (oriunda da ilha do mesmo nome), originalmente introduzidas no Brasil em 1727 e 1859, respectivamente (ANTHONY et al., 2001). Com isso, a base genética das cultivares comerciais é bastante limitada e a diversidade molecular observada entre elas é baixa (ANTHONY et al., 2002, STEIGER et al., 2002). A recente origem alotetraplóide e a biologia da reprodução de *C. arabica* também influenciam a base genética estreita (VIDAL et al., 2010).

*C. arabica* é uma planta de clima tropical úmido, de temperaturas amenas, que encontra no Brasil extensas áreas apropriadas para seu cultivo (TOMAZIELLO et al., 1996).

**Figura 1** – A – Origem da espécie tetraploide de *C. arabica*, B - e de seus cultivares comerciais (VIDAL et al., 2010).



### 3.1.3 A ferrugem Alaranjada do Cafeeiro

Pela sua importância socioeconômica, o cultivo do café expandiu-se por quase todas as regiões tropicais do planeta. No entanto, o avanço de áreas de plantio e a monocultura trouxeram alguns problemas relevantes de ordem biológica e econômica, dentre eles, destacam-se os prejuízos provocados por doenças. A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *H. vastatrix* é uma das mais importantes patologias do cafeeiro. Mais de 75% das plantações do mundo são cultivadas com cultivares suscetíveis ao ataque das principais raças fisiológicas

do patógeno, que quando não controlada, provoca perdas que se situam entre 30 a 50% da produção (ZAMBOLIM et al., 2002). O fungo foi inicialmente observado na África e na Ásia e espalhou-se por quase todas as áreas de cultivo, exceto Austrália e Havaí. No Brasil, a doença foi diagnosticada em 1970. Nos novos locais, a pressão de seleção provocada pelo ambiente sobre o patógeno acelerou a evolução e a formação de raças variantes. Este processo se acentuou mais em locais de uso contínuo de defensivos com princípios ativos iguais ou similares e nos plantios em larga escala de genótipos de baixa divergência genética (SILVA et al., 2006). Atualmente o fungo apresenta 45 raças fisiológicas identificadas (VARZEA et al., 2002). No Brasil, um estudo prévio identificou 14 raças, sendo a raça II mais amplamente distribuída (CABRAL et al., 2009).

Estudos sobre a herança da resistência à ferrugem realizados no CIFC – Portugal demonstraram que a hipótese de Flor (1971) da teoria gene-a-gene é aplicável à interação cafeeiro-*H. vastatrix*. Para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a virulência, denominado gene *vr*. No caso da ferrugem do cafeeiro, a resistência completa é condicionada por pelo menos nove genes dominantes de efeito maior ( $S_h1 - S_h9$ ) com os respectivos genes de virulência (*vr1 - vr9*) (BETTENCOURT et al., 1980; BETTENCOURT, 1981).

A resistência à ferrugem dos cafeeiros vem sendo quebrada pelo surgimento de novas raças, o que dificulta a obtenção de cultivares com resistência completa e durável (SERA et al., 2010). No final de 2012, Costa Rica, México e Nicarágua declararam estado de emergência devido às perdas incomuns causadas pela ferrugem do cafeeiro (CRESSY, 2013). Recentemente a informação da quebra de resistência de HDT832 / 1 e HDT832 / 2 em um germoplasma indiano (PRAKASH et al., 2010), ilustra a rápida evolução e grande variabilidade genética de *H. vastatrix*.

Desta forma, para assegurar a produtividade e aumentar o poder competitivo, é necessário buscar soluções para problemas que prejudicam a cafeicultura. Considerando que em média 10 anos são necessários para a produção de uma nova variedade de cafeeiro, a caracterização molecular detalhada de respostas de defesa da planta à ferrugem representa uma necessidade urgente para futuros trabalhos de aplicação em programas de melhoramento.

### 3.1.4 Resistência do Cafeeiro à Ferrugem Alaranjada

Os genes de resistência à ferrugem  $S_h1$ ,  $S_h2$ ,  $S_h4$  e  $S_h5$  foram identificados em *C. arabica* puros de origem etíope. O gene  $S_h3$  é considerado como derivado de *C. liberica*, enquanto  $S_h6$ ,  $S_h7$ ,  $S_h8$  e  $S_h9$  são oriundos de *C. canephora* (BETTENCOURT; RODRIGUES JR, 1988).

As cultivares comerciais Typica, Bourbon, Caturra, SL 28 e centenas de outras introduções de *C. arabica* provenientes de diversas origens, incluindo a Etiópia, mostraram-se suscetíveis a *H. vastatrix*, mais especificamente à raça fisiológica II (D'OLIVEIRA e RODRIGUES JR, 1961).

Porém, um provável híbrido natural entre *C. canephora* e *C. arabica*, com resistência ao fungo, foi encontrado na Ilha de Timor, na década de 1940/49, na plantação de *C. arabica* cv. Typica. A planta original foi designada com o nome de Híbrido de Timor (HDT). Estudos sobre a herança da resistência à ferrugem realizados no CIFC verificaram que se tratava de um material valioso para o programa de melhoramento, devido ao fato de mostrar-se resistente a todas as raças de *H. vastatrix* conhecidas até então (BETTENCOURT, 1973; BETTENCOURT e RODRIGUES JR, 1988; RODRIGUES JR et al., 2004).

Além dos genes  $S_h$  já identificados ( $S_h1$  -  $S_h9$ ), é provável que existam outros genes  $S_h$  em derivados de Híbrido de Timor (BETTENCOURT et al., 1992; VÁRZEA e MARQUES, 2005). E em adição à resistência completa promovida pelos genes maiores citados anteriormente, também foi observada a resistência incompleta devido à presença de um ou poucos genes menores em plantas de Icatu e HDT (ESKES et al., 1990).

Outras espécies diplóides de *Coffea*, como *C. congensis*, *C. dewevrei* e *C. liberica*, são fontes de introgressão de resistência à ferrugem em programas de melhoramento (BETTENCOURT e RODRIGUES JR, 1988). A linha S.288 é um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. liberica* (VISHVESHWARA, 1974).

#### 3.1.4.1 *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 - origem e características

Esta cultivar originou-se do cruzamento entre a cultivar Villa Sarchi CIFC 971/10 e o Híbrido de Timor CIFC 832/2 realizado no CIFC, em Portugal. Em ensaios conduzidos no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), a progênie da

geração F4 deu origem a cultivar IAPAR 59. Apresenta porte baixo e frutos vermelhos com maturação medianamente precoce, boa qualidade da bebida e alta produtividade. Além disso, *C. arabica* cv. IAPAR 59 possui resistência duradoura à ferrugem do cafeeiro há mais de 30 anos (CARVALHO, 2008).

#### 3.1.4.2 *Coffea arabica* cv. catuaí vermelho – origem e características

Esta cultivar é o produto da recombinação de um cruzamento artificial entre cafeeiros selecionados pela produtividade, das cultivares de *C. arabica* Caturra Amarelo IAC 476-11 e Mundo Novo IAC 374-19, realizado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, SP. Apresenta porte baixo e frutos vermelhos, possuem elevado vigor, boa qualidade da bebida e alta produtividade, porém é suscetível à ferrugem e aos nematóides (CARVALHO, 2008).

### 3.2 RESISTÊNCIA MOLECULAR À PATÓGENOS EM PLANTAS

A resistência em plantas pode estar associada com processos de indução pelo reconhecimento do patógeno seguido de rápida reação de hipersensibilidade (HR, hypersensitive response) (AGRAWAL e FISHBEIN, 2006), que leva à morte celular confinada às células atacadas e às suas adjacentes, objetivando a morte do patógeno invasor e impedir a progressão da doença (ROURKE et al., 2006).

A resposta de defesa das plantas ao patógeno, raça-específica, se dá a partir do momento em que a planta reconhece um particular produto do patógeno codificado pelo gene de avirulência, genes *avr*. Os produtos do gene de avirulência abrangem um grupo de moléculas coletivamente chamadas elicitores ou efetores, que podem ser peptídeos ou proteínas, derivado de ácidos graxos, esteróis ou outras substâncias químicas de baixo peso moleculares (WANG et al., 2009), com estruturas diversas e que elicitam a resposta de defesa em baixas concentrações (YAMAGUCHI et al., 2000; PECK, 2003). Após detectarem a presença do patógeno, as plantas respondem ao ataque através da indução de proteínas de defesa que inibem o desenvolvimento do patógeno pela hidrólise enzimática das paredes celulares do fungo e ou pela biossíntese de compostos

antimicrobianos (SILVA et al., 2006; GUZZO et al., 2009), e fitoalexinas (FERRARI et al., 2007).

O mecanismo de percepção que contém receptores, geralmente localiza-se na superfície celular e são as proteínas R codificadas por genes R, que são específicas a cada elicitor (PONTIER et al., 2002; WANG et al., 2009). Das cinco classes estruturais de proteínas R, duas maiores são aquelas que contém domínios de ligação aos nucleotídeos (*NBDs*, *Nucleotide Binding Domains* ou *NBSs*, *Nucleotide Binding Sites*) e repetições ricas em leucina (*LRRs*, *leucine-rich repeat*)(WANG et al., 2008). O *NBS* é conservado e está envolvido nos eventos da cascata de transdução pela fosforilação com ATP ou GTP (DANGL e JONES, 2001; BENT e MACKEY, 2007). O *LRR* é um domínio conservado com regiões hipervariáveis e está envolvido no reconhecimento do patógeno. As duas classes de *NBS-LRR* podem ser divididas pela presença de domínios adicionais, como o domínio *TIR* (*Toll/Interleukin-1 receptor like*) e ou um domínio *CC* (*coil-coiled*), na sequência amino-terminal (BELKHADIR et al., 2004; KOORNNEEF e PIETERSE, 2008). Ambos os domínios *TIR* e *CC* estão supostamente envolvidos em interações proteína-proteína e de transdução de sinal (JEBANATHIRAJAH et al., 2002; MCDOWELL e WOFFENDEN, 2003).

### 3.3 MARCADORES MOLECULARES

Dentre outros fatores, o sucesso do aumento da produção agrícola no mundo inteiro depende da seleção de variedades mais adaptadas aos ambientes de cultivo. O aumento da eficiência de seleção, a melhor caracterização do germoplasma e a maximização de ganhos por seleção são objetivos dos programas de melhoramento, onde os marcadores moleculares podem ter um papel preponderante.

O polimorfismo genético ocorre quando sequências pertencentes ao mesmo *locus* são representadas em uma espécie por duas ou mais formas alélicas diferentes entre si (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2006). O polimorfismo entre dois ou mais indivíduos pode ser detectado por marcadores moleculares através da expressão de uma característica como uma proteína ou um fragmento de DNA que pode ou não codificar um gene.

Com o desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular viabilizou-se a seleção de indivíduos através do genótipo, isto é, através das variantes detectadas ao nível do DNA. Uma das vantagens dos marcadores moleculares sobre os morfológicos está no fato de que os últimos resultam da expressão de um ou mais genes podendo ser influenciados por fatores ambientais. Os marcadores moleculares, por sua vez, detectam o polimorfismo sem sofrer a influência ambiental, além de poder ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade existente no DNA e assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, a natureza do marcador (dominante ou co-dominante), o custo, a facilidade de uso, a consistência e a repetibilidade, características importantes na escolha do marcador a ser utilizado (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2006).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA (MILACH, 1998). Dentre aqueles que são identificados por hibridização estão os marcadores *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), os minissatélites ou *VNTR* (*Variable Number of Tandem Repeats*) e os *DARs* (*Diversity Arrays Technology*). Já aqueles identificados por amplificação de DNA, ou seja, baseados em PCR, pode-se citar os marcadores *RAPD* (*Random Amplified Polimorphic DNA*), *SCAR* (*Sequence Characterized Amplified Regions*), *STS* (*Sequence Tagged Sites*) Microsatélites ou *SSR* (*Short Tandem Repeats*), *AFLP* (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*), entre outros.

O *SCAR* é um marcador molecular co-dominante, que pode ser identificado por PCR. Em geral, os marcadores *SCARs* são amplificados a partir de *primers* obtidos da conversão de outros marcadores derivados da PCR, como os *RAPDs* e os *AFLPs*.

Desenvolvido em meados da década de 1990 (ZABEAU e VOS, 1993; VOS et al., 1995), o *AFLP* baseia-se na obtenção e análise de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição e etapas seletivas de amplificação por PCR, sendo um tipo de marcador dominante, ou seja, impossibilita a distinção entre o homocigotos e heterocigotos. Enquanto *oprimers* de *AFLP* é

dependente de restrição enzimática, passível de imperfeições e apenas 3 bases seletivas para amplificação, os *primers SCARs*, com média de 20 pb, aumentam o poder de resolução dos marcadores *AFLP*. A diminuição das distâncias genéticas entre os mapas de marcadores *AFLP* e *SCARs* é resultante da especificidade do *amplicon*, que possibilita identificar genótipos polimórficos positivos para os marcadores anteriormente não detectados pelas técnicas *AFLP*.

O melhoramento genético clássico de cafeeiros visando a obtenção de cultivares resistentes, por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil, é lento. Portanto técnicas que facilitem e acelerem a seleção de genótipos superiores são necessárias (TEIXEIRA-CABRAL et al., 2004). As técnicas da biologia molecular são instrumentos promissores para reduzir o tempo de obtenção das novas cultivares e aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (SERA et al., 2002; FAZUOLI et al., 2005).

Além da aplicação direta para estudos moleculares de identificação de genes de resistência, os marcadores *SCARs* possuem um elevado potencial para uso em programas de melhoramento genético assistido por marcadores (BERALDO et al., 2009). Podem ser utilizados para monitoramento de genes em métodos de retrocruzamento ao longo de gerações, visando a resistência da raça específica em cultivares de alta desempenho produtivo, contribuindo efetivamente nos programas de melhoramento em café, aumentando a eficiência e reduzindo o tempo de seleção.

### 3.3.1 Marcadores Moleculares Relacionados à Resistência à Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro

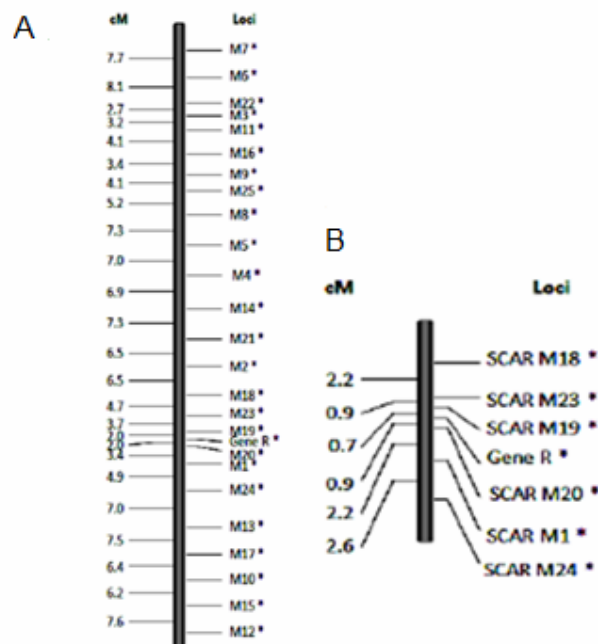
A identificação molecular dos genes de resistência é uma tarefa necessária, pois gera informações úteis para sua aplicação imediata e consequente aceleração dos métodos de melhoramento convencional. Embora a resistência da ferrugem tenha sido amplamente estudada e documentada, a elaboração de estratégias que envolvam o uso de marcadores moleculares é incipiente (HERRERA et al., 2009). Em espécies do gênero *Coffea*, onde as informações disponíveis são muito escassas em nível molecular, a obtenção de marcadores ligados à resistência à principal doença desta cultura pode auxiliar tanto os programas de melhoramento

assistido, quanto o estabelecimento de estratégias de clonagem gênica (DIOLA et al., 2011).

Já foram identificadas marcas associadas ao gene de resistência à ferrugem  $S_{H3}$  reportados por Prakash et al., 2004 e Mahé et al., 2008. No primeiro estudo foram identificados 21 marcadores moleculares e no segundo estudo, os marcadores foram transformados em SCARs.

Em uma avaliação feita por Diola et al., (2011) de uma população F2 UFV 421-4 (Híbrido de Timor x Catuaí) com 224 cafeeiros segregantes para um gene que confere resistência a raça II de *H. vastatrix*, foi obtido um mapa genético inicial com 25 marcadores AFLP que possibilitou a elaboração do mapa físico de alta densidade com 6 marcadores SCARs delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM flanqueando o gene de resistência a 0,7 e 0,9 cM (Figura 2).

**Figura 2** – A - Mapa genético saturado por marcadores AFLP, B - Mapa genético de alta densidade pelos marcadores SCARs (DIOLA et al. 2011).



### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DE CLONES BAC DOS LOCI DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM

Os mapas físicos, associadas aos mapas genéticos, possibilitam identificar genes e *clusters* gênicos de interesse presentes nos BACs (Cromossomo Artificial de Bactéria) e YACs (Cromossomo Artificial de Levedura), por técnicas de clonagem baseadas em mapeamento.

Devido à facilidade de manipulação, bibliotecas BACs têm sido preferencialmente utilizadas por vários grupos de pesquisa para servir de suporte a projetos de mapeamento físico assim como complementação de projetos de sequenciamento genômico em *Arabidopsis thaliana* (MOZO et al., 1998, 1999) arroz (WANG et al., 1995), trigo ([http://wheat.pw.usda.gov/Physical Mapping /index.html](http://wheat.pw.usda.gov/Physical%20Mapping/index.html)) e milho (<http://www.maizemap.org>). Bibliotecas BAC de café foram construídas tanto para *C. arabica* (NOIR et al., 2004; CAÇÃO et al., 2013), quanto para *C. canephora*(LEROY et al., 2005).

As sequências de um total de 13 clones BAC abrangendo os *loci* Sh3 em 3 genomas de café (*C. eugenioides* e *C. canephora* como subgenomas do alotetraplóide *C. arabica* e o genoma de *C. canephora*), foram examinados para a presença de genes de resistência usando anotações previamente determinadas (CENCI et al., 2010). Um total de cinco, três, e quatro genes de resistência foram identificados em *C. eugenioides* e *C. canephora* como subgenomas de *C. arabica* e em *C. canephora*, respectivamente (RIBAS et al., 2011).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR (Londrina – PR), concluiu a construção de uma biblioteca BAC de *C. arabica* Híbrido de Timor 832/2, com cerca de 55 mil clones e cobertura de 5,5 vezes do genoma (CAÇÃO et al., 2013). A partir desta biblioteca obteve-se um mapa genético construído com marcadores *SCARs* para a ferrugem do cafeeiro que orientou a construção do *contig* com 4,7 cM e ~ 360 kb, obtido pelo ordenamento de 5 clones BAC que continham simultaneamente a presença de dois marcadores. Foram isolados dois clones BAC portadores dos marcadores que flanqueiam o gene de resistência compreendendo uma região de ~ 120 kb (DIOLA et al., 2011). Esses BACs foram sequenciados, possibilitando a identificação de *loci* de resistência e a produção de novas marcas moleculares a serem reintegradas no mapeamento genético.

#### 4 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. A.; FISHBEIN, M. Plant defense syndromes. **Ecology Supplement**. v.87(7), p.132–149, 2006.
- ANTONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**. v.118, p. 53-65, 2001.
- ANTHONY, F.; COMBES, M. C.; ASTORGA, C.; BERTRAND, B.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by *AFLP* and *SSR* markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v.104, p.894–900, 2002.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J. L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**. v.7 p.391-399, 2004.
- BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors effectors and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review Phytopathology**. v.45, p.399-436, 2007.
- BERALDO, A. L. A.; COLOMBO, C. A.; CHIORATO, A. F.; ITO, M. F.; CARBONELL, S. A. M. Aplicação de marcadores *SCARs* para seleção de linhagens resistentes à antracnose em feijoeiro. **Bragantia**.v. 68, n.1, p. 53-61, 2009.
- BETTENCOURT, A.J. Considerações sobre o “Híbrido de Timor”. Instituto Agrônomo de Campinas. Circular. N° 23, p. 20, 1973.
- BETTENCOURT, A. J.; NORONHA-WAGNER, M.; LOPES, J. Fator genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. **Broteria Genética**. v. 77, p. 53-58, 1980.
- BETTENCOURT, A. J. Melhoramento genético do cafeeiro: transferência de fatores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L. Tese de Doutorado, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Lisboa, Portugal. 1981.
- BETTENCOURT, A. J.; RODRIGUES, J. R. C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. **Elsevier Applied Science In: Clarke, R. J.; Macrae, R. (Eds) Coffee Agronomy**, v. 4, p. 199–234, 1988.
- BETTENCOURT, A. J.; LOPES, J.; PALMA, S. Factores genéticos que condicionam a resistência às raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. dos clones-tipos dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de Híbrido de Timor. **Brotéria Genética**. v.13, n.80, p.185–194, 1992.
- CABRAL, P. G. C.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; LELIS, T. P.; CAPUCHO, A. S.; CAIXETA, E. T. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**. v.4, p.129-130, 2009.

- CAÇÃO, S. M. B.; SILVA, N. V.; DOMINGUES, D. S.; VIEIRA, L. G. E.; DINIZ, L. E. C.; VINECKY, F.; ALVES, G. S. C.; ANDRADE, A. C.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; PEREIRA, L. F. P. Construction and characterization of a BAC library from the *Coffea arabica* genotype Timor Hybrid CIFC 832/2. **Genética**. v. 141, p. 217- 226, 2013.
- CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; GARCIA, J. E.; RINALDI, D. A. Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares. p.1-3. In: CARPENTIERI-PÍPOLO V. e GARCIA J. E (Ed) Biotecnologia na Agricultura: aplicações e biossegurança. Coodetec, 2006.
- CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H. P.; FAZUOLI, L. C. Evolução e melhoramento do cafeeiro. In: AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MARTINS, P.S.; BANDEL, G. (Ed) Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP, Brasil, p. 215-235, 1985.
- CARVALHO, C. H. S.; Cultivares de Café Arábica de Porte Baixo. In: CARVALHO, C. H. S. Cultivares de café: origem, características e recomendações. Embrapa Café, Brasília, DF. p.27- 334. 2008.
- CARVALHO, K.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DOS SANTOS, T. B.; DE SOUZA, S. G. H.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P.; DOMINGUES, D. S. Nitrogen starvation, salt and heat stress in Coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and validation of new genes for qPCR normalization. **Molecular Biotechnology**. v. 53, p. 315–325, 2013.
- CENCI, A.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. Comparative sequence analyses indicate that *Coffea* (Asterids) and *Vitis* (Rosids) derive from the same paleo-hexaploid ancestral genome. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 283(5), p.493-501, 2010.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da Safra Brasileira Café, v. 1- Safra 2014, n. 1 - Primeiro Levantamento, Janeiro/2014.
- CRESSY, D. Coffee rust regains foothold researchers marshal technology in bid to thwart fungal outbreak in Central America. **Nature**. p.493-587, 2013.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**. v.411, p.826-833, 2001.
- DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M. F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 167, p. 357- 377, 2011.
- DIOLA, V.; BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; SAKIYAMA, N. S.; LOUREIRO, M. E. High – density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics & Genomes**. v.7, p.1199-1208, 2011.
- D'OLIVEIRA, A.; RODRIGUES JR, C. J. 1961. O problema das ferrugens do cafeeiro. **Revista do Café Português**. v. 8, p.5-50, 1961.
- ESKES, A. B.; HOOGSTRATEN, J. G. J.; TOMA-BRAGINI, M.; CARVALHO, A. Race-specificity and inheritance of incomplete resistance to coffee leaf rust in some

Icatu coffee progenies and derivatives of Híbrido de Timor. **Euphytica**. v. 47, p.11-19. 1990.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Site: <https://www.fao.org.br/>. 2011.

FAZUOLI, L. C.; OLIVEIRA, A. C. B.; TOMA-BRAGUINI, M.; SILVAROLLA, M. B. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at the IAC. p.137-185 In: ZAMBOLIM, L. (Ed) Durable resistance to coffee leaf rust. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 2005.

FAZUOLI, L.C.; BRAGHINI, M. T.; SILVAROLLA, M. B.; DE OLIVEIRA, A. C. B. A ferrugem alaranjada do cafeeiro e a obtenção de cultivares resistentes. **O Agrônômico – Campinas**. v.59(1), p. 48 – 53, 2007.

FERRARI, S.; GALLETTI, R.; DENOUX, C.; DE LORENZO, G.; AUSUBEL, F. M.; DEWDNEY J. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires phytoalexin deficiente. **Plant Physiology**. v.44, p.367-379, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3<sup>o</sup> ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, p.220, 1998.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**. v.9, p.275-296. 1971.

GARCIA, D.J.; POZZA, E.A.; POZZA, A.A.A.; SOUZA, P.E.; CARVALHO, J.G.; BALIERO, A.C. Incidência e severidade da cercosporiose-do-cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**. v.28, n.3, p.286-291, 2003.

GUZZO, S. D.; HAKAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee gene expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal Phytopathology**. v.1, p.1-14, 2009.

HERRERA, J. C.; ALVARADO, G.; CORTINA, H.; COMBES, M. C.; ROMERO, G.; LASHERMES, P. Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. **Euphytica**. v. 167, p. 57-67, 2009.

ICO - International Coffee Organization. As estatísticas do comércio do Café. Site: [www.ico.org](http://www.ico.org). 2012, 2014.

JEBANATHIRAJAH, J. A.; PERI, S.; PANDEY, A. Toll and interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing proteins in plants: a genomic perspective. **TRENDS in Plant Science**. v.7, n.9, p.388-391, 2002.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. J. Cross talk in defense signaling. **Plant Physiology**. v.146, p.839–844, 2008.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular General Genetics**. v.261, p. 259–266, 1999.

LEROY, T.; MARRACCINI, P.; DUFOUR, M.; MONTAGNON, C.; LASHERMES, P.; SABAU, X.; FERREIRA, L. P.; JOURDAN, I.; POT, D.; ANDRADE, A. C.; GLASZMANN, J. C.; VIEIRA, L. G. E.; PIFFANELLI, P. Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. **Theoretical Applied Genetics**. v.111, p.1032-1041, 2005.

MAHÉ, L.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. Comparison between a coffee single copy chromosomal region and Arabidopsis duplicated counterparts evidenced high level synteny between the coffee genome and the ancestral Arabidopsis genome. **Plant Molecular Biology**. v.64(6), p.699-711, 2007.

MAHÉ, L.; COMBES, M. C.; VÁRZEA, V. M. P.; GUILHAUMON, C.; LASHERMES, P. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica*). **Molecular Breeding**. v. 21, p.105–113, 2008.

MAPA - Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Site: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). 2013.

MCDOWELL, J. M.; WOFFENDEN, B. J. Plant disease resistance genes: recente insights and potential applications. **TRENDS in Biotechnology**. v.21, n.4, p.178-183, 2003.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 5, p.14-17, 1998.

MONDEGO, J. M. C.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; TOKUDA, E. K.; PARIZZI, L. P.; COSTA, G. G. L.; PEREIRA, L. F. P.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, G. A. G. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**. v.11, n.30, p.1-22, 2011.

MOZO, T.; FISCHER, S.; MEIER-EWERT, S.; LEHRACH, H.; ALTMANN, T. Use of the IGF BAC library for physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. **The Plant Journal**. v.16, n.3, p.377-384, 1998.

MOZO, T.; DEWAR, K.; DUNN, P.; ECKER, J. R.; FISCHER, S.; KLOSKA, S.; LEHRACH, H.; MARRA, M.; MARTIENSSEN, R.; MEIER-EWERT, S.; ALTMANN, T. A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. **Nature Genetics**. v. 22, p.271-275, 1999.

NOIR, S.; PATHEYRON, S.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P.; CHALHOUB, B. Construction and characterization of a BAC library for genome analysis of the allotetraploid coffee species (*Coffea arabica* L.) **Theoretical Applied Genetic**. v.109, p. 225-230, 2004.

- PECK, S. C. Early phosphorylation events in biotic stress. **Current Opinion in Plant Biology**. v.6, p.334-338, 2003.
- PONTIER, D.; MITTLER, R.; LAM, E. Mechanism of cell death and disease resistance induction by transgenic expression of bacterio-opsin. **Plant Journal**. v. 30, p.499-509, 2002.
- PRAKASH, N. S.; MARQUES, D. V.; VARZEA, V. M. O.; SILVA, M. C; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. **Theoretical Applied Genetics**. v.109, p.1311-1317, 2004.
- PRAKASH, N.; BHAT, S. S.; HANUMANTHA, B. T.; VÁRZEA, V. M. P.; MARQUES, D.; SILVA, M. C. & JAYARAMA. Break down of rust resistance in some HDT introductions and its derivatives in India—new challenges for Arabica coffee breeding in the light of increasing pathogen virulence. (Poster apresentado no 23º International Conference on Coffee Science (ASIC), 3–8 Outubro 2010, Bali).
- RIBAS, A.; 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, p.240, 2011.
- RODRIGUES JR, C. J.; GONÇALVES, M. M.; VÁRZEA, V. M. P. Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. *Revista de Ciências Agrárias* v.27, n. 24, p. 203-216, 2004.
- ROURKE, D. O.; BABAN, D.; DEMIDOVA, M. Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. **Genome Research**. v.16, p.1005-1016, 2006.
- SERA, T.; ALTEIA, M. Z.; PETEK, M. R. Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). p.217-251In: ZAMBOLIM, L. (Ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 2002.
- SERA, G. H.; SERA, T.; ITO, D. S.; FONSECA, I. C. B.; KANAYAMA, F. S.; DEL GROSSI, L.; SHIGUEOKA, L. H. Seleção para a resistência à ferrugem em progênies das cultivares de café IPR 99 e IPR 107. **Bragantia**. v. 69, n. 3, p547-554, 2010.
- SILVA, M. C.; VÁRZEA, V.; GUIMARÃES, L. G.; AZINHEIRA, H. G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A. S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee Berry disease. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v.18, n.1, p.199-147, 2006.
- STEIGER, D. L.; NAGAI, C.; MOORE, P. H.; MORDEN, C. W.; OSGOOD, R. V.; MING, R. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. **Theoretical Applied Genetics**. v.105, p. 209–215, 2002.
- TEIXEIRA-CABRAL, T. A.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A. A.; BARROS, E. G.; SILVA, D. G. Characterization of differential coffee tree hosts for

*Hemileia vastatrix* Berk. et Br. with RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.4, p.68-73, 2004.

TOMAZIELLO, R. A.; OLIVEIRA, E. G.; TOLEDO FILHO, J. A.; COSTA, T. E. Cultura do Café. 2° ed. Campinas: CATI, Boletim Técnico, v. 193, p. 69, 1996.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES JR, C. J.; SILVA, M. C.; GOUVEIA, M.; MARQUES, D. V.; GUERRA - GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: ZAMBOLIM, L. (Ed) O estado da arte da tecnologia na produção de café. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. p. 270-320, 2002.

VÁRZEA, V.M.P.; MARQUES, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M.; VÁRZEA, V.M.P. (Ed) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. p.53-74, 2005.

VISHVESHWARA, S. Periodocity of hemileia in arabica selection – S 795. **Indian Coffee**. v.38, p.49-5, 1974.

VIDAL, R. O.; MONDEGO, J. M. C.; POT, D.; AMBRÓSIO, A. B.; ANDRADE, A. C.; PEREIRA, L. F. P.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; CARAZZOLLE, M. F. ; PEREIRA, G. A. G. A High-Throughput Data Mining of Single Nucleotide Polymorphisms in *Coffea* Species Expressed Sequence Tags Suggests Differential Homeologous Gene Expression in the Allotetraploid *Coffea arabica* L. **Plant Physiology**. v. 154, p. 1053-1066, 2010.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **NucleicAcids Research**. v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WANG, G. L.; HOLSTEN, T. E.; SONG, W. Y.; WANG, H. P.; RONALD, P. C. Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the *Xa-21* disease resistance locus. **The Plant Journal**. v.7, p.525-533, 1995.

WANG, G.; ELLENDORFF, U.; KEMP, B.; MANSFIELD, J. W.; FORSYTH, A.; MITCHELL, K.; BASTAS, K.; LIU, C. M.; WOODS-TOR, W.; ZIPFEL, C. A Genome-Wide Functional Investigation into the Roles of Receptor-Like Proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v.147, p.503-517, 2008.

WANG, S.; RAO, P.; YE, X. Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. **Applied Microbiology for Biotechnology**. v.82, p.79–86, 2009.

YAMAGUCHI, T.; ITO, Y.; SHIBUYA, N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. **Trends Glycoside Glycotechnology**. v.12, p.113-120, 2000.

ZABEAU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Office**. Monique – Alemanha, 1993.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H.; CHAVES, G. M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. p.369-450, 2002.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. D.; ZAMBOLIM, E. M. Produção Integrada do Cafeeiro: Manejo de Doenças. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) Produção Integrada de Café. Universidade Federal de Viçosa, Brasil, p.443-508, 2003.

## 5 ARTIGO A:

### ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE REGIÃO GÊNICA ENVOLVIDA NA RESISTÊNCIA À *H. Vastatrix* Em *C. Arabica*

ARIYOSHI, C. **Análise transcricional de Região Gênica Envolvida na Resistência à *H. vastatrix* em *C. arabica*.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)– Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

#### RESUMO

A ferrugem do cafeeiro, causada pela *Hemileia vastatrix*, é considerada a principal doença em *Coffea arabica*. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação da resistência durante a interação incompatível entre o cafeeiro e *H. vastatrix*. Após detectarem a presença do patógeno, as plantas respondem ao ataque através da indução de proteínas codificadas principalmente por genes contendo os domínios de ligação de nucleotídeos e repetição rica em leucina (*NBS-LRR*), os quais desempenham um papel importante na sinalização. Através da sinalização, proteínas de resposta de defesa, como as relacionadas à patogênese (*PRs*), são ativadas. A partir do sequenciamento de clones BACs Híbrido de Timor (HDT) – CIFC 832/2 correspondentes e próximos a um *locus* de resistência à ferrugem do cafeeiro avaliou-se a presença de genes relacionados à sinalização e resposta de defesa. A identificação dos genes foi feita por busca de homologia de sequências *in silico* através da ferramenta *blastnNCBI* por amplificação através da técnica de *PCR*. Dois genes apresentaram amplificação nos clones BACs selecionados, *NBS-LRR* nos clones 10L24 e 14F3 e o *PR5* no clone 15O18. Na análise *in silico* um *contig* do clone BAC 14F3 apresentou similaridade com um acesso depositado no *Genbank* referente a um gene de sinalização *NBS-LRR* de *C. arabica*. Na análise de expressão desses genes em genótipo resistente – IAPAR 59 – e suscetível – Catuaí Vermelho, inoculados com *H. vastatrix*, houve diferenças significativas de níveis de expressão. O resultado confirma a participação de *loci* de HDT no mecanismo de resistência.

**Palavras-chave:** Resposta de defesa. Genes de sinalização. IAPAR 59.

ARIYOSHI, C. **Transcriptional Analysis of a Gene Region Involved in Resistance to *H. vastatrix* in *C. arabica***. Dissertation (Master's Degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

### ABSTRACT

The coffee leaf rust, caused by *Hemileia vastatrix*, is considered the main disease in *Coffea arabica*. However, little is known about the activation mechanisms of resistance during the incompatible interaction between coffee and *H. vastatrix*. After detecting the presence of the pathogen, plants respond to attack by inducing proteins, mainly codified by genes with nucleotide binding site and leucine-rich repeat (NBS - LRR) domains. These proteins play an important role in signaling. Through signaling defense response proteins, as pathogenesis-related proteins (PRs), are activated. From the sequencing of BAC clones Timor Hybrid (HDT) - CIFC 832/2, close to a resistance locus coffee rust, we evaluated the presence of genes related to signaling and defense responses. The identification of genes was performed by sequence homology search *in silico* through blast tool from NCBI and amplification by PCR. Two genes were detected in the selected BAC clones, NBS – LRR in the clones 10L24 and 14F3 and PR5 in clone 15O18. *In silico* analysis of a contig from 14F3 BAC clone showed similarity to other access deposited in the Genbank, a gene related to a NBS - LRR signaling clone of *C. arabica*. Analyzes expression of these genes in the genotype IAPAR 59 -resistant - and Catuaí Vermelho – susceptible - , inoculated with *H. vastatrix*, there were significant differences in expression levels. The result confirms the involvement of HDT/loci in the resistance mechanism.

**Key-words:** Defense response. Signaling genes. IAPAR 59.

**Objetivos:**

- Identificar genes presentes em clones BAC (Híbrido de Timor 832/2) relacionados à *loci* de resistência e/ou de sinalização.
- Avaliar a expressão dos genes identificados nos clones BACs em genótipos resistentes e suscetíveis à *H. vastatrix* em resposta ao patógeno.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O café é considerado uma das mais importantes *commodities* agrícolas do mundo (ICO, 2014), presente em quase todas as regiões tropicais do planeta. Porém, seu cultivo apresenta problemas com relação aos estresses abióticos e bióticos. A ferrugem alaranjada do cafeeiro, que é causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*, é a principal doença que causa perdas de produção que podem variar entre 35 e 50%, se não for devidamente controlada (ZAMBOLIM et al., 2002).

Os genes de resistência dos cafeeiros conhecidos são:  $S_h1$  -  $S_h9$  (RODRIGUES JR et al., 1975; BETTENCOURT, 1981), contrastando com os respectivos genes de virulência do patógeno  $v1$  -  $v9$ , os quais estão presentes, sozinhos ou em combinações, em 45 raças de *H. vastatrix* identificadas no mundo (VÁRZEA e MARQUES, 2005). Os genes  $S_h6$ ,  $S_h7$ ,  $S_h8$  e  $S_h9$  foram identificados em *C. canephora*, enquanto o gene  $S_h3$  foi identificado em *C. liberica* e os genes  $S_h1$ ,  $S_h2$ ,  $S_h4$  e  $S_h5$  foram identificados em *C. arabica* puros de origem etíope. Além destes, foram detectados pelo menos, dois genes de resistência ainda não caracterizados (DIOLA et al., 2013).

Em geral, quando os agentes patogênicos infectam as plantas, essas são capazes de se proteger pela indução de mecanismos de defesa complexos e altamente sofisticados (LI et al., 2010). No entanto, a caracterização dos genes atuantes na de resistência, como o modo de sinalização e de resposta de defesa continuam desconhecidos. A compreensão da complexa interação entre o cafeeiro e *H. vastatrix* é importante para aumentar o conhecimento dos mecanismos de resistência e eficiente para se obter controle desta doença.

Durante o processo de reconhecimento do fungo, genes contendo domínios *NBS* e *LRR*, o qual teve a família gênica em café caracterizada por Noir et al. (2001), desempenham um papel importante na ativação de resistência por meio de uma cascata de sinalização (GANESH et al., 2006). Uma das funções desses genes incluem o reconhecimento do indutor patogênico e ativação de proteínas de resposta de defesa, as proteínas relacionadas à patogenicidade (*PRs*) (LI et al., 2010), e uma série de outras proteínas (GUZZO et al., 2009; VIEIRA et al., 2012).

As proteínas *PR* são potentes proteínas antifúngicas, como, por exemplo, quitinases, e sua elevada expressão pode ser um mecanismo que contribui

para a resistência (VASAVIRAMA e KIRTI, 2012). Isso porque, a quitina que constitui uma larga fração da parede celular de certas classes de fungos fitopatogênicos, pode ser colapsada por essas proteínas, levando à morte celular do patógeno (GUZZO et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2011).

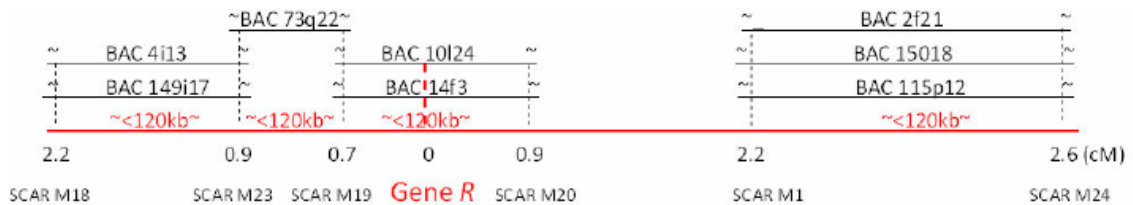
A partir da análise do transcriptoma da interação de *H. vastatrix* com *C. arabica* feita por 454 – pirosequenciamento, foi encontrada uma abundância de *contigs* relacionados a genes de resistência provenientes da planta, como 1,3  $\beta$ -glucanases, *PR1b*, *PR5* e quitinases (FERNANDEZ et al., 2011).

DIOLA et al., (2013) identificaram diferenças de padrão de transcrição entre genótipos resistentes e suscetíveis à ferrugem. De um total de 21 fragmentos diferencialmente transcritos relacionados a processos de sinalização e resposta de defesa, o maior nível de expressão foi detectado para os genes *PR5* e *NBS-LRR*.

Em análise de sequências da região  $S_n3$  em três genomas de cafeeiros,  $E^a$ ,  $C^a$  subgenomas do alotetraplóide *C. arabica* e  $C^c$  genoma do diplóide *C. canephora*, Ribas et al., (2011) revelaram a presença de 5, 3 e 4 genes de resistência nos genomas  $E^a$ ,  $C^a$  e  $C^c$ , respectivamente. Todos os genes de resistência encontrados parecem ser membros da família *NBS-LRR* com o domínio adicional *CC* (*coil-coiled*).

Em um trabalho de integração de mapeamento físico e genético, a partir de uma biblioteca BAC Híbrido de Timor – CIFC 832/2 (CAÇÃO et al., 2013), foram identificados e ordenados clones correspondentes e próximos a região dos marcadores relacionados a um *locus* de resistência a ferrugem (DIOLA et al., 2011 Figura 1).

**Figura 1** – Relação do mapa físico e genético contendo marcadores associados a um gene de resistência à ferrugem em *C. arabica*. Esquema do ordenamento dos clones BAC com mais de um marcador identificado, segundo a ordem dos marcadores SCARs sobre o mapa genético. A barra superior indica os clones identificados (ex: clone 1b7; placa 1, na linha b na coluna 7). A barra inferior indica os marcadores SCARs identificados no clone BAC (DIOLA, 2009).



A identificação dos BACs relacionados com *loci* de resistência permite uma série de estudos visando a identificação e caracterização dos genes candidatos à resistência à ferrugem.

O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de genes de sinalização e resposta de defesa, nos clones BAC relacionados com uma região de resistência à *H. vastatrix*, proveniente do genótipo HDT. Além disso, relacionar os genes encontrados na região com algum gene  $S_h$ , através da expressão diferencial desses em genótipos diferenciadores.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### Identificação de genes via PCR

A partir de oito clones BACs HDT – CIFC 832/2, ordenados com uma distância de até 2.6 cM de um gene de resistência, previamente descritos na literatura, foi feita uma análise via PCR da presença de sete genes relacionados à sinalização e resposta de defesa (Tabela 1).

A seleção dos genes foi feita a partir dos resultados obtidos por Diola et al., (2013) em análise quantitativa da expressão gênica dos transcritos de cDNA-AFLP ativados para a resposta de resistência do cafeeiro para a raça II de *H. vastatrix*.

**Tabela 1** – Relação dos *primers* desenhados para as sequências selecionadas dos genes relacionados à resistência à ferrugem em cafeeiro (DIOLA et al., 2013).

| Oligo   | Sequência Senso       | Sequência Antisenso  |
|---------|-----------------------|----------------------|
| NBS-LRR | ATCAGTTGGTAAAACCTGCCG | CTAGCTGGCTCGAGAGAATG |
| PR5     | CAACAAGGGAAATGTCGAAG  | GGTGGAGTTCTTCAATGCAC |
| RGH1A   | GATAAGCCGCTTATGACAC   | CTGATTGGTATCTCTGACG  |
| NtMEK2  | GATGTTACACGAGCCAATCC  | TCTTGTATCAGATCCTCCGC |
| GR      | AGGCATAAAAGTTCGCACAG  | CACAGCTTCCAAATTCAACC |
| SAG12   | TGGCGGTTAAGAGAATTGAG  | ATTCTCATGGCCAGCTAAAG |
| GPX4    | GCTCCCTCTTGTTCAGAT    | ATGAGCATCTTGACTTGTGC |

### Identificação de genes via análise *in silico*

O clone BAC correspondente à região do gene de resistência (clone 14F3) foi sequenciado com a tecnologia Illumina HiSeq 2000 (100 pb, sequências paired – end). Com os *reads* gerados pelo sequenciamento, realizou-se a montagem de *contigs* utilizando o software DNASTar. Utilizando os *contigs* formados efetuou-se uma busca por homologia de sequências de genes de sinalização e resposta de defesa nos bancos de dados do Genbank no site NCBI (National Center Biotechnology Information) através da ferramenta *blastn*.

### Expressão gênica

Para análise de expressão gênica, foram realizados experimentos de infecção em discos foliares nos genótipos resistente - IAPAR 59 – e suscetível - Catuaí Vermelho -(Tabela 2), com *H. vastatrix* raça II.

**Tabela 2** – Genótipos de cafeeiros e seus respectivos genes de resistência.

| Cafeeiro        | Genes de Resistência         | Interação com <i>H. vastatrix</i> raça II |
|-----------------|------------------------------|---|
| IAPAR 59        | Sh5, Sh6, Sh7, Sh8, Sh9, Sh? | Resistente                                |
| Catuaí vermelho | Sh5                          | Suscetível                                |

Para cada genótipo foram inoculados 72 discos foliares (2,5 cm de diâmetro) com solução de uredósporos (1mg /mL) em água destilada e 72 discos com meio inerte (*mock-inoculated*), constituído apenas de água destilada. Foram

distribuídos 25 µl de solução por disco. A avaliação da viabilidade dos esporos utilizados foi feita a partir da distribuição de 3 gotas do inóculo em lâmina de vidro mantida no escuro por 5 h e visualização em microscópio (ANEXO A).

Os discos inoculados foram mantidos por 24 horas em ausência de luz, e acomodados em caixas de acrílico Gerbox® fechada, contendo espuma de 0,8 cm de espessura no fundo com água (30 mL), a temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  (ESKES e TOMA – BRAGHINI, 1982). Após 0, 24, 48 e 72 horas, os discos foram coletados para extração de RNA.

Em cada tempo foram coletadas três repetições biológicas com quatro discos para cada genótipo, tanto os inoculados com *H. vastatrix* quanto para os inoculados com meio inerte.

Os 24 discos foliares restantes de cada genótipo que não foram utilizados para extração de RNA, foram mantidos em condições ideais para a observação fenotípica de resistência ou suscetibilidade.

A extração de RNA total foi realizada seguindo o protocolo modificado de Chang et al. (1993). Todas as amostras foram tratadas com DNase (RNase-free, Invitrogen) e a ausência de contaminação com DNA genômico foi verificada através de PCR utilizando *primers* do gene GAPDH. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria, utilizando-se o NanoDrop® ND-100 (Thermo Fisher Scientific). Foram utilizadas amostras que apresentaram razões  $A_{260/280}$  nmentre 1,8 e 2,2. A integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2,5 µg do RNA total utilizando-se a enzima transcriptase reversa do kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante com volume final de 20µl.

Os *primers* específicos para cada gene *NBS-LRR* e *PR5*(Tabela 1) foram utilizados com a finalidade de se obter amplicons em torno de 80-100 pb com temperatura de anelamento de  $60^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

O perfil transcricional dos genes foi avaliado através de qPCR (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems). O volume total das reações foi de 25 µL, onde 12,5 µL de 2x SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 µL de cada primer (10 µM), 10,5 µL de água DEPC tratada e 1 µL de cDNA diluído na concentração de 20 ng/µL.

As reações foram preparadas em triplicatas técnicas e os parâmetros de termociclagem utilizados foram: 10 min a 95°C, seguido por quarenta ciclos de amplificação de 95°C por 30 segundos e 60° C por 60 segundos. Curvas de dissociação foram analisadas para verificar especificidade de amplificação dos *primers* na reação.

A eficiência de amplificação de todas as amostras foi avaliada de acordo com os valores individuais de amplificação de transcritos apresentados por cada um deles e estes foram plotados e analisados *in silico* pelo programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os primers utilizados apresentaram eficiência de 99%.

A expressão relativa dos genes foi avaliada através do Software GenEx (MultiD Analyses AB, Göteborg, Sweden), onde foi calculado o  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (amostra) –  $\Delta Ct$  (normalizador). O calibrador utilizado para a comparação do padrão de atividades transcricionais entre as horas pós-inoculação foi o tempo 0 h para cada genótipo. O desvio padrão também foi calculado a partir do software GenEX.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo programa Sisvar (FERREIRA, 2000), com aplicação de análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, ambos ao nível de 5% de significância.

O gene *GAPDH* foi utilizado para normalização dos dados, conforme indicado para interação ferrugem e cafeeiro por Barsalobres-Cavallari et al. (2009) e devido à estabilidade desse gene normalizador em *C. arabica* (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009; CARVALHO et al., 2013).

Informações Mínimas para Publicação de Experimentos de PCR Quantitativo em Tempo Real (MIQE- *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) foram seguidas, de acordo com as recomendações de Bustin et al. (2009).

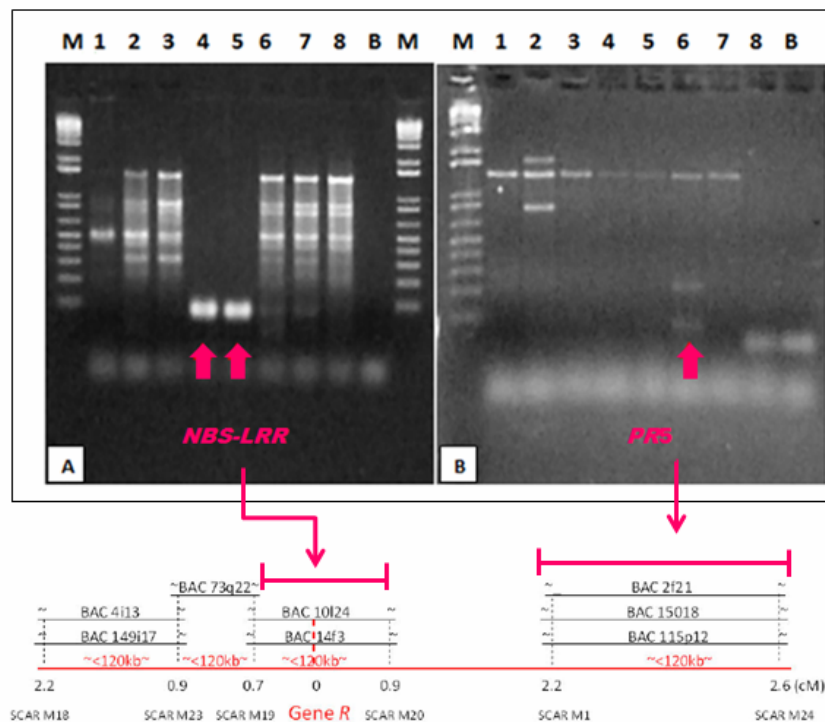
### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Identificação de genes via PCR**

Entre os sete genes de sinalização e resposta de defesa, dois apresentam amplificação nos clones BACs selecionados. A região referente ao gene de sinalização *NBS-LRR* apresentou amplificação nos clones 10L24 e 14F3, os

quais de acordo com DIOLA et al.(2011) são promissores, pois contêm ambos marcadores que flanqueiam o gene de resistência numa região delimitada por 1,6 cM. O gene de resposta *PR5* apresentou amplificação no clone 15O18, que se encontra entre 2.2 cM e 2.6 cM do gene de resistência. Ambos *amplicons* apresentaram tamanhos esperados de 80 a 100 pb. Os demais genes não amplificaram nos clones BACs selecionados.

**Figura 2** – Amplificação dos genes *NBS-LRR* (A) e *PR5* (B) e ordenamento de seus respectivos clones BAC em relação ao gene *R*. M, marcador; Colunas 1 a 8 clones BACs selecionados; 1) 4I13; 2) 149I17; 3), 73Q22; 4) 10L24; linhas 5, 14F3; linhas 6, 2F21; linhas 7, 15O18; 8, 115p12; B, controle negativo.



### Identificação de genes via análise *in silico*

Por meio dos *reads* gerados no sequenciamento do clone BAC 14F3, foi realizada a montagem de 107 *contigs*. A partir da ferramenta *blastn* foi encontrada similaridade de 100% entre um *contig* e um acesso do *GenBank* depositada no site do *NCBI*. O acesso EU196037.1 (Figura 3) refere-se ao gene de sinalização *TIR-NBS-LRR* de um clone de *C. arabica* com *background* de HDT (ROMERO et al., 2010).

**Figura 3** – Acesso EU196037.1 depositado banco de dados *GenBank*. A sequência nucleotídica de 571 pb corresponde a um gene de sinalização pertencente à família *NBS-LRR* com domínio de ligação do tipo *TIR*.

```

TTGAACATCAAGGGCATCATAACTTATCTTCAAGACACCCTGAAGTTCAGGCCACGGATCTGTTTCAGC
TTTTCCAAAGCATCTTGCCACTCCTCTACTATTCTCTTACCGTATAAAAAGAGAACC AAAAGACTTCTAGTG
CCAACGGTAGTCCACCGGTACAGGAGACAATTTCTTGGACAAATTAAGGAAAGCTCTGTGGGATTCTC
TCTTCTAAATGCATGGTGACTAAAAAGTTTTAGTGACTCAGAGTTTCCCAAAGATTTCACTTCATAAATC
TTATCCACAAAATCAGTTGGCAAACTGCCGCATCTCTAGTAGTAATTACTATCCGGCTTCCTTCAGAGT
ACCATTCTCTCGAGCCAGCTAGTTCTTTAAGTTGTCCTGCATCATCAATGTCATCTAAAAGTAGAAGAAC
TCGGTTTTGTTTTAGTATCCTCTTCATTTCTAGCACATAAGATTTGGCATCAGAGAAAGTAGGAGGCC
TTGTGTGAAGAAAGATCACCAACAATCTTTTTCTGAAGGAATTCAGGACCATTTTCTGACTTTTAAAAT
TTTCTCTAACA

```

### Expressão Gênica

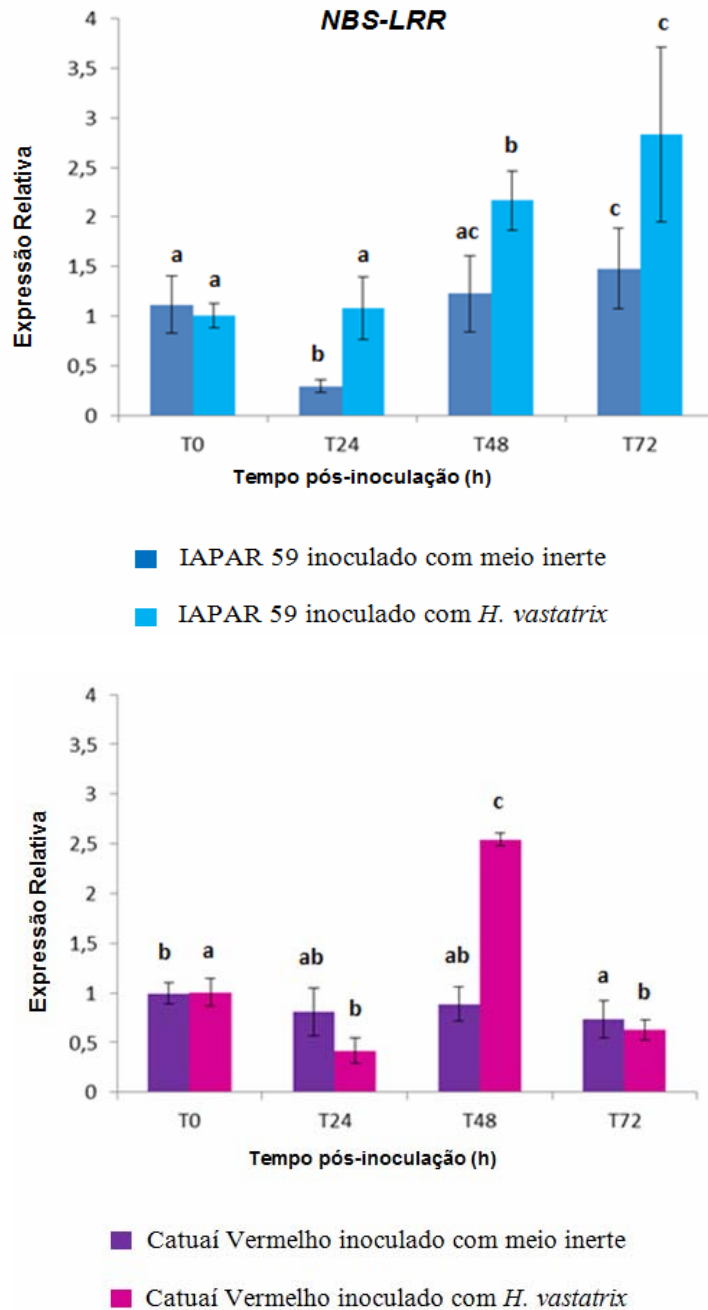
A inoculação do patógeno induziu respostas distintas nos genótipos IAPAR 59 (resistente) e Catuaí Vermelho (suscetível) para o gene *NBS-LRR* (Figura 4). O produto de transcrição nas plantas inoculadas com meio inerte em ambos cultivares foram similares, sem grandes alterações, com exceção do tempo de 24 horas na cultivar IAPAR59. O genótipo IAPAR 59 apresentou aumento de transcritos na presença do patógeno 48 e 72h após a inoculação, já a suscetível Catuaí Vermelho apresentou um aumento de transcritos apenas em 48 horas, caindo a seguir. Nos dados obtidos por Diola et al.(2013) em Híbrido de Timor UFV 427-15 (CIFC 1343-136) (resistente) inoculado com *H. vastatrix* raça II houve maior expressão de genes de sinalização entre 24 h e 48 h pós-inoculação. Porém, para o genótipo suscetível Catuaí Amarelo UFV 2143-236 (IAC 30) inoculado com ferrugem Diola et al.(2013) não observaram aumento transcricional, a expressão gênica se manteve em igual intensidade até 72 h pós-inoculação.

Foi identificada uma intensidade de transcrição aproximadamente 3 vezes maior em IAPAR 59 inoculado com ferrugem no tempo 72 h em relação à Catuaí Vermelho (Figura 5). Estes níveis de expressão são coerentes com valores citados por Corne et al. (2001) e são suficientes para desencadear as respostas de resistência diferencial entre genótipos (JALALI et al., 2006; ZHAO e QI, 2008). Em alguns trabalhos foi demonstrado que em níveis semelhante de expressão, de somente um gene da classe *NBS-LRR* foi responsável por desencadear o processo de ativação da resposta de resistência em cevada (ROSTOKS et al., 2004), em cana

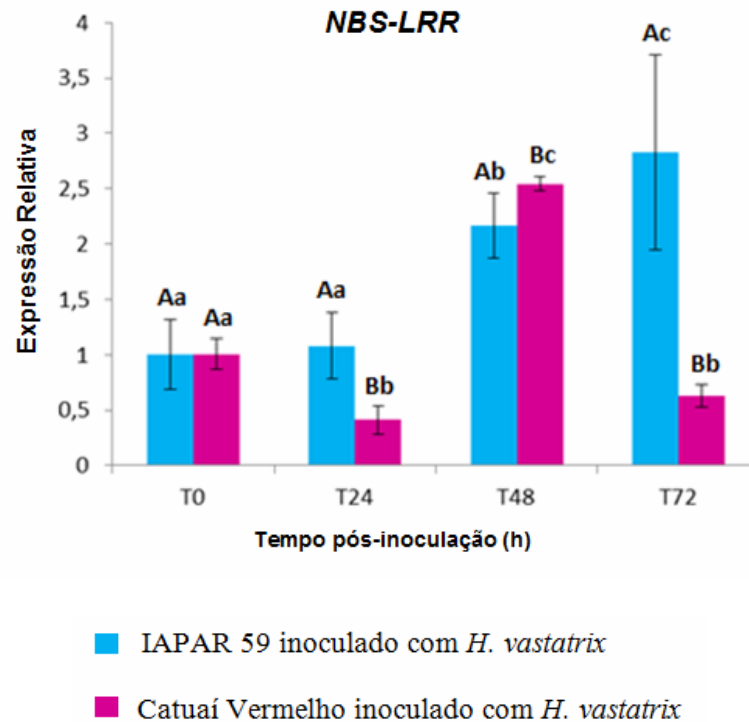
de açúcar (YOU-XIONG et al., 2008) e em álamo (ZHANG et al., 2008). Os resultados obtidos reforçam o papel do gene *NBS-LRR* como um candidato do reconhecimento do patógeno e da ativação da resposta de resistência vertical do cafeeiro para raça II de *H. vastatrix*.

Em genótipos resistentes, a sequência de sinais moleculares na membrana plasmática é necessária para controlar o desenvolvimento de fungos (YOUN-XIONG et al., 2008). O reconhecimento eficaz do patógeno, que é desencadeada por indutores conservados do patógeno (DUPLESSIS et al., 2011), é o primeiro passo para a resistência. Essa imunidade de ampla gama é mediada por receptores de alta afinidade na superfície da célula vegetal (NISHIMURA e DANGL, 2010). Em várias interações planta-ferrugem, a resistência do hospedeiro raça específica as respostas são tipicamente expressas simultaneamente com o formação do primeiro haustório (HEATH, 1997; MOULD et al., 2003).

**Figura 4** – Níveis de transcrição do gene *NBS-LRR* em cafeeiros em 0h, 24h, 48h e 72h pós-inoculação. Valores representam a média +/- erro padrão (n=3). Letras minúsculas comparam colunas do mesmo genótipo. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 5** – Níveis de transcrição do gene *NBS-LRR* em cafeeiros em 0h, 24h, 48h e 72h pós-inoculação. Valores representam a média +/- erro padrão (n=3). Letras maiúsculas comparam colunas de genótipos diferentes e letras minúsculas comparam colunas do mesmo genótipo. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



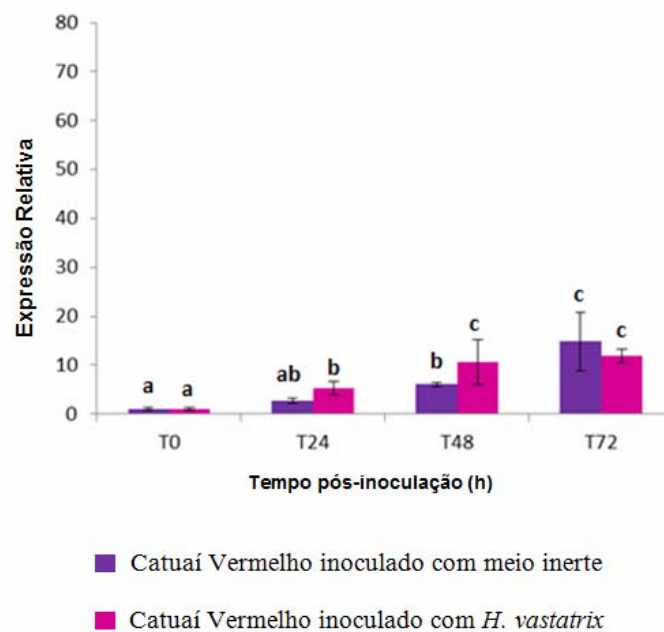
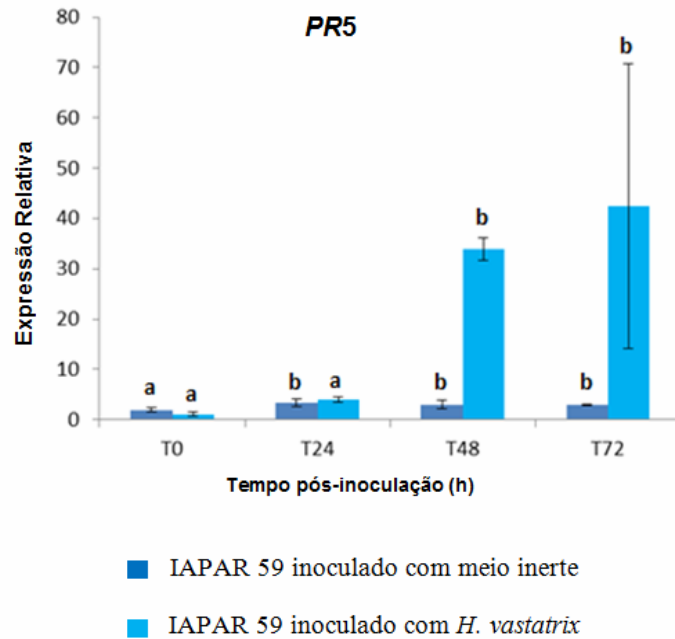
*H. vastatrix*, pode alcançar a fase de haustório entre 24 e 48 h pós-inoculação (MARTINS e MORAES, 1996; SILVA et al., 1999, 2002), momento de maior intensidade de resposta de resistência e aumento da atividade de defesa. Para vários genótipos de café, a resistência é pós-haustorial (paralisa o crescimento do fungo depois da formação haustorial) e caracteriza-se pela morte celular dois dias após a inoculação (SILVA et al., 2002). Em plantas de café suscetíveis, a morte de células-guardas e células adjacentes foi observada do terceiro dia depois da inoculação, mas só em uma pequena porcentagem de locais de infecção na qual o fungo parou seu crescimento precocemente (WANG et al., 2009). A queda de expressão de *NBS-LRR* em Catuaí Vermelho inoculado com ferrugem no tempo 72h pode estar associada com a deficiência no controle e não infecção de células adjacentes.

Com relação ao perfil de expressão de *PR5*, a cultivar IAPAR 59 inoculada com meio inerte manteve quase que constante nos tempos pós-inoculação, porém para a cultivar Catuaí Vermelho inoculado com meio inerte e com

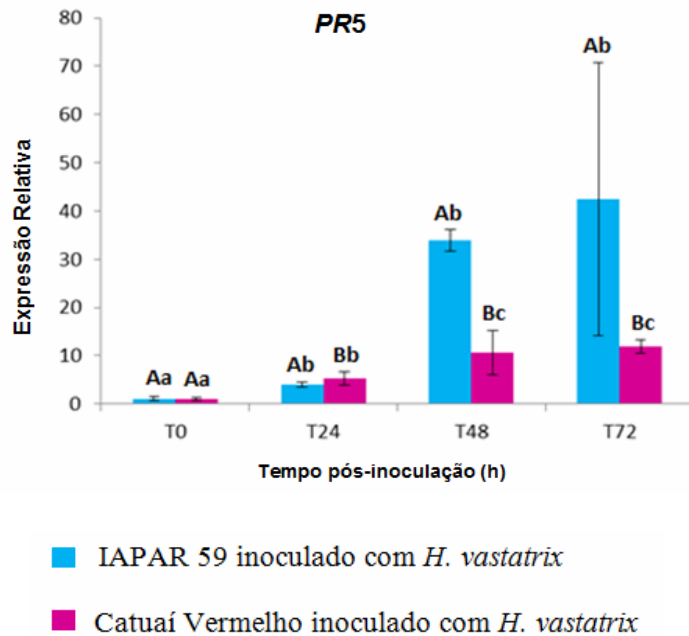
ferrugem observou-se aumento de transcritos até 72h. Entretanto esses valores foram menores quando comparados com os níveis de transcritos obtidos em IAPAR 59 inoculado com *H. vastatrix* (Figura 6), nos tempo 24h, 48h e 72 h pós-inoculação. Sendo que IAPAR 59 inoculado com *H. vastatrix* apresentou um pico no tempo 72 h de aproximadamente 4 vezes mais transcritos em relação ao genótipo suscetível (Figura 7). Os resultados obtidos para o gene de resposta de defesa *PR5*, também são similares aos encontrados por Diola et al.(2013), onde no tempo 72 h pós-inoculação houve maior expressão do genótipo resistente em relação ao suscetível.

As *PRs* são as proteínas mais importantes de defesa, especificamente as *PR5* taumatina-like. Estão localizadas no espaço intercelular e atuam na defesa da planta contra microrganismos patogênicos (WANG et al., 2008). Elas atuam por meio de hidrólise enzimática de polímeros de 1-3 betaglucanos da parede do fungo provocando o colapso celular e morte do fungo (GUZZO et al., 2009). São muito estáveis em pHs baixos (ao redor 3.0), relativamente resistente a enzimas proteolíticas endógenas; geralmente são monômeros de baixo peso molecular.

**Figura 6** – Níveis de transcrição do gene *PR5* em cafeeiros em 0h, 24h, 48h e 72h pós-inoculação. Valores representam a média +/- erro padrão (n=3). Letras minúsculas comparam colunas do mesmo genótipo. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

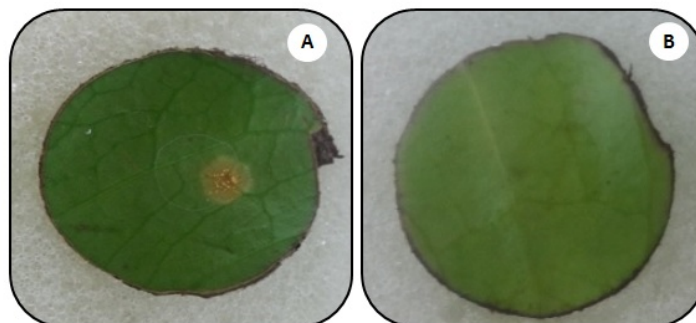


**Figura 7** – Níveis de transcrição do gene *PR5* em cafeeiros em 0h, 24h, 48h e 72h pós-inoculação. Valores representam a média +/- erro padrão (n=3). Letras maiúsculas comparam colunas de genótipos diferentes e letras minúsculas comparam colunas do mesmo genótipo. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



A infecção por *H. vastatrix* foi confirmada pela esporulação dos discos foliares de Catuaí Vermelho (susceptível) 15 dias após a inoculação, evidenciando o completo ciclo reprodutivo do patógeno. Os discos foliares de IAPAR 59 (resistente) não apresentaram esporulações em todas as avaliações e repetições efetuadas (Figura 8).

**Figura 8** – Análise fenotípica de cultivares suscetível (A – Catuaí Vermelho) e resistente (B – IAPAR 59) à *H. vastatrix* em discos foliares. A presença de esporos indica o completo ciclo reprodutivo e a interação compatível planta/patógeno.



Como Catuaí Vermelho apresenta apenas o gene de resistência  $S_h5$ , este se apresentou suscetível a raça II, que possui o gene de *vr 5*. Porém em IAPAR 59, a raça II se comportou de forma avirulenta, pelo fato do genótipo apresentar outros genes de resistência além do  $S_h5$ . Os resultados correspondem à resistência raça específica e a resposta de resistência vertical, onde o mecanismo de reconhecimento é exclusivo do hospedeiro e geralmente expressa contra genótipos específicos do patógeno (resistência raça-específica) (HEATH, 2000).

Estas informações poderão auxiliar na elaboração de estratégias para que novas tecnologias atuem sobre resistência à ferrugem, como por exemplo, a piramidação ou super expressão desses genes.

#### 5.4 CONCLUSÃO

A expressão diferencial dos genes identificados tanto *in silico* como por PCR nos clones BAC 10L24 e 14F3, reforça o envolvimento desta região gênica no mecanismo de resistência da planta, assim como o importante papel dos genes *NBS-LRR* e *PR5* na resposta de defesa à *H. vastatrix*.

A diferença nos níveis de transcritos entre os genótipos inoculados com ferrugem nos diferentes tempos possibilita a utilização destes como uma referência para a resposta de resistência a ferrugem, no objetivo de caracterizar molecularmente a resposta transcricional dos genótipos diferenciadores para essa doença. Essa caracterização poderá elucidar o gene ou os genes  $S_h$  associados a esses *loci* de resistência.

#### 5.5 ANÁLISES EM ANDAMENTO

Também foram realizados experimentos de infecção em discos foliares no genótipo resistente - HDT832/2 -, e nos genótipos diferenciadores HW17/12, 644/18 Híbrido Kawisari, H20/2, H420/10 e H419/20 (Tabela 3), com *H. vastatrix* raça II.

**Tabela 3** – Genótipos de cafeeiros e seus respectivos genes de resistência.

| Cafeeiro                | Genes de Resistência         | Interação com <i>H. vastatrix</i> raça II |
|-------------------------|------------------------------|---|
| HW17/12                 | Sh1, Sh2, Sh4, Sh5           | Suscetível                                |
| 644/18 Híbrido Kawisari | Sh?                          | Resistente                                |
| H20/2                   | Sh5, Sh8                     | Resistente                                |
| H420/10                 | Sh5, Sh6, Sh7, Sh9           | Resistente                                |
| H419/20                 | Sh5, Sh6, Sh9                | Resistente                                |
| HDT832/2                | Sh5, Sh6, Sh7, Sh8, Sh9, Sh? | Resistente                                |

Os outros genótipos diferenciadores e HDT832/2 não apresentaram esporulação até o fim do experimento, 90 dias após a inoculação. Com exceção do HW17/12, que apresentou esporulação 30 dias após a inoculação, evidenciando a sua suscetibilidade devido ao seu *background* de genes de resistência derivados de *C. arabica* (Tabela 3).

Trabalhos futuros serão feitos para a avaliação da expressão diferencial dos genes *NBS-LRR* e *PR5* no HDT e nos genótipos diferenciadores HW17/12, 644/18 Híbrido Kawisari, H20/2, H420/10 e H419/20. Os resultados que serão obtidos para tais genótipos em comparação com níveis de expressão observados em IAPAR 59 inoculado com *H. vastatrix*, podem auxiliar na elucidação dos genes e mecanismos de resistência atuantes no processo de resistência à ferrugem.

## 5.6 REFERÊNCIAS

- BARSALOBRES-CAVALLARI, F. C.; SEVERINO, F. E.; MALUF, M. P.; MAIA, I. G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**. v.10, p.1-11, 2009.
- BETTENCOURT, A. J. Melhoramento genético do cafeeiro: transferência de fatores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L. Tese de Doutorado, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Lisboa, Portugal. 1981.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. v.55, p.611–622, 2009.

- CAÇÃO, S. M. B.; SILVA, N. V.; DOMINGUES, D. S.; VIEIRA, L. G. E.; DINIZ, L. E. C.; VINECKY, F.; ALVES, G. S. C.; ANDRADE, A. C.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; PEREIRA, L. F. P. Construction and characterization of a BAC library from the *Coffea arabica* genotype Timor Hybrid CIFIC 832/2. **Genética**. v.141, p.217-226, 2013.
- CARVALHO, K.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DOS SANTOS, T. B.; DE SOUZA, S. G. H.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P.; DOMINGUES, D. S. Nitrogen starvation, salt and heat stress in *Coffee (Coffea arabica L.)*: Identification and validation of new genes for qPCR normalization. **Molecular Biotechnology**. v.53, p.315 – 325, 2013.
- CHANG, S.; PURYERAR, J.; CAIRNEY, J. A single and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology**. v.11, p.113-116, 1993.
- CORNÉ, M. J.; PIETERSE, T.; JURRIAN, T.; VAN LOON, L. C. Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden? **Biotech Net**. v.3, p.1-8, 2001.
- DIOLA, V. Resistência à ferrugem do cafeeiro: mapeamentogenético, físico e análise da expressão gênica em resposta a infecção de *H. vastatrix*. Tese de doutorado, Viçosa, Departamento de Fisiologia Vegetal. p. 43, 2009.
- DIOLA, V.; BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; SAKIYAMA, N. S.; LOUREIRO, M. E. High – density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics & Genomes**. v.7, p.1199-1208, 2011.
- DIOLA, V.; BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; PEREIRA, L.F.P.; LOUREIRO, M. A new set of differentially expressed signaling genes is early expressed in coffee leaf rust race II incompatible interaction. **Functional e Integrative Genomics**. v.13, p.379 – 389, 2013.
- DUPLESSIS, S.; JOLY, D. J.; DODDS, P. N. Rust effectors. In: MARTIN, F.; KAMOUN, S. (Ed) Effectors in plant microbes interactions. p.157–195, Wiley-Blackwell, Oxford, 2011.
- FERNANDEZ, D.; TISSERANT, E.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.; VIEIRA, A.; PETITOT, A-S.; LOUREIRO, A.; POULAIN, J.; DA SILVA, C.; SILVA, M. D. C.; DUPLESSIS, S. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant–rust interaction. **Molecular Plant Pathology**. v.13, p.17–37, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: Sistema de análise de variância para dados balanceados. Versão 5.3, Build 75. Lavras: DEX/ UFLA, 2010.
- GANESH, D.; PETITOT, A. S.; SILVA, M. C.; ALARY, R.; LECOULS, A. C.; FERNANDEZ, D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica L.*) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**. v.170, p.1045–1051, 2006.
- GUZZO, S. D.; HAKAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee gene expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal Phytopathology**. v.1,p.1-14, 2009.

HEATH, M. C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Annual Botanic**. v.80, p.713-720, 1997.

HEATH, M. C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**. v.44, p.321-334, 2000.

ICO - International Coffee Organization. As estatísticas do comercio do Café. Site: www.ico.org. 2014.

JALALI, B. L.; BHARGAVA, S.; KAMBLE, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. **Journal of Phytopathology**. v.154, n. 2, p.65-74, 2006.

LI, D. M.; STAEHELIN, C.; WANG, W. T.; PENG, S. L. Molecular cloning and characterization of a chitinase-homologous gene from *Mikania micranta* infected by *Cuscuta campestris*. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.28, n.1, p.90-101, 2010.

MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. **Journal Phytopathology**. v.144, p.519-526, 1996.

MOULD, M. J.; XU, T.; BARBARA, M.; ISCOVE, N. N.; HEATH, M. C. cDNAs generated from individual epidermal cells reveal that differential gene expression predicting subsequent resistance or susceptibility to rust fungal infection occurs prior to the fungus entering the cell lumen. **Molecular Plant-Microbe Interaction**. v.16, p.835-45, 2003.

NISHIMURA, M. T.; DANGL, J. L. Arabidopsis and the plant immune system. **Plant Journal**. v. 61, p.1053-1066, 2010.

NOIR, S.; COMBES, M. C.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). **Molecular Genetics and Genomics**. v.265, n.4, p.654-662, 2011.

RAMAKERS, C.; RUIJTERA, J. M.; DEPREZA, R. H. L.; MOORMAN, A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**. v.339, n.1, p.62-66, 2003.

SILVA, M. C.; NICOLE, M.; RIJO, L.; GEIGER, J. P.; RODRIGUES JR. C. J. Cytochemistry of plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)- *Hemileia vastatrix* (race III). **Journal Plant Scienc**. v.160, p.79-91, 1999.

SILVA, M. C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES JR. C. J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiology Molecular in Plant Pathology**. v.60, p.169-183, 2002.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANNMERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant "pathogenesis related" proteins and their role in defense against pathogens. **Biochemistry**. v.75, p.687-706, 1993.

- RIBAS, A.; 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, p.240, 2011.
- RODRIGUES, C. J.; BETTENCOURT, A. J.; RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review Phytopathology**. v.13, p.49–70, 1975.
- ROMERO, G.; ALVARADO, G.; CORTINA, H.; LIGARRETO, G.; GALEANO, N.F.; HERRERA, J.C.; Partial resistance to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee (*Coffea arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes **Journal of Plant Science and Molecular Breeding**. v.25, p.685-697, 2010.
- ROSTOKS, N.; STEFFENSON, B. J.; KLEINHOF, A. Structure and expression of the barley stem rust resistance gene Rpg1 messenger RNA. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 2004. v.64, n.2, p.91-101, 2004.
- VÁRZEA, V. M. P.; MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. (Ed) Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. p.53-74, 2005.
- VASAVIRAMA, K.; KIRTI, P. Increased resistance to late leaf spot disease in transgenic peanut using a combination of PR genes. **Journal Functional & Integrative Genomics**. v.12, p.1–10, 2012.
- VASCONCELOS, E. A. R.; SANTANA, C. G.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S. A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination. **BMC Biotechnology**. v.11, p.14–2, 2011.
- VIEIRA, A.; TALHINHAS, P.; LOUREIRO, A.; THÜRICH, J.; DUPLESSIS.; FERNANDEZ, D.; SILVA, M. C.; PAULO, O. S.; AZINHEIRA, E. G.; Expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. **European Journal of Plant Pathology**. v.133, p.261–277, 2012.
- YOU-XIONG, Q.; JIAN-WEI, L.; JI-SEN, Z.; MIAO-HONG, R.; LI-PING, X.; MU-QING, Z. Molecular cloning and characterisation of a non-TIR-NBS-LRR type disease resistance gene analogue from sugarcane. **Sugar Techenology**. v.10, n.1, p.71-73, 2008
- WANG, G.; ELLENDORFF, U.; KEMP, B.; MANSFIELD, J. W.; FORSYTH, A.; MITCHELL, K.; BASTAS, K.; LIU, C. M.; WOODS-TOR, W.; ZIPFEL, C. A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v.147, p.503-517, 2008.
- WANG, S.; RAO, P.; YE, X. Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. **Applied Microbiology for Biotechnology**. v.82, p.79–86, 2009.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H.; CHAVES, G. M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed) O estado da arte

de tecnologias na produção de café. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. p.369-450, 2002.

ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LIN, S. Z.; ZHENG, H. Q.; LIN, H. Y.; AN, X. M.; LI, Y.; LI, H. X. Characterization of resistance gene analogs with a nucleotide binding site isolated from a triploid white poplar. **Plant Biology**. v.10, n.3, p.310-322, 2008.

ZHAO, S.; QI, X. Signaling in Plant Disease Resistance and Symbiosis. **Journal of Integrative Plant Biology**. v.50, n.7, p.799–807, 2008.

**6 ARTIGO B:****VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS À RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO CAFEIEIRO (*Hemileia vastatrix*) EM GENÓTIPOS COM INTROGRESSÃO DE HÍBRIDO DE TIMOR**

ARIYOSHI, C. **Validação de Marcadores Moleculares ligados à Resistência à Ferrugem do Cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) em Genótipos com introgressão de Híbrido de Timor.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular ) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

**RESUMO**

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*, é a principal doença de *Coffea arabica*. Mais de 75% das plantações de *C. arabica* são suscetíveis a esse patógeno, o qual causa perdas de produção de 35 a 50%. Cultivares resistentes vem sendo desenvolvidas pela introgressão de genes de resistência (R) de *C. arabica* Híbrido de Timor, um híbrido espontâneo entre *C. arabica* e *C. canephora*. Embora novas cultivares tenham sido desenvolvidas através do melhoramento convencional, este método requer muitos anos de trabalho intenso. Estratégias de melhoramento convencional associadas a técnicas de Biologia Molecular tais como o uso de marcadores moleculares, podem diminuir o tempo e esforços para a seleção de genótipos em programas de melhoramento. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar marcadores moleculares, previamente descritos, para resistência à ferrugem do cafeeiro em populações de melhoramento do Instituto Agrônomo do Paraná. DNA foi isolado de folhas jovens das cultivares, Catuaí Vermelho, Mundo Novo, genótipos de Híbrido de Timor, genótipos derivados de IAPAR 59, IPR 97, IPR 98, IPR 99, IPR 104, IPR 107 e de uma geração F4IAPAR 59 X (Etiópia x Catuaí). Dois pares de *primers* que flanqueiam o gene R em uma distância de recombinação menor que 1,6 cM foram avaliados. Os genótipos resistentes de Híbrido de Timor (832/1 e 832/2) apresentaram a amplificação de fragmento de 500 pb, enquanto cultivares suscetíveis Catuaí Vermelho e Mundo Novo não apresentaram amplificação. Entre os 23 genótipos derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 97, IPR 98, IPR 99, IPR 104 e IPR 107, somente 10 apresentaram amplificação, entretanto das 22 amostras de F4IAPAR 59 X (Etiópia x Catuaí), 21 apresentaram amplificação. Plantas que apresentaram presença ou não de produtos de amplificação foram inoculadas com ferrugem do cafeeiro para confirmar os resultados dos marcadores moleculares, evidenciando a co-segregação entre genótipo/fenótipo. Esses resultados representam um importante passo para se iniciar o uso de Seleção Assistida por Marcadores em programas de melhoramento do IAPAR, com a consequente redução significativa de custos para operações de campo.

**Palavras-chave:** Seleção assistida por marcadores. Gene de resistência. IPR.

ARIYOSHI, C. **Validation of Molecular Markers Linked to Resistance to Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) in Genotypes with introgression of Timor Hybrid.** Dissertation (Master's Degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

### ABSTRACT

Coffee leaf rust, caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix*, is the most important disease of *Coffea arabica*. More than 75% of the *C. arabica* plantations are susceptible to this fungus, which can cause 35 to 50% of production losses. Resistant cultivars have been developed by the introgression of R genes from *C. arabica* Timor Hybrid, a spontaneous hybrid between *C. arabica* and *C. canephora*, a natural source of disease resistance. Although new rust resistant cultivars have been developed from conventional breeding, this approach requires several years of intensive laborious work. Strategies in association with Molecular Biology, such as the use of molecular markers, can reduce the time and effort for selection of those genotypes in breeding programs. Therefore, the aim of this study was to evaluate previously reported molecular markers to coffee rust resistance in coffee populations breeding. DNA was isolated from fresh leaves of coffee tree cultivars Catuaí Vermelho and Mundo Novo, genotypes of Timor Hybrid, genotypes derived from cultivars (IAPAR 59, IPR 97, IPR 98, IPR 99, IPR 104 e IPR 107) and a generation F4IAPAR 59 and (Ethiopia x Catuaí) Two primers pairs flanking the R gene in a recombination distance of less than 1,6 cM were evaluated. Resistant genotypes of Timor Hybrid(832/1 and 832/2) showed respective amplifications, while *C. arabica* (Catuaí Vermelho and Mundo Novo) did not show any amplification. Among the 23 samples of Timor Hybrid introgression analyzed only 10 showed amplifications, and among the 22 samples of F4IAPAR 59 e (Ethiopia x Catuaí), 21, facilitating the identification of plants for breeding. Plants that show either presence or absence of products amplification were inoculated with coffee leaf rust in order to confirm the screening results from the molecular markers. This experiment evidence the co-segregation between genotype/phenotype. The results showing here is a step closer to initiate the uses of Marker Assisted Selection at IAPAR coffee breeding program, with a consequent significant reduction of costs for field operations.

**Key- words:** Marker assisted selection. Resistance disease gene. IPR.

**Objetivo:**

- Relacionar marcadores moleculares à característica fenotípica de resistência à ferrugem do cafeeiro.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O café é considerado uma das mais importantes *commodities* agrícolas do mundo (ICO, 2014), sendo produzido principalmente por países em desenvolvimento. Entre os principais problemas da cafeicultura esta a ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, uma das principais doenças do café, pode causar perdas na produção de 35 até 50% dependendo do tipo de manejo adotado para seu controle.

Um dos métodos mais eficientes para o controle da ferrugem é o uso de cultivares resistente. Os genótipos de café são classificados em grupos fisiológicos que são essencialmente distintos por respostas que envolvem resistência completa ou suscetibilidade para várias raças de ferrugem. Os genes de resistência à ferrugem  $S_h1$ ,  $S_h2$ ,  $S_h4$  e  $S_h5$  foram identificados em *C. arabica* puros de origem etíope. O gene  $S_h3$  foi identificado em *C. liberica*, enquanto  $S_h6$ ,  $S_h7$ ,  $S_h8$  e  $S_h9$  em *C. canephora* (BETTENCOURT e RODRIGUES JR, 1988).

Híbridos derivados de cruzamentos de *C. arabica* e *C. canephora*, como o Híbrido de Timor (HDT), um híbrido espontâneo, são caracterizados pela resistência a todas as raças conhecidas (BETTENCOURT e RODRIGUES JR., 1988). Porém, no Estado do Paraná foram observados cafeeiros derivados do HDT com resistência completa e incompleta à ferrugem sendo alguns com suscetibilidade. É provável que nesses cafeeiros resistentes existam um maior número de genes  $S_h$  (SERA et al., 2007 a, b, 2010; DEL GROSSI et al., 2013). As cultivares IAPAR 59, IPR 97, IPR 98, IPR 99 e IPR 104 foram originadas da hibridação entre Villa Sarchi CIFIC 971/10 e HDT CIFIC 832/2 enquanto que a IPR 107 é derivada do cruzamento entre IAPAR 59 e Mundo Novo IAC 376-4 (SERA et al., 2010).

IAPAR 59 possui pelo menos cinco genes de resistência à ferrugem (genes  $S_h$ ). Entretanto, nas várias gerações de auto fecundação para a obtenção das cultivares IPR 99 e IPR 107 ocorreram segregações para os genes de resistência e, atualmente, muitas progênies possuem alta frequência de plantas suscetíveis. É provável que em algumas progênies das cultivares IPR 99 e IPR 107 existam os mesmos genes de resistência da IAPAR 59 ou do HDT CIFIC 832/2, os quais vêm se mantendo resistentes por muitos anos (SERA et al., 2010).

Marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem podem auxiliar na identificação de cafeeiros com maior número de genes de resistência.

Em um trabalho de Diola et al.,(2011) foi construído um mapa genético saturado com 25 marcadores *AFLP*, o qual derivou um mapa genético de alta densidade com 6 marcadores *SCARs* delimitando uma região cromossômica de 9,45 *cM*. Um gene de resistência foi identificado no interior dessa região cromossômica flanqueado por dois marcadores *SCARs* a 0,7 e 0,9 *cM*.

Neste trabalho, genótipos provenientes do programa de melhoramento do IAPAR foram avaliados e selecionados molecularmente e fenotipicamente para resistência a ferrugem.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização genotípica

Foram utilizados genótipos de IAPAR 59, HDT (832/1), HDT (832/2), Catuaí Vermelho, Mundo Novo, derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98, IPR 104, IPR 107 e de uma geração F4 de um cruzamento original de IAPAR 59 X (Etiópia x Catuaí) provenientes de populações melhoradas instaladas no campo experimental do Instituto Agronômico do Paraná (Londrina – Paraná). O DNA genômico foi extraído a partir de folhas pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990). Após a extração a qualidade do DNA foi verificada através de um gel de agarose 1,2% e a quantificação foi feita por espectrofotometria.

Os genótipos foram testados com *primers* desenhados a partir de marcadores *SCARs* (*Sequence Characterized Amplified Regions*), M19 (senso: 5' CAAGCCGATCATAACTTATC 3'; antisenso 5' TGGTGGAGAATTCCTTCAG3') e M20 (senso: 5' CTGATACGGGCAATCTTATC 3'; antisenso: 5' GTAGATCTGGAAGCTCTTC 3'), que flanqueiam *olócus* de resistência à raçall, de acordo com o trabalho de Diola et al., 2011.

APCR multiplex, que permite a amplificação de duas ou mais sequências alvo de DNA diferentes na mesma amostra simultaneamente, foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Paran e Michelmore (1993) com modificações. A amplificação dos *SCARs* foi realizada usando *touchdown*, com 3 ciclos de 94°C por 30s, 62°C (-2 °C) a cada ciclo por 30 s e 72 °C por 60s e 28x

94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 60s , em um volume final de 20 µL, utilizando 2,0 µL de DNA genômico (100 ng/µL), e os demais reagentes: 2,0 µL de tampão PCR ( 10X – Invitrogen ), 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50Mm – Invitrogen), 1,0 µL de dNTP Mix (10 Mm – Invitrogen), 1,0 µL de cada *primer* senso (10 µM – Eurofins), 1,0 µL de cada *primer* antisenso ( 10 µM – Eurofins ) e 1U de Taq DNA Recombinante (Invitrogen), em termociclador Veriti (Applied Biosystem).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,2% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) em tampão TAE 1,0X e, após a eletroforese, visualizados sob luz UV.

### **Caracterização fenotípica**

Primeiramente a caracterização fenotípica de genótipos resistente (IAPAR 59) e suscetível (Catuaí Vermelho) à ferrugem alaranjada do cafeeiro foi realizada em mudas. Foi inoculada uma suspensão de uredósporos com concentração final de 1mg/mL diluído em água destilada, com ajuda de um compressor, em folhas do terceiro e quarto par das plantas de café. Já o primeiro e segundo par de folhas das plantas foram inoculados com meio inerte (*mock-inoculated*) constituído apenas de água destilada. Folhas não inoculadas foram utilizadas como controles (ESKES e TOMA – BRAGHINI, 1982).

Para a germinação dos uredósporos de *H. vastatrix* as plantas de café inoculadas foram cobertas por um saco plástico preto, mantidas no escuro, por 24 horas, com temperatura próxima a 22° C e alta umidade relativa, em casa de vegetação. As plantas foram mantidas até o aparecimento dos sintomas para confirmação da inoculação (ESKES e TOMA – BRAGHINI, 1982).

No processo de caracterização fenotípica por discos foliares de IAPAR 59 e Catuaí Vermelho, foram utilizados recipientes de acrílico (12,0 x 12,0 x 2,5 cm: Gerbox ®) com tampa para acomodar as amostras. As caixas e materiais foram desinfetados em hipoclorito de sódio a 0,3% por 2 horas. A montagem do recipiente compreendeu a colocação de uma espuma de 0,8 cm de espessura no fundo com água (30 mL). Foram coletadas folhas jovens completamente expandidas em plena atividade fisiológica. As folhas foram lavadas em água corrente e enxaguadas em água destilada. Em seguida foram feitos cortes de discos foliares de 2,5 cm de diâmetro e uma posterior lavagem destes para a remoção do conteúdo de

células lesionadas. Os discos foram acomodados nos recipientes com a superfície abaxial voltada para cima. O desenho experimental foi composto de duas parcelas (caixas) com dois genótipos para cada caixa e 8 repetições (8 discos para cada genótipo = 16 discos por caixa = 16 repetições por genótipo).

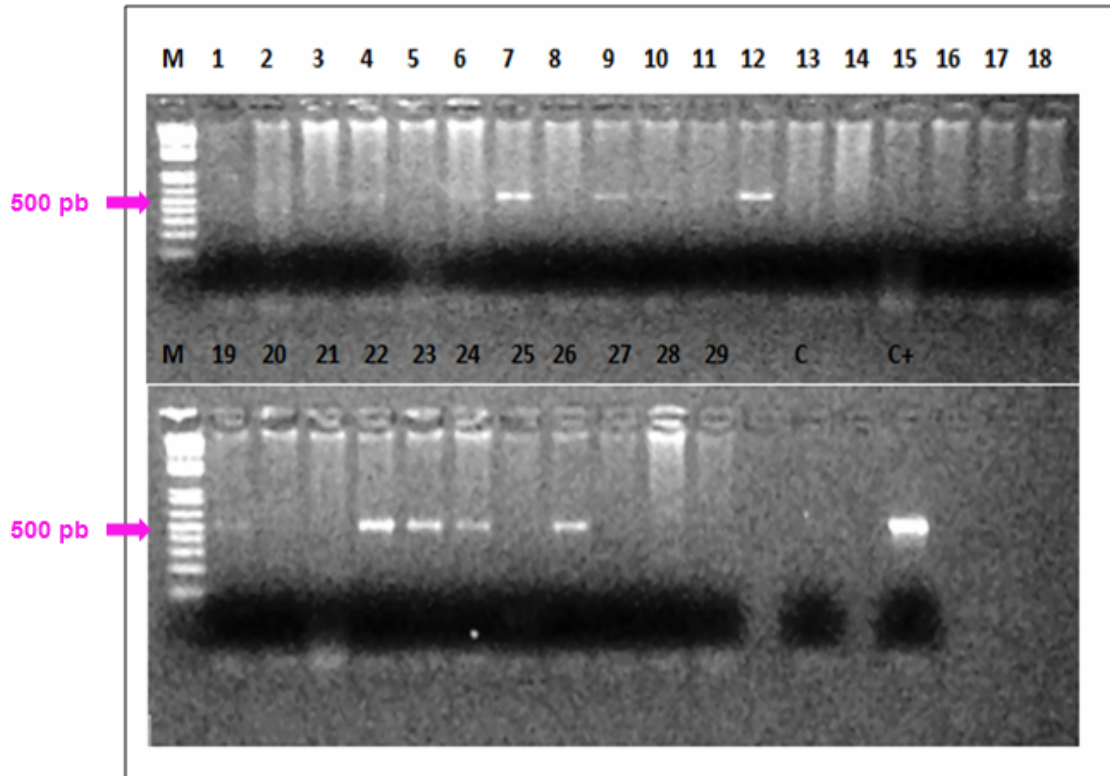
Os discos permaneceram em câmaras de inoculação com a caixa aberta por 2 a 3 horas até secar a superfície foliar exposta. A inoculação foi realizada de acordo com o método proposto por Eskes e Toma – Braghini (1982). Os uredósporos foram obtidos do Instituto Agronômico de Campinas- Centro de Café Alcides Carvalho. Com o auxílio de uma micropipeta foram aplicadas 1 gota de 25  $\mu\text{L}$  de suspensão de uredósporos em água destilada ( $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em cada disco foliar, as caixas permaneceram abertas por aproximadamente 3 horas. Posteriormente as caixas contendo os discos foliares foram acondicionados por um período de 24 horas em ausência de luz, depois expostas a um período de 12 horas de luz sob  $22^\circ\text{C}$  ( $\pm 2$ ) e a saturação da umidade relativa do ar mantida até o final das avaliações.

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Validação dos marcadores para melhoramento assistido**

Na caracterização genotípica de 23 amostras derivadas das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98, IPR 104 e IPR 107 somente 10 amostras apresentaram amplificação (Figura 1), já para o grupo de 22 amostras de uma geração F4 IAPAR 59 X (Etiópia x Catuaí), 21 apresentaram amplificação (Figura 2). Genótipos resistentes de HDT (832/1 e 832/2) e clone BAC do genótipo HDT 832/2 foram utilizados como controle positivo para a amplificação de 500 pb do fragmento de DNA, enquanto que cultivares suscetíveis de *C.arabica* Catuaí Vermelho e Mundo Novo não apresentaram amplificação. O padrão obtido nas análises foi de uma banda de aproximadamente 500 pb, apesar da reação ser multiplex com dois pares de *primers*, M19 e M20. A amplificação de apenas uma banda de 500 pb pode ser devido ao fato das amostras terem sido visualizadas em gel de agarose 1,2%, enquanto que as duas bandas, 533 pb (M19) e 459 pb (M20) padronizadas por Diola et al., (2011) foram visualizadas em gel de poliacrilamida 6%.

**Figura 1** – Amplificação das marcas M19 e M20 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M, marcador; colunas 1-23, genótipos derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98, IPR 104 e IPR 107; colunas 24 e 26, Híbrido de Timor (832/1 e 832/2); colunas 25 e 27, amostras de Catuaí Vermelho; colunas 28 e 29, amostras de Mundo Novo; linha C, controle sem DNA; linha C+, controle positivo (clone BAC do genótipo Híbrido de Timor 832/2).

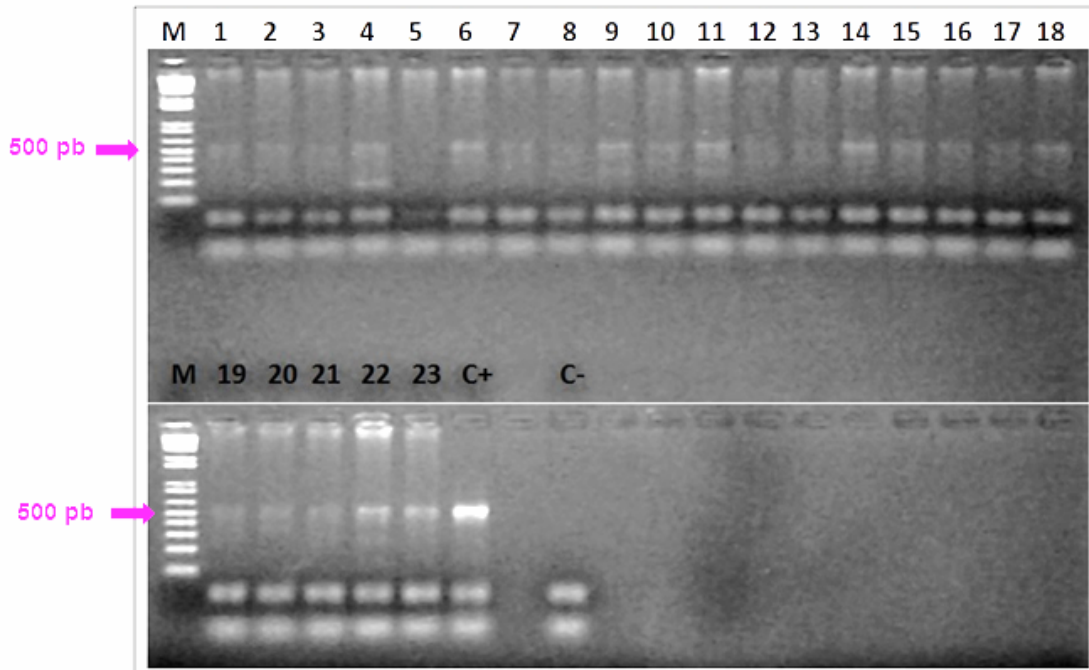


**Tabela 1** – Relação entre genótipos derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98, IPR 104 e IPR 107 e amplificações para as marcas moleculares M19 e M20.

| Coluna do Gel | Genótipo                          | PCR positivo |
|---------------|-----------------------------------|--------------|
| 1             | IAPAR 59 UBS (Sarchimor)          |              |
| 2             | IAPAR 59 fruto graúdo (Sarchimor) |              |
| 3             | IAPAR 59 fruto graúdo (Sarchimor) |              |
| 4             | IAPAR 59 fruto graúdo (Sarchimor) | x            |
| 5             | IAPAR 59 fruto graúdo (Sarchimor) |              |
| 6             | IAPAR 59 fruto graúdo (Sarchimor) | x            |
| 7             | IAPAR 59 fruto graúdo (Sarchimor) | x            |
| 8             | Tupi IAC (Sarchimor)              |              |
| 9             | Tupi IAC (Sarchimor)              | x            |
| 10            | IPR 99 (Sarchimor)                | x            |
| 11            | IPR 99 (Sarchimor)                |              |
| 12            | IPR 99 (Sarchimor)                | x            |
| 13            | IPR 99 (Sarchimor)                |              |
| 14            | IPR 99 (Sarchimor)                |              |
| 15            | IPR 99 (Sarchimor)                |              |
| 16            | IPR 107 (IAPAR 59 x Mundo Novo)   |              |
| 17            | IPR 107 (IAPAR 59 x Mundo Novo)   |              |
| 18            | IPR 107 (IAPAR 59 x Mundo Novo)   | x            |
| 19            | IPR 107 (IAPAR 59 x Mundo Novo)   | x            |
| 20            | IPR 107 (IAPAR 59 x Mundo Novo)   |              |
| 21            | IPR 97 (Sarchimor)                |              |
| 22            | IPR 98 (Sarchimor)                | x            |
| 23            | IPR 104 (Sarchimor)               | x            |

A ausência de produtos de amplificações na maioria dos genótipos derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98, IPR 104 e IPR 107 reforça a hipótese de que a perda de resistência à ferrugem esteja associada à ausência do gene de resistência do estudo. IAPAR 59 possui pelo menos cinco genes de resistência à ferrugem (genes  $S_h$ ). Entretanto, nas várias gerações de auto fecundação para a obtenção das cultivares IPR 99 e IPR 107 ocorreram segregações para os genes de resistência e atualmente, muitas progênies possuem alta frequência de plantas suscetíveis (SERA et al., 2010).

**Figura 2** – Amplificação das marcas M19 e M20 para resistência a ferrugem do cafeeiro. M, marcador; colunas 1-22, amostras da geração F4 de IAPAR 59e (Etiópia x Catuaí); colunas 23, Híbrido de Timor 832/2; C+, controle positivo (clone BAC do genótipo HDT 832/2); C-, controle sem DNA.



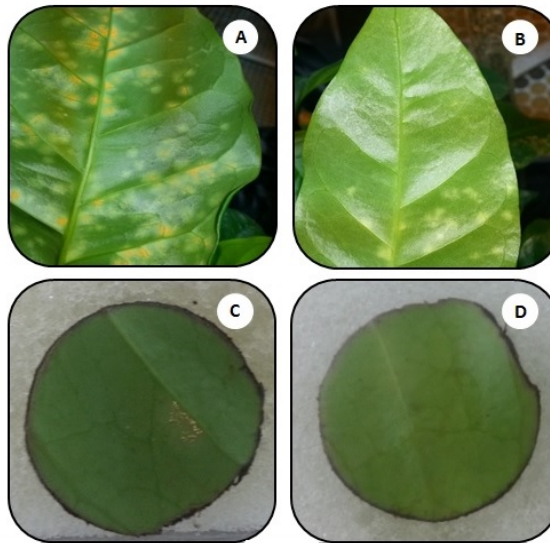
A presença de genótipo resistente em 94,45 % das amostras da progênie F4 reforça a hipótese do gene de resistência ser um único gene dominante. Este estudo confirmou resultados semelhantes alcançados por DIOLA et al., 2011 e por BRITO et al., 2007.

### **Avaliação da resistência à ferrugem**

Duas semanas após a inoculação das plantas e discos foliares com *H. vastatrix* raça II de ferrugem, confirmou-se a suscetibilidade de Catuaí Vermelho, com infecção e esporulação do inóculo, e a resistência de IAPAR 59, que apresentou manchas cloróticas com ausência de esporulação do fungo. Os resultados fenotípicos estão coerentes com estudos anteriores (CAIXETA et al., 2003, BRITO, 2007 e DIOLA et al., 2011), de que a variante da raça II de *H. vastatrix* não infecta o hospedeiro resistente devido a presença de um único gene expressando o caráter de dominância completa. Esta é uma característica de resposta de resistência vertical, onde o fenótipo apresenta claramente o padrão de interação compatível ou incompatível, sem gradientes de resistência. A herança

monogênica, característica de resistência vertical, torna os estudos genéticos e moleculares mais precisos, pois elimina os efeitos de interação entre genes. A escolha da raça II de *H. vastatrix* para a caracterização da resistência foi realizada por ser esta a raça predominante encontrada no Brasil.

**Figura 3** – Genótipos apresentando os aspectos de análise fenotípica: Catuaí Vermelho(A) e (C) como genótipo suscetível, IAPAR 59 (B) e (D) como genótipo resistente. A presença de esporos em (A) e (C) indica o completo ciclo reprodutivo e a interação compatível planta/patógeno.



#### 6.4 CONCLUSÃO

Os resultados sobre a caracterização molecular de genótipos geradas neste trabalho demonstram o potencial dos marcadores M20 e M19 para acelerar e facilitar a identificação de genótipos com resistência à ferrugem, podendo auxiliar os programas de melhoramento visando a seleção precoce de cafeeiros com essa característica.

#### 6.5 ANÁLISES EM ANDAMENTO

Será também realizada a caracterização fenotípica, por discos foliares, dos genótipos derivados das cultivares IAPAR 59, IPR 99, IPR 97, IPR 98 e IPR 104, IPR 107 (Tabela 1) e a progênie F4 de IAPAR 59X (Etiópia x Catuaí).

Espera-se que os genótipos que apresentaram amplificação das marcas relacionadas ao gene de resistência não apresentem *H. vastatrix* completando o ciclo de vida, e nas plantas sem amplificação das marcas, espera-se a infecção e esporulação do inóculo, evidenciando o completo ciclo reprodutivo do patógeno. Os resultados de fenotipagem obtidos nos discos de IAPAR 59 e Catuaí Vermelho serão utilizados como padrão na avaliação de resistência ou suscetibilidade. Serão realizadas novas repetições para genótipos que apresentarem avaliação duvidosa, repetindo o mesmo processo quando apresentarem resultados contraditórios com os obtidos pela genotipagem.

## 6.6 REFERÊNCIAS

BETTENCOURT, A. J.; RODRIGUES JR. C. J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. **Elsevier Applied Science** In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed) Coffee Agronomy, v.4, p.199–234, 1988.

BRITO, G. G. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa, Brasil, p.98, 2007.

CAIXETA, E.T.; RUFINO, R.J.N.; OLIVEIRA, A.C.B.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L. Caracterização da resistência genética do híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, (Ed): Porto Seguro. Anais. Brasília - DF: Embrapa Café. p. 226, 2003.

DEL GROSSI, L.; SERA, T.; SERA, G.H.; FONSECA, I.C.DE B.; ITO, D.S.; SHIGUEOKA, L.H.; ANDREAZI, E.; CARVALHO, F.G. Rust Resistance in arabic coffee cultivars in northern Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.56, n.1, p.27-33, 2013.

DIOLA, V.; BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; SAKIYAMA, N. S.; LOUREIRO, M. E. High – density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics & Genomes**. v.7, p.1199-1208, 2011.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**.v.12, p.13-15, 1990.

ESKES, A.B.; TOMA-BRAGHINI, M. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. and Br.). **Plant Protocol Bulletin FAO(Rome)**. v.29, p.56–66, 1982.

ICO, International Coffee Organization. Site: [www.ico.org](http://www.ico.org). 2014.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR- based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 85, p.985-993, 1993.

SERA, G. H.; SERA, T.; ITO, D. S.; AZEVEDO, J. A. DE.; MATA, J. S. DA.; DOI, D. S. Resistance to leaf rust in coffee carrying  $S_{h3}$  gene and others  $S_h$  genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.50, p.753- 757, 2007a.

SERA, G. H.; SERA, T.; ITO, D. S.; AZEVEDO, J. A. DE.; MATA, J. S. DA.; DOI, D. S. Selection for durable resistance to leaf rust using test-crosses on IAPAR-59 and Tupi IAC 1669-33 cultivars of *Coffea arabica*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.50, p.565-570, 2007b.

SERA, G.H.; SERA, T.; ITO, D.S.; FONSECA, I.C.B.; KANAYAMA, F. S.; DEL GROSSI, L.; SHIGUEOKA, L.H. Seleção para a resistência à ferrugem em progênies das cultivares de café IPR 99 e IPR 107. **Bragantia**.v. 69, n. 3, p547-554, 2010.

**ANEXO**

## ANEXO A

Germinação em água de uredósporos de *H. vastatrix* raça II com a presença de haustórios, visualização em luz de microscópio.

