

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

GIOVANA GOMES ESTANISLAU

**IDENTIFICAÇÃO DE ANÁLOGOS A GENES DE RESISTÊNCIA (RGAs) A
Hemileia vastatrix NO GENOMA de *Coffea arabica* E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA NA INTERAÇÃO**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

GIOVANA GOMES ESTANISLAU

**IDENTIFICAÇÃO DE ANÁLOGOS A GENES DE RESISTÊNCIA (RGAs) A
Hemileia vastatrix NO GENOMA de *Coffea arabica* E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA NA INTERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

E79i
2022

Estanislau, Giovana Gomes, 1997-

Identificação de análogos a genes de resistência (*RGAs*) a *Hemileia vastatrix* no genoma *Coffea arabica* e avaliação da expressão gênica na interação / Giovana Gomes Estanislau. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (59 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Eveline Teixeira Caixeta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.383>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Café - Melhoramento genético. 2. Bioinformática. 3. Ferrugem-do-cafeeiro. 4. Marcadores genéticos. 5. Café - Resistência a doenças e pragas. I. Caixeta, Eveline Teixeira, 1972-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 633.732

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

GIOVANA GOMES ESTANISLAU

IDENTIFICAÇÃO DE ANÁLOGOS A GENES DE RESISTÊNCIA (RGAs) A *Hemileia vastatrix* NO GENOMA de *Coffea arabica* E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NA INTERAÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de maio de 2022.

Assentimento:


Giovana Gomes Estanislau
Autora


Eveline Teixeira Caixeta
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço pelo dom da vida, por sentir sua presença em cada passo, me fortalecendo e me guiando sobre cada obstáculo.

Aos meus pais, Rosângela e Geovane por terem sido meus primeiros professores da vida, da educação, do amor e do aprendizado, obrigada por plantarem em mim o gosto pelo estudo. Obrigada por toda força e orações ao longo desses anos, sem vocês eu não teria conseguido chegar onde estou.

À minha avó Édela (em memória) que sempre me incentivou a estudar e não desistir dos meus sonhos.

Ao meu noivo Kayan por todo incentivo, paciência, força e auxílio durante todo o mestrado.

Ao Edson, que foi peça chave na realização desse trabalho, me auxiliou e me guiou para a realização e conclusão de todas as análises de Bioinformática, muito obrigada por todo conhecimento transmitido com tanta didática e clareza.

À minha coorientadora Dênia e orientadora Eveline por toda ajuda e auxílio para a conclusão dessa dissertação.

À Universidade Federal de Viçosa por ter me selecionado como aluna em um de seus programas de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudo e incentivo a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, ao Consorcio pesquisa café e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café- INTC pelo apoio.

BIOGRAFIA

Giovana Gomes Estanislau, filha de Geovane José Estanislau e Rosangela Maria Gomes Estanislau, nasceu em Manhuaçu, Minas Gerais, em 4 de maio de 1997.

Em fevereiro de 2016 iniciou a graduação em Biomedicina, pela faculdade de Minas-Unifaminas, diplomando-se em dezembro de 2019.

Em abril de 2020, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

RESUMO

ESTANISLAU, Giovana Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **Identificação de análogos a genes de resistência (RGAs) a *Hemileia vastatrix* no genoma *Coffea arabica* e avaliação da expressão gênica na interação.** Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta.

Das mais de 100 espécies de café, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as de maior interesse comercial. As pragas e doenças que incidem sobre os cafeeiros são responsáveis pela redução da qualidade e produtividade da cultura, além de elevarem os custos de produção e os riscos ambientais advindos da aplicação de agrotóxicos. Um exemplo é a doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Alternativas de controle das doenças do cafeeiro têm sido desenvolvidas, com destaque à obtenção e uso de cultivares resistentes. Sendo assim, os estudos do genoma e genética funcional de plantas e interações com patógenos aumentaram consideravelmente a compreensão acerca das bases moleculares associadas com o processo de infecção e defesa das plantas. Essas tecnologias têm fornecido oportunidade para selecionar novos alvos a serem incorporados nas novas cultivares com o objetivo de obter resistência duradoura. Um alvo candidato importante a ser explorado são os genes PRRs (*Pattern Recognition Receptor*) e R (*Plant resistance genes*), chamados de análogos de genes de resistência (*Resistance Gene Analog -RGAs*) que compartilham domínios e motivos conservados. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi identificar e classificar análogos a genes de resistência (RGAs) no genoma de *C. arabica* e analisar sua expressão em transcriptoma da interação *Coffea-Hemileia vastatrix*. Para isso, uma abordagem baseada em predição de domínios funcionais em proteínas codificadas pelos RGAs foi empregada, fazendo uso de duas ferramentas, sendo elas, o RRGPredictor e o DRAGO2. Foram identificadas dezenove classes gênicas e vinte e cinco genes candidatos com potencial envolvidos na resistência de *C. arabica* a *H. vastatrix*. No transcriptoma da interação *Coffea-H. vastatrix* foi observada uma possível atuação dos genes identificados na resistência pré-haustorial do cafeeiro. A identificação desses genes permitirá entender melhor como funciona a interação entre *Coffea* e *Hemileia vastatrix*, além de contribuir para a seleção assistida de cultivares cafeeiras resistentes nos programas de melhoramento.

Palavras-chave: Bioinformática. Ferrugem no cafeeiro. Análogos de genes a resistência.

ABSTRACT

ESTANISLAU, Giovana Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2022.
Identification of resistance gene analogs (RGAs) to *Hemileia vastatrix* in the *Coffea arabica* genome and evaluation of expression in the interaction. Adviser: Eveline Teixeira Caixeta.

Among more than 100 species of coffee *Coffea arabica* and *Coffea canephora* are the ones with greatest commercial value. Pests and diseases that affect coffee trees are responsible for reducing the quality and productivity of the crop, in addition, they increase production costs and environmental risks arising from the application of pesticides. One example is the disease caused by the fungus *Hemileia vastatrix*. Alternatives to control coffee diseases have been developed, with emphasis on obtaining and using resistant cultivars. Thus, studies of the genome and functional genetics of plants and interactions with pathogens have considerably increased the understanding of the molecular bases associated with the process of plant infection and defense. These technologies have provided an opportunity to select new targets to be incorporated into new cultivars in order to obtain longer resistance. An important candidate target to be explored are the PRRs (*Pattern Recognition Receptor*) and R (*Plant resistance genes*), called *Resistance Gene Analogues (RGAs)* that share conserved domains and motifs. Therefore, the aim of this study was to identify and classify resistance gene analogues (RGAs) in the genome of *C. arabica* and analyze their transcriptome expression of the *Coffea-Hemileia vastatrix* interaction. For this, an approach based on prediction of functional domains in proteins encoded by RGAs was employed, making use of two tools, namely, RRGPredictor and DRAGO2. Nineteen gene classes and twenty-five candidate genes were identified with potential involved in the resistance of *C. arabica* to *H.vastatrix*. In the transcriptome of the *Coffea-H. vastatrix*, a possible action of the genes identified in the pre-haustorial resistance of the coffee tree was observed. The identification of these genes will allow a better understanding of how the interaction between *Coffea* and *Hemileia vastatrix* works, in addition to contributing to the assisted selection of resistant coffee cultivars in breeding programs.

Keywords: Bioinformatics. Coffee leaf rust. *Resistance Gene Analog.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Avr	Proteínas de avirulência do patógeno
CIFC	Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro
CNL	<i>Coiled coil (CC)-Nucleotide Binding Site (NBS)-Leucine Rich Repeat (LRR)</i>
CN	<i>Coiled Coil (CC)-Nucleotide Binding Site (NBS)</i>
DAMP	Padrões moleculares associados a danos em plantas
ETI	Imunidade desencadeada por efetores
ETS	Suscetibilidade desencadeada por efetores
GenesR	Genes de resistência de plantas
HR	Reação de hipersensibilidade
HdT	Híbrido de Timor
KIN	Domínio quinase
MAPK	Proteína quinases ativadas por mitógenos
N	<i>Nucleotide Binding Site (NBS)</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NL	<i>Nucleotide Binding Site (NBS)-Leucine Rich Repeat (LRR)</i>
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRGdb	Banco de dados do genoma de resistência de plantas
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
PTI	Imunidade desencadeada por PAMP
RGA	Análogos a genes de resistência

RLK *Receptor Like Kinase*

RLK-GNK2 RLK com um domínio GNK2

RLP *Receptor-Like Proteins*

RPW8-NL Resistencia ao pó de mofo

T *Toll/Interleucina-1-like receptor*

TM Domínio transmembranar

TNL *Toll/Interleucina-1-like receptor (TIR)-Nucleotide Binding Site (NBS)-Leucine Rich Repeat (LRR)*

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	12
2.2. Objetivo geral	12
2.3. Objetivos específicos:.....	12
3. Fundamentação teórica.....	13
3.1. Importância econômica do cafeeiro.....	13
3.2. Origem e botânica do cafeeiro.....	14
3.3. <i>Coffea arabica</i>	14
3.4. Ferrugem do cafeeiro.....	16
3.5. Resistência genética do cafeeiro à ferrugem.....	17
3.6. Interação planta patógeno.....	19
3.7. Análogos de genes a resistência - <i>RGAs</i>	20
3.8. Ômicas e os estudos de genes de resistência.....	22
3.9. Bioinformática aplicada para estudos de genes de resistência.....	23
4. Metodologia.....	24
4.1. Identificação de <i>RGAs</i> no genoma de <i>Coffea arabica</i>	24
4.2. Seleção de <i>reads</i> de alta qualidade em transcriptoma da interação <i>Coffea-Hemileia vastatrix</i>	26
4.3. Quantificação da expressão gênica.....	27
4.4. Análise da expressão diferencial.....	27
4.5. Localização dos <i>RGAs</i> a partir dos genes diferencialmente expressos do Híbrido de Timor nos sub genomas de <i>C. arabica</i>	28
5. Resultado e discussão.....	28
5.1. Predição dos genes presentes no genoma de <i>Coffea arabica</i>	28
5.2. Avaliação dos níveis de expressão dos <i>RGAs</i> no transcriptoma de interação <i>Coffea-H. vastatrix</i>	33

5.2.1. Genes <i>RGAs</i> <i>down</i> regulados e <i>up</i> regulados na interação <i>Coffea-H. vastatrix</i>	33
5.3. Perfil de agrupamento dos genes expressos exclusivos no Híbrido de Timor.....	35
5.4. Nível de expressão gênica de resistência dos prováveis <i>RGAs</i> no Híbrido de Timor	37
5.5. Genes <i>up</i> regulados exclusivamente no Híbrido de Timor encontrados na sub genoma de <i>C. canephora</i> e <i>C. eugenioides</i>	38
6. Conclusão.....	44
Referências Bibliográficas.....	45

1. Introdução

Dentre as bebidas mais consumidas no mundo, o café ganha destaque devido a sua importância na economia, promovendo renda e gerando oportunidades de emprego em toda a cadeia produtiva. Das mais de 100 espécies de café descritas, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as de maior interesse comercial (COUTO et al., 2019; BRASIL, 2020).

A espécie *C. arabica* possui uma base genética estreita, resultante de sua origem, dispersão e tipo de reprodução (SCALABRIN et al., 2020). Setotaw et al. (2013) relataram que essa baixa variabilidade genética, no Brasil, ocorre também porque a grande maioria das cultivares lançadas tem origem em parentais comuns. Essas características associadas ao desenvolvimento e plantio de cultivares melhoradas (pressão de seleção) resulta em menor vulnerabilidade das lavouras cafeeiras a doenças e pragas e aos impactos das mudanças climáticas (SCALABRIN et al., 2020; KIWUKA et al., 2021).

As pragas e doenças que incidem sobre os cafeeiros são responsáveis pela redução da qualidade e produtividade do cultura, além de elevarem os custos de produção e os riscos ambientais advindos da aplicação de agrotóxicos (PEIXOTO et al., 2017; VELÁSQUEZ et al., 2020). Um exemplo é a doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, conhecida popularmente como a ferrugem do cafeeiro, que ocasiona o desfolhamento maciço, seca dos ramos e, conseqüentemente, perda de produtividade (MATIELLO et al., 2019).

Na América Central, este fungo causou grandes danos que implicaram na perda de empregos de cerca de 1,7 milhão de trabalhadores do café e perda de receita em torno de US \$ 3,2 bilhões em 2017 (ZAMBOLIM & CAIXETA, 2021). No Brasil, as perdas contabilizam cerca de 35% onde existem condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do fungo, todavia, quando ocorre períodos de seca prolongados a estimativa de perdas na produção pode alcançar 50% (ZAMBOLIM, 2016; TALHINHAS et al., 2017; ZAMBOLIM & CAIXETA, 2021). Alternativas de controle para essa doença têm sido desenvolvidas, com destaque à obtenção e uso de cultivares resistentes.

Os estudos do genoma e genética funcional de plantas e interações com patógenos aumentaram consideravelmente a compreensão acerca das bases moleculares associadas com o processo de infecção dos patógenos e defesa das plantas. Essas tecnologias têm fornecido oportunidade de selecionar novos alvos a serem incorporados nas novas cultivares com o objetivo de obter resistência duradoura. Os genes análogos a resistência (*Resistance Gene Analog - RGAs*) representam importantes alvos a serem explorados.

As proteínas codificadas pelos *RGAs*, reconhecem as proteínas codificadas pelos genes efetores dos patógenos, que possuem domínios conservados. A partir da função bioquímica e homologia desses domínios, os produtos proteicos dos genes de resistência são agrupados em 13 classes: CN(CC-NBS), CNL(CC-NBSrh-LRR), MLO-like (*Mildew resistance Locus*), N(NBS), NL(NBS-LRR), “Outros” (outros genes descritos como de resistência), RLK(*Receptor-Like Kinase*), RLK-GNK2(RLK com um domínio GNK2), RLP(*Receptor-Like Proteins*), RPW8-NL (*Resistance to powdery mildew8*), T(TIR), TNL(TIR-NBS-LRR) e uma classe desconhecida (sem padrão) (SILVA & MICHELI, 2020).

Apesar de alguns *RGAs* já terem sido identificados em plantas, o mecanismo preciso em que as proteínas são codificadas por esses genes e desencadeiam sua função de resistência ainda é desconhecido. Além disso, a resistência conferida do produto desses genes pode ser suplantada devido a processos de coevolução entre planta e patógeno. Dessa forma, são necessários mais estudos nessa área de pesquisa, principalmente para o cafeeiro, onde os conhecimentos e funções desses genes são escassos (SANSEVERINO et al., 2009; OSUNA-CRUZ et al., 2018; ALMEIDA et al., 2021; BARKA et al., 2020).

2. Objetivos

2.2. Objetivo geral

Identificar e classificar análogos a genes de resistência (*RGAs*) no genoma de *C. arabica* e analisar sua expressão em transcriptoma da interação *Coffea-Hemileia vastatrix*. Identificar os potenciais genes candidatos para posterior utilização em seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento.

2.3. Objetivos específicos:

- Recuperar as sequências de genes *RGAs* presentes nos bancos de proteínas preditas de *C. arabica*;
- Identificar quais classes gênicas os *RGAs* pertencem;
- Realizar análise diferencial de expressão gênicas dos *RGAs* em transcriptoma da interação *Coffea-Hemileia vastatrix*;
- Identificar os potenciais genes candidatos para posterior utilização em seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento.

3. Fundamentação teórica

3.1. Importância econômica do cafeeiro

Os primeiros relatos da chegada do café no Brasil ocorreram em 1727 vindo da Guiana francesa pelo português Francisco de Mello Palheta. Os cafeeiros foram inicialmente plantados no estado do Pará e, então, se expandiram para o Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (CARVALHO, 1993; BRASIL, 2017).

Com a chegada da família real no Brasil em 1808 e a ascensão do café no mercado mundial, através de incentivos da Corte, o Brasil passou a aumentar a sua produção. Em 1830, o Brasil já era o principal produtor de café no mundo, com cerca de 650 mil sacas, seguido de Cuba, Java e Haiti, e a partir de 1845, foi considerado o maior exportador de grão de café do mundo (MATIELLO et al., 2020).

Para todos os países produtores, o café tem sido considerado uma das culturas mais importantes na agricultura, sendo classificado como a segunda bebida mais popular ficando atrás somente do chá (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; ARAÚJO, 2021). Cerca de 2,25 bilhões de xícaras de café são consumidas diariamente em todo o mundo, estimando cerca de 10 bilhões de quilogramas de grãos de café (JHAVERI, 2021).

O café tem sido considerado como um alimento funcional e seus efeitos farmacológicos tem sido abordados por vários estudos (AMANO et al., 2019; BOSSO et al., 2019). Mais de mil compostos químicos distintos são encontrados no café, incluindo, vitaminas, minerais, carboidratos, bem como alcalóides (WACHAMO, 2017). Dessa forma, de acordo com estudos observacionais, o consumo de café está ligado a um menor índice de risco de mortalidade (JHAVERI, 2021) por várias doenças como: diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer (POOLE et al., 2017). Poole et al. (2017), após realizarem uma revisão com 201 meta-análises de pesquisas observacionais contendo 67 resultados de saúde exclusivos e 17 meta-análises de pesquisa de intervenção contendo nove resultados exclusivos, concluíram que o consumo de café dentro dos níveis usuais de ingestão (três a quatro xícaras por dia) é considerado mais benéfico do que maléfico para a saúde humana (CANO, 2013).

Essa importância econômica, cultural e na saúde humana tem refletido em alta produção mundial de café, tanto para *C. canephora* quanto para *C. arabica* que são as espécies cultivadas. A previsão para 2022 da produção mundial de *C. canephora* é de 17 milhões de sacas de 60kg. Já para a espécie *C. arabica* a estimativa mundial de sacas produzidas aproxima-se de 38,7 milhões (CONAB, 2022).

3.2. Origem e botânica do cafeeiro

Por volta de 850 anos D.C. ocorreu os primeiros relatos de que as bagas de café foram descobertas no norte da África, mais especificamente na região de Kefa também conhecida como Harar. Os impérios ocidentais dividiram a África no século XIX e XX para desenvolver territórios de controle. O Kefa região agora localizada na Etiópia, foi onde um pastor de cabras chamado Kaldi observou um comportamento frenético em seu rebanho após as cabras terem se alimentado de frutas amarelas-avermelhadas, que são os frutos de café (RODEN, 1994; ARAUZ, 2017).

O café é da família botânica Rubiaceae, apresentando cerca de 630 gêneros e mais de 10 mil espécies agrupadas. Em sua grande maioria, são arbustos e árvores tropicais, que crescem nas áreas mais baixas das matas (CLIFFORD & WILLSON, 1985; DIBY et al., 2016). Os cafeeiros são reunidos em dois gêneros: o *Psilanthus Hook* e *Coffea L.*, que se diferem por meio das estruturas florais. A grande maioria das espécies do subgrupo *Coffea* é originada da Ilha de Madagascar e em ilhas vizinhas, e as demais são nativas da África Continental, onde se localizam as espécies cultivadas do cafeeiro: *Coffea arabica L.* e *Coffea canephora Pierre* (BRIDSON, 1994).

O gênero *Coffea* se caracteriza pela arquitetura formada por apenas um ou múltiplos ramos verticais se ramificando em múltiplos ramos secundários horizontais. Apresentam folhas opostas e simples, flores de corola branca que produzem quantidades elevadas de néctar e frutos com uma polpa adocicada constituídos por duas amêndoas com uma cicatriz longitudinal (CHARRIER & ESKES, 2004). As duas espécies mais importantes desse gênero são a espécie *C. canephora* originada da África tendo sua classificação em 1895-1897 e a espécie *C. arabica* originada da Etiópia que teve sua classificação botânica em 1737 (CHARRIER & BERTHAUD, 1985; FERRÃO et al., 2007; DIBY et al., 2016).

3.3. *Coffea arabica*

A espécie *C. arabica* tem sua origem na Etiópia e no sul do Sudão, sendo cultivada pela primeira vez no Iêmen no século XVII (SYLVAIN, 1955; JONES et al., 2014). É caracterizada pelo baixo teor de cafeína nos grãos, doçura e aroma intensos, e é cultivada em altitudes elevadas (BRAINER, 2018; VELOSO et al., 2020).

Essa espécie de cafeeiro é a mais importante correspondendo cerca de 59% (99,3 milhões de sacas) do café comercializado mundialmente (FERREIRA & SANTOS, 2022), e também é a única do gênero caracterizada como tetraploide, as demais são diploides. A

reprodução dessa espécie ocorre principalmente por meio da autofecundação (autógama), apresentando uma estimativa de 90% das suas flores serem fertilizadas pela junção de pólen e óvulo advindas da mesma planta (SOUZA et al., 2004).

O café arábica é um alotetraploide ($2n = 4 \times = 44$) tendo sua origem advinda da hibridação natural de duas espécies diploides ($2n = 2 \times = 22$), *C. canephora* e *C. eugenioides* (LASHERMES et al., 1999; SETOTAW et al., 2013; YUYAMA et al., 2016). Harlan & Dewet (1975) relataram que possivelmente as primeiras plantas poliploides férteis deste cruzamento são decorrentes dos híbridos diploides interespecíficos que realizaram a duplicação dos seus cromossomos, ou via retrocruzamentos de triploides espontâneos (LASHERMES et al., 1999).

As espécies que deram origem a *C. arabica*, possuem características distintas, sendo *C. eugenioides* caracterizada por possuir maior qualidade de bebida em comparação as outras espécies conhecidas, no entanto, são menos resistentes aos fatores abióticos e bióticos, além de produzirem grãos pequenos. Já *C. canephora* apresenta qualidade inferior, todavia, é mais resistente a estresses bióticos e abióticos, apresentam grãos maiores e são mais produtivos. A espécie *C. eugenioides* é encontrada nas terras altas da região da crista e se adapta melhor em condições frescas e secas, em contrapartida *C. canephora* está distribuído nas florestas tropicais da várzea do oeste e centro da África (DAVIS, 2006; MAURIN et al., 2007; GUERREIRO-FILHO, 2019).

A espécie *C. arabica* possui duas variedades botânicas, *Typica* e *Bourbon*. *Typica* foi a variedade inicialmente introduzida no Brasil, possui porte alto, com cerca de cinco metros de altura, e tronco fino, com galhos delgados que, devido à sua altura, estão bem espaçados. *Typica* também pode ser identificada por suas folhas grandes com pontas de cor bronze e formato alongado de suas cerejas (MATIELLO et al., 2010). *Bourbon* vem de uma mutação natural de *Typica*, que ocorreu na ilha da Reunião (na época chamada *Bourbon*). Seu rendimento é superior ao de *Typica* e tem sido muito valorizado pela indústria, pois produz um café que apresenta uma doçura distinta (ROMANO, 2021). Os cafeeiros *Bourbon* são caracterizados pelo porte alto e apresentam baixo vigor e maior sensibilidade após a carga, com infecção mais severa de cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke) e ferrugem (*Hemileia vastatrix*) (MATIELLO et al., 2010).

Devido ao contínuo avanço do melhoramento genético dessas variedades, bem como, a assertiva escolha das cultivares adaptadas, observa-se uma evolução significativa no que se refere as diferentes condições e sistema de cultivo, apresentando maturação mais uniforme, tolerância a extensos períodos de déficit hídrico, porte baixo, além da constante busca no que

se refere ao aperfeiçoamento da qualidade de bebida. Outro fator importante considerado na busca em programas de melhoramento é a adaptação a diferentes regiões, elevada produtividade e resistência a doenças e pragas visando contribuir para a autossuficiência regional do café e seus derivados (SILVA et al., 2019).

3.4. Ferrugem do cafeeiro

A ferrugem do cafeeiro é causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* identificado por Berk e Broome. A presença desse patógeno nas lavouras de café pode ser identificada visualmente pelos seus sintomas característicos constituídos por manchas amareladas translúcidas que gradativamente vão aumentando até a formação de um pó de cor alaranjada, na face abaxial da folha. O fungo provoca desfolha nas plantas, seca dos ramos laterais, afeta o florescimento, a colheita e, conseqüentemente, a produção no ano seguinte (MATIELLO et al., 2019). Os fatores que influenciam no aparecimento e na disseminação da doença são: umidade alta do ar, temperatura entre 20 a 24°C, chuvas frequentes, pouca luminosidade na lavoura e uso de variedades muito suscetíveis (CASTILLO, 2016; TALHINHAS et al., 2017).

Até meados do século XIX, o café cultivado mundialmente não apresentava ferrugem e dados significativos de quaisquer outras pragas e doenças (MCCOOK, 2006). No entanto, em 1869, no Ceilão, foi descrito esse patógeno causador da ferrugem, sendo considerada a doença mais importante do café, especialmente para a espécie *C. arabica*. Atualmente essa doença atinge todos os continentes e regiões produtoras de café (TALHINHAS et al., 2017; ZAMBOLIM & CAIXETA., 2021), podendo causar redução de 30 a 50% das produções quando não são utilizadas medidas de controle (MATIELLO, 1991; TALHINHAS et al., 2017).

A ferrugem do cafeeiro foi observada no Brasil em 1970 no estado da Bahia (região sul) e se espalhou rapidamente por todo país (TALHINHAS et al., 2017), se tornando atualmente uma das principais ameaças à produção (ZAMBOLIM & CAIXETA, 2021). Ademais, em outros países como por exemplo o Peru, a incidência pode chegar a 74-94% (ALVARADO et al., 2017; VENTURA et al., 2020).

Recentemente no Havaí, a doença foi observada pela primeira vez. Em 21 de outubro de 2020, um cafeicultor no condado de Maui, Havaí, relatou a presença de sintomas semelhantes à ferrugem da folha de café em plantas de café (var. '*Typica*') em sua fazenda com muitas árvores fortemente desfolhadas. Estudos de PCR e sequenciamento foram realizados

com as amostras coletadas e verificaram que os isolados encontrados no Havaí têm semelhança nucleotídica com os isolados pertencentes ao México e Brasil (KEITH et al., 2022).

A ferrugem tem sido observada em quase todas as regiões produtoras de café no mundo e as várias raças do patógeno existentes são capazes de suplantar a resistência dos cafeeiros (TALHINHAS et al., 2017). Portanto, o estudo da resistência presente no gênero *Coffea* se torna muito importante no desenvolvimento de novas cultivares resistente a ferrugem.

3.5. Resistencia genética do cafeeiro à ferrugem

O uso de cultivares resistentes é considerada a melhor alternativa para o controle de doenças nos cafezais (MOHAMMED, 2015; TALHINHAS et al., 2017; SILVA et al., 2018), devido à redução na utilização de controle químico e diminuição dos problemas ambientais (RABELO, 2018). No entanto, é um desafio para os melhoristas o desenvolvimento de cultivares contendo resistência duradoura, principalmente para a ferrugem do cafeeiro. O fungo *H. vastatrix* apresenta grande variabilidade genética, resultando no aparecimento de novas raças e ocorrência de raças complexas. Essa característica demonstra o grande potencial evolutivo do fungo e sua conseqüente adaptação e suplantação da resistência vertical presente nas cultivares (ZAMBOLIM et al., 2005; CABRAL et al., 2016; CARVALHO et al., 2011).

Mundialmente já foram identificadas 50 raças de *H. vastatrix* (GICHURU et al., 2012; VÁRZEA & MARQUES., 2005; TALHINHAS et al., 2017), sendo 16 raças encontradas no Brasil (I, II, III, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXXIII, XXXVII, XXIX e XXX) (CARDOSO et al., 1986, ZAMBOLIM et al., 2005; CAPUCHO et al., 2012; SILVA et al., 2017; ZAMBOLIM & CAIXETA 2021). O aparecimento de raças com elevado espectro de virulência, como observada na raça XXXVII (v2,5,6,7,9) (CABRAL et al., 2016) e a elevada diversidade genética das populações do patógeno (NUNES et al., 2009; MAIA et al., 2013; CASTRO et al., 2022) desafiam os melhoristas que buscam cultivares com resistência durável.

Até o momento foram identificados e caracterizados pelo menos nove genes dominantes (S_{H1} , S_{H2} , S_{H3} , S_{H4} , S_{H5} , S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9}) que isolados ou em associação conferem resistência ao cafeeiro a *H. vastatrix* (TALHINHAS et al., 2017). Na espécie *C. arabica* foram identificados quatro desses genes S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} (NORONHA-WAGNER & BETTENCOURT, 1967; BETTENCOURT & NORONHA-WAGNER, 1971), em *C. canephora* foram encontrados os genes S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} , S_{H9} e S_{H10} e em *C. liberica* o S_{H3} (BETTENCOURT, 1973; BETTENCOURT et al. 1980). Além desses genes, outros dois genes candidatos a S_H foram identificados e caracterizados molecularmente, sendo um gene da classe

dos *CC-NBS-LRR*(CNL) e outro pertencente a classe dos *LRR-RLK*(RLK), ambos compartilham sequências conservadas com outros genes S_H , e podem ser um dos S_H ainda não identificados e não suplantados (BARKA et al., 2020; ALMEIDA et al., 2020).

As principais fontes de genes de resistência a ferrugem, utilizadas nos programas de melhoramento genético, são os híbridos interespecíficos Híbrido de Timor (HdT) e Icatu, originados do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora*, e as seleções Indianas originadas de *C. arabica* x *C. liberica* (ZAMBOLIM, 2002; TALHINHAS et al., 2017). Esses híbridos são tetraploides e, portanto, permitem a introgressão dos genes das espécies *C. canephora* e *C. liberica* em cultivares de *C. arabica*. Em 1917, o HdT foi relatado pela primeira vez em uma plantação de cultivar *Typica* na Ilha de Timor (BETTENCOURT, 1973) e vem sendo utilizado como fonte de resistência não só para ferrugem, mas também para outras pragas e doenças economicamente relevantes do café (BERTRAND et al., 2003).

A partir de 1955, o Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, deu início a um programa de melhoramento de cultivares de *C. arabica* resistentes a *H. vastatrix*, por meio da transferência da resistência do HdT para as cultivares melhoradas. Os resultados obtidos por meio da inoculação de derivados do HdT demonstraram que os cafeeiros possuíam pelo menos cinco genes dominantes (S_{H5} , S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9}) (BETTENCOURT et al., 1992), presentes individualmente ou associados em diferentes acessos.

Algumas das plantas com resistência foram disponibilizadas para as instituições de pesquisa no mundo. Os híbridos Villa Sarchi x HdT CIFC832/2 e Caturra x HDT CIFC832/1, advindos do CIFC, deram origem as populações de cafeeiros denominados de Sarchimor e Catimor, respetivamente. As plantas dessas populações, bem como, do cruzamento Caturra x HdT CIFC1343 foram obtidas e distribuídas para os vários países produtores de café, têm sido consideradas como fonte de resistência para as principais cultivares resistentes a ferrugem, plantadas em todo o mundo (VALENCIA et al., 2017). Essas populações combinam as boas características agrônômicas de variedades comerciais com a resistência obtida por meio do HdT (RODRIGUES et al., 2003; SILVA et al., 2018).

Apesar de atualmente já terem sido lançadas várias cultivares resistentes à ferrugem, a coevolução planta-patógeno tem levado a suplantação de alguns desses cafeeiros (BETTENCOURT, 1981; TALHINHAS et al., 2017). Essa suplantação pode ser resultante de mutações de genes do fungo. O patógeno possui várias proteínas codificadas por genes efetores, que são importantes para a sua infecção no hospedeiro. Alguns cafeeiros tem a capacidade de reconhecer, por meio de proteínas codificadas pelos genes R, algumas das proteínas codificadas

pelos efetores que acionam o seu mecanismo de defesa. O patógeno, na coevolução, troca a estrutura conformacional das proteínas efetoras, evitando o reconhecimento da planta. Castro et al. (2022) identificaram, com base em análises do transcriptoma de *H. vastatrix*, doze genes que podem ser efetores potenciais. Oito genes foram regulados positivamente nos estágios iniciais e foram considerados os principais efetores candidatos.

Logo, mesmo com os avanços científicos, ainda há perdas significativas devido a infecção desse patógeno e também mecanismos de defesa ainda desconhecidos. Com isso, se torna importante o conhecimento dos genes de resistência e de defesa que estão envolvidos na interação *Coffea-H. vastatrix* para que haja maior eficiência no desenvolvimento de cultivares com resistência durável e de amplo espectro.

3.6. Interação planta patógeno

As plantas constantemente são expostas a uma grande variedade de patógenos, incluindo por exemplo fungos, bactérias e vírus. Para a sua sobrevivência, as mesmas desenvolvem mecanismos de defesa inato, visando reconhecimento e resistência ao ataque de patógenos (LEITE et al., 2020).

O sistema imunológico das plantas (imunidade inata) é formado por duas linhas de defesa principais. A primeira é denominada de imunidade desencadeada por PAMP (PTI – do inglês “*PAMP Triggered Immunity*”) que realiza uma resposta de defesa basal. Já a segunda é a imunidade desencadeada por efetores (ETI – do inglês “*Effector Triggered Immunity*”) que ativam de forma eficaz os mecanismos de defesa da planta (PRUITT et al., 2021).

A primeira linha de defesa das plantas (PTI) é caracterizada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) via receptores de reconhecimento de patógenos (*Pattern Recognition Receptor* - PRRs) na célula (ABBAS et al., 2018; BOUTROT & ZIPFEL 2020). Apesar da eficiência do PTI, ao longo da evolução, os patógenos passaram a impedir a imunidade das plantas por mutação ou exclusão de padrões moleculares. Os patógenos também podem suprimir essa linha de defesa da planta transportando proteínas efetoras para o citoplasma do hospedeiro. Essas proteínas contribuem para a virulência do patógeno, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). No entanto, existe a segunda linha de defesa desenvolvida pelo hospedeiro (ETI), a qual as plantas são capazes de detectar esses efetores produzidos pelos patógenos

impedindo a infecção (MARTEL et al., 2021; SAUR et al., 2021). Esse processo de coevolução entre planta e patógeno foi definido como modelo “zigzag” proposto por JONES et al. (2006).

Na segunda linha de defesa, ocorre o reconhecimento de proteínas Avr do patógeno por meio de proteínas de resistência (R), receptores intracelulares com domínios LRR (*leucine-rich repeat*) e NBS (*nucleotide-binding site*). NBS-LRR possuem capacidade de reconhecimento de efetores diretamente por meio da associação física, denominado de modelo ligante receptor, ou indiretamente, através de uma proteína acessória, considerada alvo do efector no hospedeiro. O reconhecimento de forma indireta entre as proteínas codificadas pelo gene R e Avr é denominado “hipótese/modelo guarda” (DALIO et al., 2021). O reconhecimento dos efetores do patógeno ativam as vias de sinalização celular provocando apoptose no sitio da infecção e, conseqüentemente, o colapso do tecido e a inibição do patógeno. Essa apoptose é conhecida como reação de hipersensibilidade (HR – do inglês “*Hypersensitive Response*”) (DALIO et al., 2021).

De acordo com Muthamilarasan & Prasad (2013), tanto o PTI, quanto o ETI promovem eventos importantes como a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs – do inglês “*Mitogen-Activated Protein Kinases*”) e também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês “*Reactive Oxygen Species*”). Os dois tipos de linhas de defesa inata podem ativar as mesmas respostas, contudo, a ETI é mais específica (TAO et al., 2003).

Os estudos relacionados a interação dos genes das plantas e dos patógenos que resultam em resistência da planta ou virulência e agressividade do fungo, levam a exploração da complexidade da coevolução patógeno-hospedeiro e da defesa da planta. O entendimento e identificação de genes envolvidos na interação *Coffea- H. vastatrix* são limitados, sendo que, esses conhecimentos podem auxiliar no desenvolvimento de cultivares com resistência durável. Além disso, esses estudos podem colaborar para a obtenção de marcadores moleculares funcionais ligados a resistência do café, com intuito de selecionar genótipos resistentes via seleção assistida em programas de melhoramento genético.

3.7. Análogos de genes a resistência -RGAs

As plantas desenvolveram mecanismos eficazes para reconhecer e responder às infecções causadas pelos patógenos. Dentre eles estão os genes PRRs e R responsáveis pela sinalização intracelular ativando a defesa da planta, chamados análogos de genes a resistência (*Resistance Gene Analog -RGAs*) (SEKHWAL et al., 2015; SILVA & MICHELI, 2020). Os

RGAs podem ser definidos como potenciais genes R e PRR que contêm domínios e motivos conservados que desempenham papéis específicos no patógeno, como exemplo, no reconhecimento de efetores de patógenos que são secretados na célula, possibilitando que as plantas desencadeiem a resposta ETI (SEKHWAL et al., 2015).

Atualmente não existe uma definição precisa sobre a classificação dos PRRs e genes R. De acordo com Silva & Micheli (2020), essas classes são subdivididas em: classe I: NL com a presença de proteínas com domínios NBS e LRR na região N terminal; Classe II são as TNL com proteínas com domínio TIR (Toll/interleucina-1) na região N-terminal seguido pelos domínios NBS e LRR; Classe III classificada como a CNL apresentando um domínio enrolado CC (*Coiled Coil*) no lugar do domínio TIR um sitio de ligação de nucleotídeo e uma repetição rica em leucina (CC- NB-LRR); Classe IV são as RLK contendo proteínas com um domínio quinase citoplasmático (serina-treonina quinase STK ou domínio quinase K) e uma repetição rica em leucina (LRR); As STK estão envolvidas em uma ampla gama de processos visando a resistência a doenças, realizam a interação com outras proteínas (AFZAL et al., 2007); Classe V, as RLP semelhantes a classe dos RLK, contudo com ausência do domínio quinase (GABRIËLS et al., 2007; JUNGEUN et al., 2012).

No banco de dados do genoma de resistência de plantas (PRGdb; <http://prgdb.org>), a classificação dos genes R são demonstradas em cinco classes: CNL (CC-NB-LRR), TNL (LRR-NB-TIR), RLP (SerThr- LRR), RLK (KIN-LRR) e a classe ‘outros’ abrangendo os outros genes descritos como de resistência por meio de distintos mecanismos moleculares, por exemplo: MLO e Asc-1 (SANSEVERINO et al., 2009; SANSEVERIANO et al., 2012). Adiante, outras categorias foram implementadas, como aquelas com a presença de genes com domínios: MLO (*Mildew resistance Locus*- Locus de resistência ao mofo) em *Arabidopsis thaliana* é ancorado à membrana por 7 hélices transmembranares de modo que o terminal N é localizado extracelularmente e o terminal C intracelularmente (PIFFANELLI et al., 1999; SANSEVERIANO et al., 2012); O GNK2 é extraído da proteína antifúngica Ginkobilobin2-1 (MIYAKAWA et al., 2009; SANSEVERIANO et al., 2012) e o RPW8 em *A. thaliana* representa resistência ao pó do mofo (RPW8- *resistance to powdery mildew8*) (XIAO et al., 2001; SANSEVERIANO et al., 2012).

A fim de prever novas proteínas R, Silva & Micheli (2020) utilizaram as combinações de quinase TIR, K, NBS, LRR e outros domínios, sendo encontrados padrões atípicos, acarretando a uma nova classificação com a presença de treze classes definidas como: CN, CNL, MLO-like, N, NL, RLK, RLK-GNK2, RLP, RPW8-NL, T, TNL, Outros e uma classe

desconhecida. Um fator limitante na classificação e identificação dessas proteínas ocorre devido ao seu baixo nível de conservação (JUNGEU et al., 2012; SANSEVERIANO et al., 2012).

Duas dessas classes (TNL e CNL) são consideradas de maior relevância na interação com as proteínas efetoras de patógenos e Reações de Hipersensibilidade (HR), sendo fatores de importância significativa de resistência efetiva a doenças em plantas (GURURANI et al. 2012; WANG et al., 2020).

Muitos *RGAs* são encontrados no genoma de plantas conferindo resistência às plantas (HAGHDOUST et al., 2021). No entanto, no cafeeiro, ainda há poucos relatos sobre a identificação de *RGAs*. Um *RGA* pertencente a classe CNL (CC-NBS-LRR), foi previamente identificado por Alvarenga et al. (2011) conferindo resistência a *H. vastatrix* e Barka et al. (2020) confirmou a expressão desse *RGA* na interação *Coffea-H. vastatrix* e também a presença de sequências conservadas com genes R do cafeeiro chamados de S_H. Almeida et al. (2021) realizando sequenciamento, triagem e qPCR, identificaram dois *RGAs* pertencentes a classe RLK (HdT_LRR_RLK1 e HdT_LRR_RLK2) contendo o motivo da quinase semelhante à repetição LRR-RLK, apresentando pico de expressão 24 horas após a inoculação nas interações compatíveis e incompatíveis entre o *C. arabica-H. vastatrix* e também apresenta sequência conservada com gene S_H.

A identificação e classificação das classes em que os genes pertencem e seus respectivos domínios se tornou possível, devido ao avanço em análise de dados por meio de técnicas de bioinformática, bem como, a genômica e a transcriptômica.

3.8. Ômicas e os estudos de genes de resistência

O sequenciamento do genoma de diversas plantas acelera e permite a identificação de genes responsáveis por apresentar características agronômicas desejáveis, tornando possível a manipulação subsequente dos genes de interesse através das técnicas de genética molecular. Em plantas a genômica visa buscar no melhoramento, manipulações genéticas dirigidas, promovendo maior efetividade na obtenção de variedades bem sucedidas (TANAKA et al., 2020; GU et al., 2022).

Devido aos avanços nas tecnologias NGS (*Next Generation Sequencing*), os genomas de várias espécies de plantas foram sequenciados, bem como, foi possível concluir o primeiro genoma completo de *C. canephora* clone IF 200 (COFFEE GENOME HUB - <http://coffee->

[genome.org/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) (DENOEUDE et al., 2014). Alguns anos depois sequenciou-se o genoma de *C. arabica* var. Caturra (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); *C. arabica*, var. *Típica* (dados não publicados); *C. arabica*, var. *Bourbon* (WCR - <https://worldcoffeeresearch.org/>) e *Coffea eugenoides* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para o sequenciamento completo do genoma do fungo *H. vastatrix* raça XXXIII, utilizou-se duas plataformas de sequenciamento: Pacific Biosciences (PacBio RS II) e Illumina (HiSeq 2500) (PORTO, 2016).

Florez et al. (2017) realizaram a montagem do transcriptoma para a interação compatível (Caturra) e incompatível (HdT) com a raça XXXIII de *H. vastatrix*. O qual permitiu a mineração de genes expressos no patossistema *Coffea-H. vastatrix* durante a infecção. Com auxílio do transcriptoma recentemente foi sequenciado o genoma completo de 547 Mb da raça XXXIII de *H. vastatrix*, com 13.364 genes previstos que codificam 13.034 proteínas putativas (PORTO et al., 2019).

Os estudos com genoma e genética funcional de plantas e interações com patógenos aumentaram consideravelmente a compreensão acerca das bases moleculares associadas com o processo de infecção e defesa das plantas. Essas tecnologias têm fornecido oportunidade de selecionar novos alvos a serem incorporados nas novas cultivares com o objetivo de obter resistência duradoura e de amplo espectro.

3.9. Bioinformática aplicada para estudos de genes de resistência

O primeiro emprego do termo Bioinformática foi descrito por Paulien Hogeweg & Ben Hesper em 1978 como “o estudo dos processos informáticos em sistemas”. Posteriormente, muitos conceitos novos foram emergindo, como a biologia computacional, biocomputação, entre outros (HOGEWEG, 2011).

A bioinformática aplica os princípios da ciência de dados e tecnologias para dados complexos de biociência (WANG et al., 2022). Com o avanço das plataformas de sequenciamento e geração de muitos dados, o setor da bioinformática se tornou uma ferramenta essencial para a realização de análises e interpretação de vários tipos de dados, incluindo sequências de nucleotídeos e proteínas domínios, estruturas de proteínas, organização do genoma, interação de proteínas, mecanismos de funções e identificação de genes (OLIVEIRA et al., 2022).

Nos programas de melhoramento de plantas, a busca por genes de resistência é constante, devido a alta variabilidade dos patógenos que infectam as cultivares comerciais

principalmente. O estudo do patossistema *Coffea-H. vastatrix* é de suma importância para a identificação dos genes de resistência presentes no cafeeiro. E uma das formas mais eficientes de se identificar potenciais *RGAs* envolvidos na interação é por meio de ferramentas de bioinformática.

Ao longo dos anos várias ferramentas de bioinformática ficaram disponíveis e com isso muitos genes PRRs e proteínas R foram descritos nas últimas décadas, no entanto, sem um padrão de classificação bem definido, devido ao baixo nível de conservação, o que dificulta a identificação e estudo das proteínas PRR e R (JUNGEUN et al. 2012; SILVA & MICHELI, 2020). Logo, com o intuito de auxiliar os pesquisadores na identificação de potenciais proteínas *RGAs*, bem como, para apoiar pesquisas e estudos sobre o sistema imunológico inato das plantas, Silva & Micheli (2020) desenvolveram uma ferramenta chamada de *RRGPredictor*. A partir desta ferramenta foram identificadas e classificadas novas proteínas PRRs e proteínas R em escala genômica, sem a necessidade da utilização de métodos baseados em homologia de sequência.

4. Metodologia

4.1. Identificação de *RGAs* no genoma de *Coffea arabica*

Nesse estudo, uma abordagem baseada em predição de domínios funcionais em proteínas codificadas pelos *RGAs* foi empregada. Para selecionar as prováveis proteínas de resistência, duas ferramentas foram aplicadas: *RRGPredictor* (SILVA & MICHELI, 2020) e o *DRAGO2* (Análise de Resistência a Doenças e Ortologia Genética) (OSUNA-CRUZ et al., 2018).

O *RRGPredictor* é uma ferramenta baseada na teoria dos conjuntos desenvolvida com a finalidade de identificar e classificar especificamente PRRs e proteínas R em uma escala genômica, independente do arranjo de domínios, conferindo maior plasticidade à análise (SILVA & MICHELI, 2020). Já o *DRAGO2* (Análise de Resistência a Doenças e Ortologia Genética) consiste em um *pipeline* para anotação de genes de resistência. Ele pode ser utilizado para a análise de milhares de sequências de uma só vez em qualquer proteoma ou transcriptoma (OSUNA-CRUZ et al., 2018).

Inicialmente foi realizada uma busca, no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), das sequências FASTA das proteínas anotadas no genoma de *C. arabica* ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid13443\[orgn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid13443[orgn])) (USA, 2020).

Posteriormente, essas sequências FASTA das proteínas da espécie foram submetidas ao InterProScan5 versão 5.23-62.0 (BLUM et al., 2021) usando os parâmetros padrões (JONES et al., 2014). Foi gerado um arquivo TSV (arquivo de domínios e classes) que foi analisado pelo *RRGpredictor*. Já para o *DRAGO2*, as sequências FASTA das proteínas foram diretamente analisadas. Ao final de ambas as ferramentas foi possível obter, identificar e classificar os diferentes grupos de *RGAs* (Figura 1).

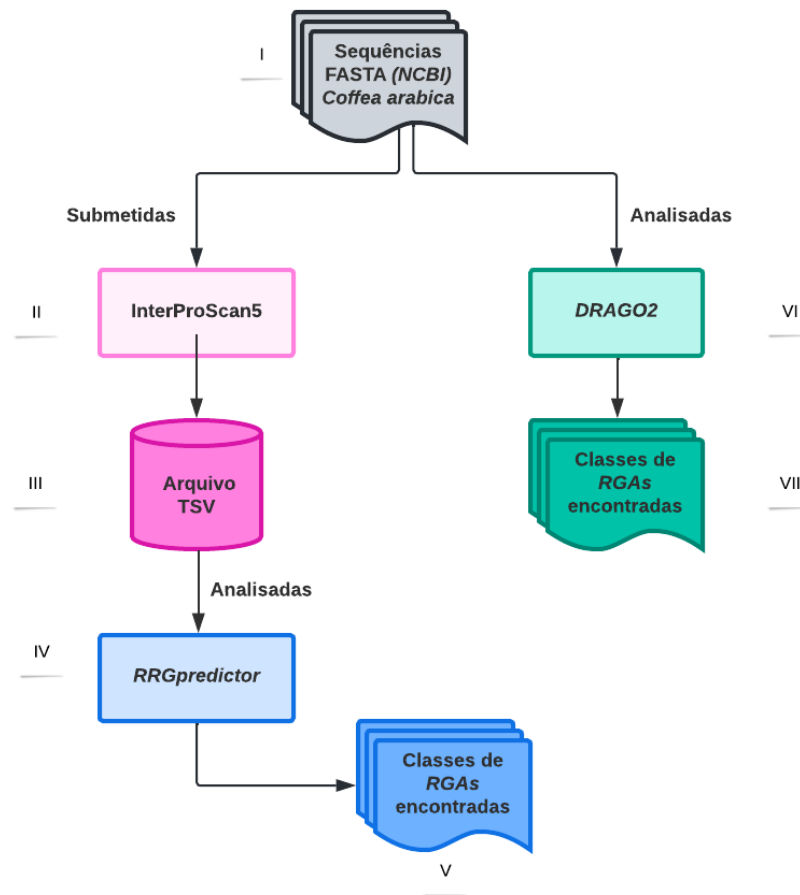


Figura 1: Identificação dos *RGAs* no genoma de *Coffea arabica*.

Legenda: (I) Sequências FASTA das proteínas anotadas no genoma de *Coffea arabica*; (II) InterProScan5 versão 5.23-62.0; (III) arquivo TSV (arquivo de domínios e classes); (IV) *RRGpredictor*. (V) Classes dos *RGAs* encontradas pela análise do *RRGpredictor*. (VI) *DRAGO2*; (VII) Classes dos *RGAs* encontradas pela análise do *DRAGO2*.

4.2. Seleção de *reads* de alta qualidade em transcriptoma da interação *Coffea-Hemileia vastatrix*

Os dados do transcriptoma gerados por Florez et al. (2017) foram utilizados como base para realizar a análise de expressão diferencial dos genes identificados no genoma de *C. arabica*. No transcriptoma foi analisado as interações compatíveis e incompatíveis. Os genótipos dos cafeeiros utilizados foram *C. arabica* cv. Caturra vermelho CIFC 19/1 (suscetível) e HdT CIFC 832/1 (resistente) inoculados com a raça XXXIII de *H. vastatrix*.

Tabela 1: Bibliotecas analisadas do transcriptoma da interação *Coffea-H. vastatrix*.

Código da biblioteca	Descrição das bibliotecas	Amostras
C12	Caturra 12 horas após inoculação	Amostra 01
C24	Caturra 24 horas após inoculação	Amostra 02
C96	Caturra 96 horas após inoculação	Amostra 03
H12	Híbrido de Timor 12 horas após inoculação	Amostra 04
H24	Híbrido de Timor 24 horas após inoculação	Amostra 05
H96	Híbrido de Timor 96 horas após inoculação	Amostra 06
CS	Caturra sem inoculação (zero horas)	Amostra 10
HS	Híbrido de Timor sem inoculação (zero horas)	Amostra 11

Fonte: Flores et al.,2017.

As *reads* presentes no transcriptoma da interação foram processados com base no software *Trimmomatic* (v. 0.36). A ferramenta *Trimmomatic* foi utilizada visando eliminar possíveis adaptadores e separar as *reads* não pareadas das pareadas. Para a limpeza das *reads*, utilizou-se os seguintes parâmetros: SLIDINGWINDOW 20 (executa uma abordagem de recorte de janela deslizante, elimina as *reads* que apresentaram qualidade média dentro da janela abaixo de um limite), CROP 35(corta *read* para um comprimento especificado, removendo as bases do final) , HEADCROP 30 (corta o número especificado de bases desde o início da leitura), LEADING 20 (elimina as bases do início de uma leitura, se estiver abaixo de um limite de qualidade), TRAILING 20 (corta as bases no final de uma leitura, se abaixo de um limite de qualidade) e MINLEN 70 (elimina a leitura se estiver abaixo de um comprimento especificado) (TRIMMOMATIC MANUAL, V0.32).

Também foi utilizado o *software* fastQC versão 0.11.5 (ANDREWS, 2010) para possibilitar a visualização da qualidade das bases das *reads*. Por meio do controle de qualidade dos produtos do sequenciamento, os erros de sequenciamento ou contaminação são evitados e não são transmitidos adiante nas análises, minimizando assim, a ocorrência dos falsos positivos (CONESA et al., 2016).

4.3. Quantificação da expressão gênica

As *reads* de alta qualidade do transcriptoma foram submetidas à ferramenta *Kallisto*, objetivando realizar o *pseudo-alinhamento* das *reads* nos transcritos identificados no genoma de *C. arabica*, possibilitando quantificá-las (CONESA et al., 2016). Essa ferramenta gera como saída um arquivo de abundância, disponibilizando: contagem bruta, o tamanho do gene e o valor de expressão normalizada pelo método de transcrição por milhão (TPM) que é considerada uma etapa essencial para a comparação de várias amostras de distintos experimentos (PACHTER et al., 2016; BRAY et al., 2016).

As *reads* foram analisadas em duas etapas no *Kallisto*. Na primeira etapa ocorre a indexação, onde as sequências FASTAS são usadas para construir uma matriz facilitando e otimizando as buscas realizadas no computador. Foi indexado o arquivo de transcrito de café arábica do NCBI (GCF_003713225.1). A quantificação da expressão gênica foi realizada observando os transcritos de café (*target id*), o comprimento do gene (*length*) e o valor da expressão gênica (*est counts*) (BRAY et al., 2016).

4.4. Análise da expressão diferencial

Após a etapa de indexação e quantificação da abundância dos transcritos, os dados gerados pela ferramenta *kallisto* foram submetidos a *pipeline* do *DESeq2* (LOVE et al., 2014).

No *DESeq2* todas as amostras do cafeeiro susceptível (C12: amostra 01, C24: amostra 02 e C96: amostra 03) foram comparadas com o controle (CS: amostra10) assim como todas as amostras do resistente (H12: amostra 04, H24: amostra 05 e H96: amostra 06) com o seu controle (HS: amostra 11) (Tabela 1). Os dados foram disponibilizados pelo laboratório de biotecnologia do cafeeiro- Biocafé (UFV) e também estão disponíveis no código do SRA: PRJNA353185: *Coffea arabica* cultivar: *caturre* (*coffe*) e PRJNA353233: *Coffea arabica* x *Coffea canephora* cultivar: HdT.

Dessa forma, foi obtida uma tabela com os resultados das análises da expressão, identificando os genes diferencialmente expresso e a média *Foldchange* (avaliação do nível de expressão entre o tratamento e o controle) (LOVE et al., 2014). A partir dessa tabela disponibilizada pelo *DESeq2*, foi utilizado alguns pacotes via BiocManager (*Tximport*, *tximportData*, *ComplexHeatmap*, *ggplot2* e *calibrate* (utilizando a função "textx")) dentro da linguagem de programação estatística R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009). Por conseguinte, para identificar o volume dos genes de resistência, foi desenvolvido o gráfico *volcano plot*, por meio da integração das informações geradas pelo *RRGPredictor* e *DRAGO2*.

Por meio da integração das informações entre as saídas das duas ferramentas utilizando linhas de comando Linux, foi gerado dois *Heatmaps*, o primeiro demonstrou de forma conjunta os genes *up regulados* e os *down regulados*. No segundo *Heatmap*, realizou-se a separação dos genes de resistência que são *up regulados* exclusivamente no HdT (interação incompatível). Após essa separação, a identificação dos genes diferencialmente expressos foi realizada.

4.5. Localização dos RGAs a partir dos genes diferencialmente expressos do Híbrido de Timor nos sub genomas de *C. arabica*

O genoma de *C. arabica* possui uma porção de *C. canephora* (C^C) que provavelmente está associada com a resistência. Sendo assim, por meio dos dados de expressão observados na filtragem dos *up regulados* exclusivamente no HdT, se fez necessário a utilização do NCBI para localizar os códigos dos genes (RGAs) do HdT e distinguir se esses sub genomas se encontram na porção de C^C ou na porção de *C. eugeniodes* (C^E), bem como, a descrição, identificação das proteínas e a coordenada do gene.

5. Resultado e discussão

5.1. Predição dos genes presentes no genoma de *Coffea arabica*

Foram encontradas 19 classes gênicas no genoma de *C. arabica* utilizando as ferramentas *RRGPredictor* e *DRAGO2*. Foi possível verificar as classes presentes no genoma de *C. arabica*, bem como, contabilizar a distribuição dessas classes no genoma (Figura 2).

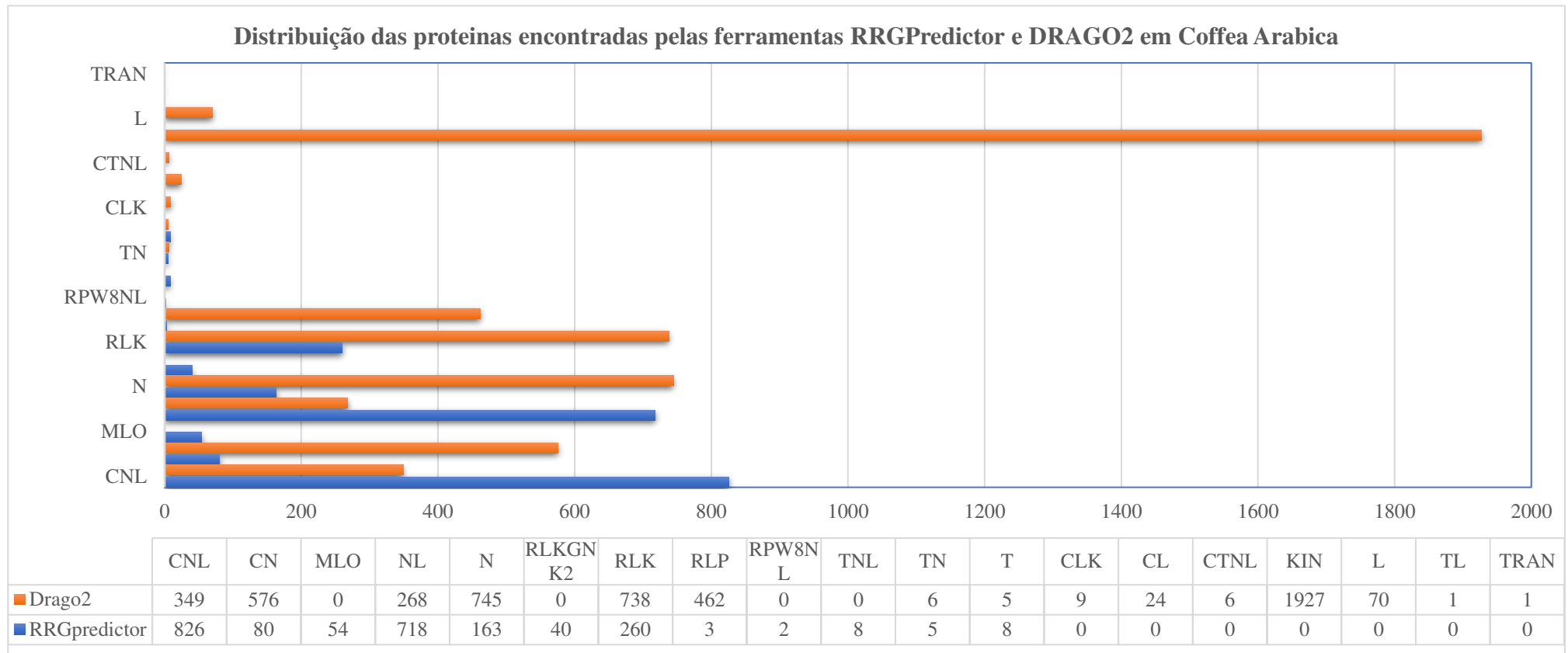


Figura 2: Comparação das classes disponibilizadas pelo RRGPredictor e DRAGO2: CNL (CC-NBS-LRR), CN (CC-NBS), MLO (*Mildew resistance Locus*), NL (NBS-LRR), N (NBS), RLK (*Receptor-Like Kinase*), RLK com um domínio GNK2 (RLKGNK2), RLK um domínio quinase (KIN), RLP (*Receptor-Like Proteins*), RPW8NL, TNL (TIR-NB-LRR), TN (TIR-NBS), T(TIR), CLK, CL, CTNL, L, TL e TRAN do genoma de *C. arabica* por representação numérica demonstrando a quantidade de proteínas presentes em cada classe.

Pode-se observar que as classes mais encontradas no genoma de *C. arabica* foi a KIN, representado 26,20%, seguida da classe CNL, representando 15,97%. A KIN foi identificada somente pelo *software DRAGO2* e CNL por ambas as ferramentas.

Realizando uma comparação entre as ferramentas *RRGPredictor* e *DRAGO2*, as classes que apresentaram maiores ocorrência no *RRGPredictor* foram: CNL, NL e T, representando valores de superioridade em 2,36; 2,67 e 1,6 vezes maior, respectivamente. Para o *DRAGO2*, foram cinco classes: RLP, CN, N, RLK e TN, representando ocorrência superior em 154,0; 7,20; 4,57; 2,83 e 1,20, respectivamente.

As proteínas que possuem N ou NL apresentam elevado índice de origem advindas de uma perda de domínio, levando, na maioria das vezes, à criação de pseudogenes (LOZANO et al., 2015). Os pseudogenes podem ocorrer devido a rápida evolução desta família de genes, sendo observada essa premissa por exemplo em distintas cultivares da mesma espécie em ambientes com variações de estresse biótico (LOZANO et al., 2015).

Dentre todas as classes, algumas apareceram exclusivamente em uma das ferramentas, dentre elas, se destacam no *RRGPredictor*: MLO, RLKGNK2, RPW8NL, TNL. No *DRAGO2* foram sete classes exclusivas: CNK, CL, CTNL, KIN, L, TL e TRAN.

De acordo com os códigos dos transcritos (mRNAs) disponibilizados pelas ferramentas, foi possível classificar algumas sequências por meio do NCBI. A classe CTNL é caracterizada como “proteína putativa de resistência a doenças *RGA3*”, a classe TL são as “proteínas semelhantes à resistência a doenças *DSC1*”, a classe TRAN são as “Proteína 1-B-like contendo domínio AAA da família ATPase” e a classe T são “proteína contendo domínio TIR e proteína de resistência a TMV tipo N”.

A classe TNL que foi representada apenas pela ferramenta *RRGPredictor* é relacionada com a interação de proteínas efetoras de patógenos e Reações de Hipersensibilidade, sendo considerados importantes fatores de efetiva resistência a doenças em plantas (GURURANI et al., 2012).

Em relação as classes CNL e TNL, de acordo com Meyers et al. (2003) em *Arabidopsis sp.*, foi relatada uma maior quantidade de sequências relacionadas com TNL do que CNL. No entanto, no presente trabalho a classe CNL foi mais prevalente que a TNL, apresentando 15,97% e 0,108%, respectivamente, em *C. arabica*. Ortriz (2019) também relatou maior proporção de sequências relacionadas ao CNL, podendo assim, indicar a possibilidade dos genes de resistência em *Coffea* do tipo TNL serem desenvolvidos mais recentemente que o tipo

CNL de acordo com o processo de especiação, como apontado em outras famílias de plantas (SEO et al., 2016; ORTIZ 2019).

No presente trabalho, das dezenove classes encontradas, cinco delas, no trabalho de Silva & Micheli (2020) foram eliminadas no processo de validação, para avaliar a quantidade das sequências não relacionadas como PRR e R, sendo elas: KIN, TRAN, CLK, CTNL, CL. A classe L foi encontrada por Silva & Micheli (2020) apenas pela ferramenta *DRAGO2*, bem como, pode-se observar na Figura 2, que essa mesma classe foi abrangida apenas por *DRAGO2*. Já a classe TL, encontrada nesse presente trabalho, não foi relatada por Silva & Micheli (2020).

Oito classes/domínios de proteínas apareceram em ambas as ferramentas: CNL, CN, NL, N, RLK, RLP, TN e T (Figura 3).

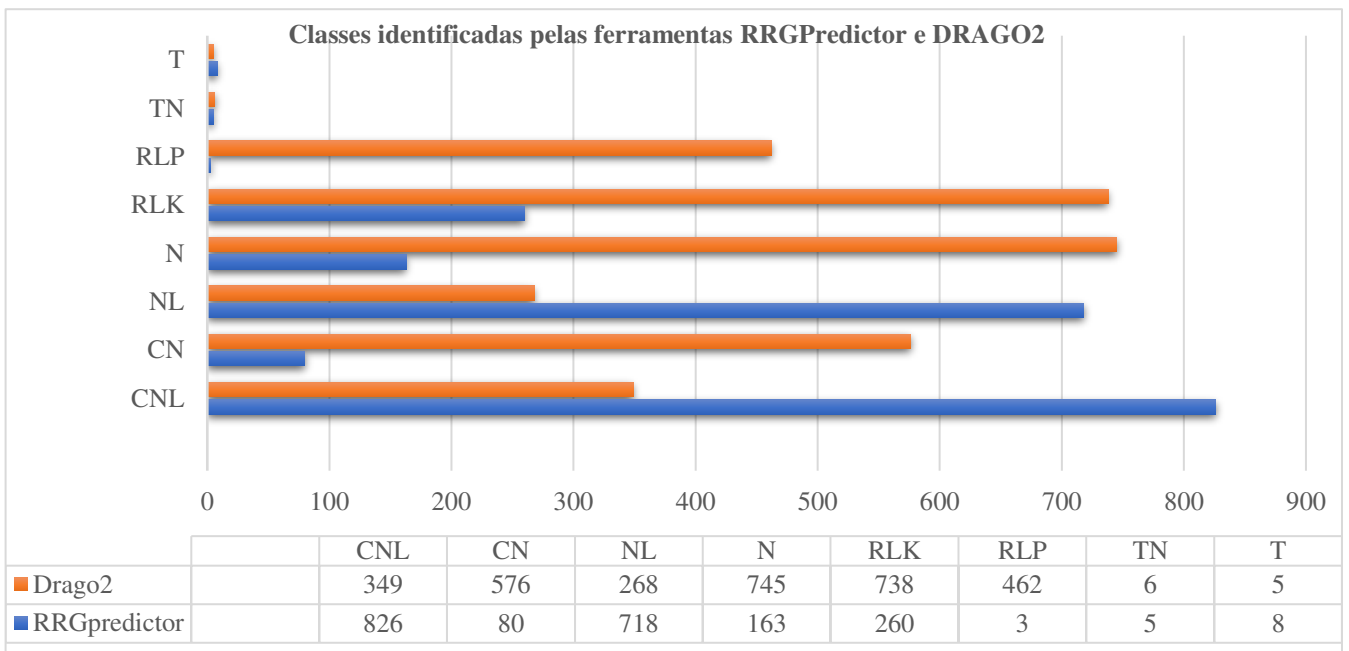


Figura 3: Classes disponibilizadas nas ferramentas *RRGPredictor* e *DRAGO2*.

A presença da classe CNL é considerada altamente relevante na resistência efetiva a doenças, ela está envolvida na interação com as proteínas efetoras de patógenos e Reações de Hipersensibilidade (HR), sendo assim, quando o seu aparecimento em *C. arabica* é menos incidente, o processo se torna mais limitante, podendo interferir no desenvolvimento de novos fatores de resistência na planta (JOSHI & NAYAK, 2013). No entanto, com base no resultado da amostragem total contabilizado pelas duas ferramentas, pode-se observar que a classe CNL apresentou a maior incidência (22,54%), seguindo as classes RLK (19,14%) e NL (18,91%).

5.2. Avaliação dos níveis de expressão dos *RGAs* no transcriptoma de interação *Coffea-H.vastatrix*

5.2.1. Genes *RGAs* *down* regulados e *up* regulados na interação *Coffea-H. vastatrix*

A quantificação da expressão gênica em larga escala dos *RGAs* utilizando como referência o genoma de *C. arabica* foi testado, considerando a planta resistente e a susceptível, HdT e Caturra, respectivamente. Por meio das *reads* do transcriptoma, realizou-se o *pseudo-alinhamento* contra o genoma de *C. arabica* usando as bibliotecas C12 e C24, C96 e H12, H24 e H96 (Figura 4 e Figura 5), permitindo observar o volume total e as considerações anotadas apenas pelos *RGAs*.

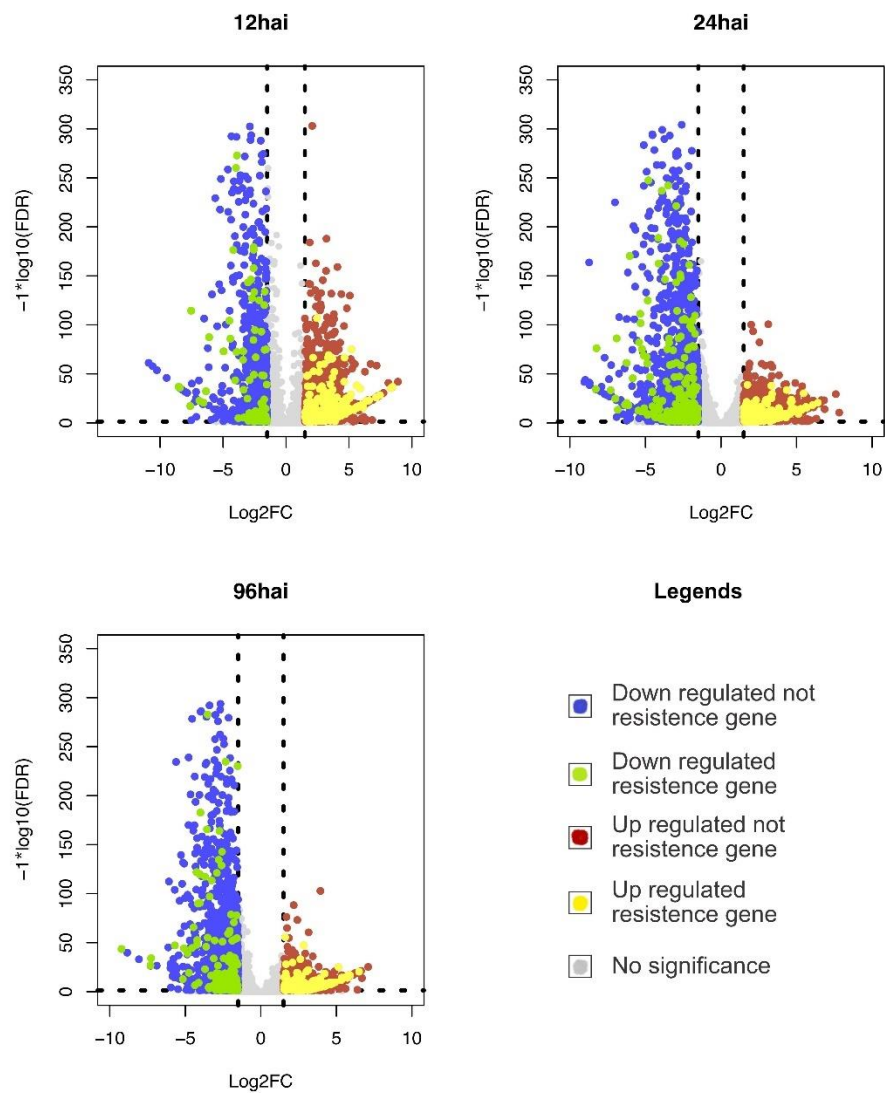


Figura 4: *Volcano plot* para Caturra.

Legenda: Na esquerda está representado os genes gerais *down regulados*. Genes que codificam proteínas não categorizados pelo *RRGPredictor* ou *DRAGO2* como proteína de resistência estão representados em azul e os que codificam proteínas classificadas pelo *DRAGO2* e *RRGPredictor* como proteína de resistência em verde. Os pontos da direita (em tons de vermelho e amarelo) em cada um dos *volcanos plots*, são os *up regulados*, os tons em vermelho representam genes de resistência e em amarelo não foram caracterizados como genes de resistência.

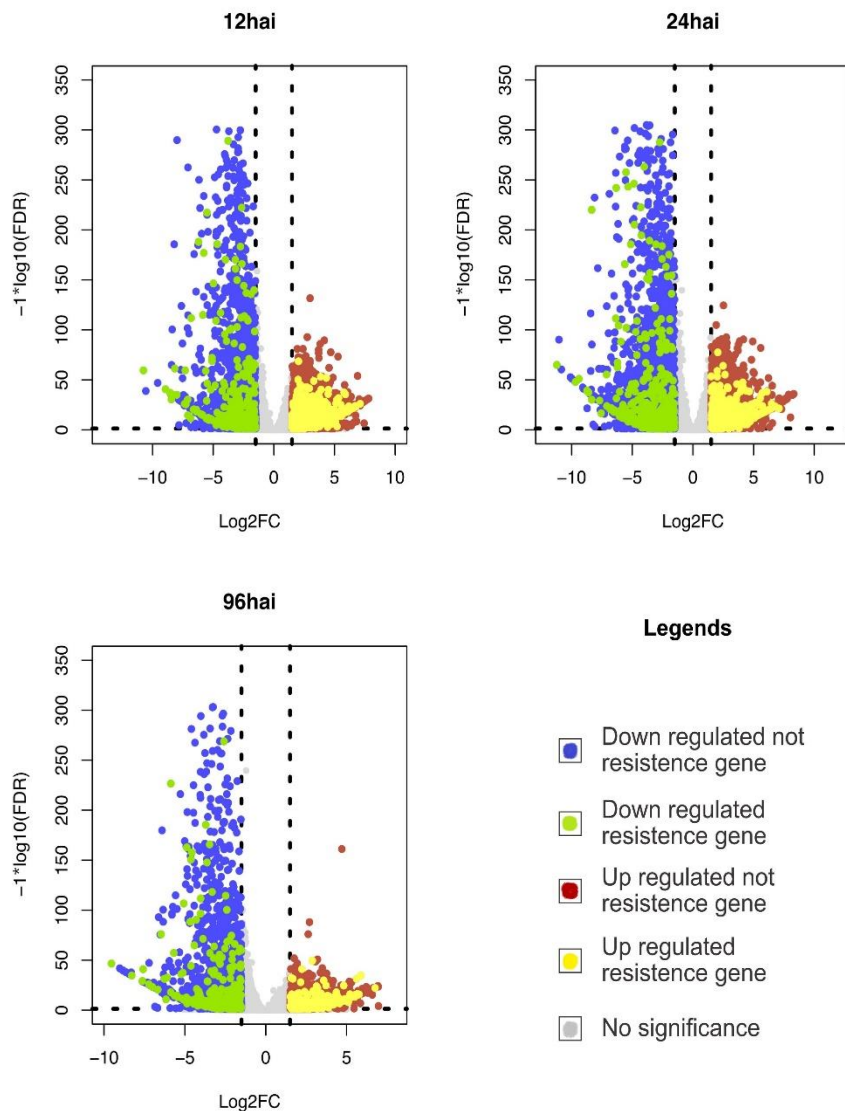


Figura 5: *Volcano plot* para o Híbrido de Timor.

Legenda: Na esquerda está representado os genes gerais *down regulados*. Genes que codificam proteínas não categorizados pelo *RRGPredictor* ou *DRAGO2* como proteína de resistência estão representados em azul e os que codificam proteínas classificadas pelo *DRAGO2* e *RRGPredictor* como proteína de resistência em verde. Os pontos da direita (em tons de vermelho e amarelo) em cada um dos *volcanos plots*, são os *up regulados*, os tons em vermelho representam genes de resistência e em amarelo não foram caracterizados como genes de resistência.

A partir desses *volcanos plots*, observou-se 2.444 genes de resistência *up regulados* e 1.635 genes *down regulados* em ambos os genótipos. Realizando uma comparação entre os genótipos, nos genes de resistência *up regulados*, observa-se que o HdT apresentou mais genes resistentes: H12: 23,93%; H24: 21,52%, H96: 13,74%, já em Caturra essa frequência representou: C12: 18,24%; C24: 12,92%; C96: 9,61%. Além do mais, nos genes de resistência *down regulados* o HdT também obteve uma frequência superior a Caturra, representando H12: 22,32%; H24: 26,85%, H96: 17,92% e C12: 4,95%; C24:17,61%; C96:10,33%. A diferença mais significativa observada nos genes de resistência *up regulados* ocorreu nos tempos de H24 e C24, e nos genes *down regulados* foi nos tempos H12 e C12.

Esse resultado é também encontrado em outros trabalhos relacionados ao patossistema *Coffea-H. vastatrix*. Freitas et al. (2014) utilizaram o mesmo patossistema, Híbrido de Timor CIFIC 832/1 (resistente) e Caturra CIFIC 19/1 (suscetível), e verificaram que às 24 h.a.i, tanto nas folhas suscetíveis quanto nas resistentes, os urediniósporos apresentaram alta germinação (75%), diferenciação dos apressórios nos estômatos (50%) e hifas na fase de penetração (70%). Com base em observações citológicas concluíram que a resistência de HdT 832/1 à raça XXXIII de *H. vastatrix* é pré-haustorial. Diniz et al. (2012) relataram que a rápida resposta de resistência impedindo a formação de haustórios pode ser a base para a durabilidade estendida da resistência de HdT CIFIC 832 às raças de *H. vastatrix*. Ramiro et al. (2009) descreveram que o haustório representa um importante papel na infecção, ocasionando a absorção de nutrientes a partir do hospedeiro, bem como, induz mudanças estruturais na célula hospedeira.

Florez et al. (2017) confirmaram que a rápida expressão dos genes *up-regulados* em HdT estão diretamente relacionados a resistência pré-haustorial. Almeida et al. (2021) evidenciaram que um gene LRR-RLK chamado de *HdT_LRR_RLK2* atingiu o pico de expressão nos genótipos de café resistentes em 24 horas após inoculação, sugerindo que pode ser um gene candidato de resistência capaz de induzir sinalização imune e defesa do cafeeiro a *H. vastatrix*.

5.3. Perfil de agrupamento dos genes expressos exclusivos no Híbrido de Timor

Por meio do *Heatmap* pode-se observar o perfil do agrupamento de genes diferencialmente expressos exclusivamente no HdT associados às classes (Figura 6). Todos os *up regulados* e os *down regulados* estão predispostos de forma conjunta, bem como, os tempos comparados.

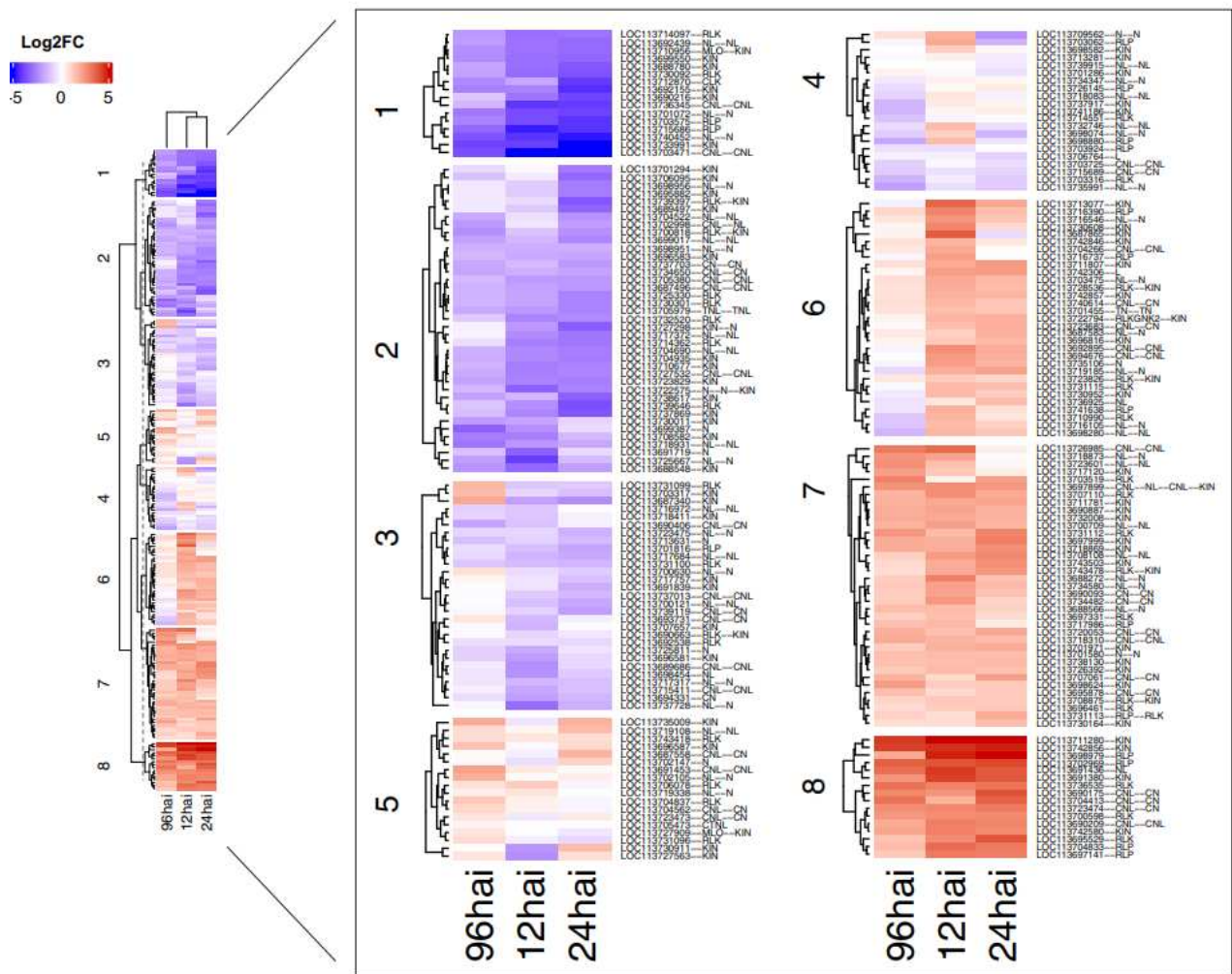


Figura 6: Heatmap- Genes diferencialmente expressos exclusivamente no Híbrido de Timor (*up regulados* e *down regulados*).

Legenda: 12 hai- doze horas; 24 hai- vinte e quatro horas; 96 hai- noventa e seis horas; A contabilidade de 1 a 8 representa os clusters com a presença das classes com suas respectivas colorações, vermelho: *genes up regulados* e azul: *genes down regulados*.

Quanto maior a incidência da coloração vermelha, maior a presença dos *genes up regulados*. Sendo assim, os *clusters* 5, 6, 7 e 8 são predominantemente *up regulados* apresentando maior incidência das classes KIN, CNL e NL, enquanto, os *clusters* 1, 2 e 3 são majoritariamente reprimidos no HdT (*down regulados*) com maior presença das classes CNL, KIN e RLK.

5.4. Nível de expressão gênica de resistência dos prováveis *RGAs* no Híbrido de Timor

Foi utilizada uma rotina em ambiente *best* no *linux* para selecionar os genes *up regulados* exclusivos do HdT em todos os tempos após inoculação (Figura 7).

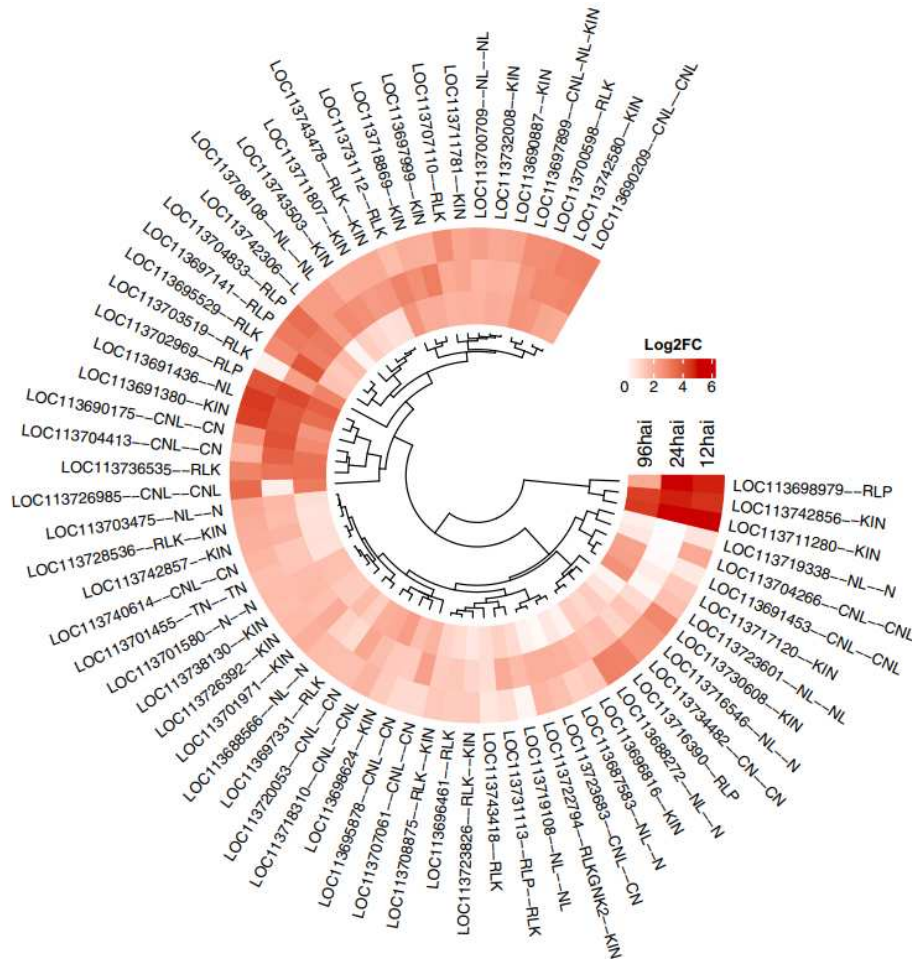


Figura 7: *Heatmap* representando o nível de expressão gênica de resistência dos prováveis *RGAs* que são *up regulados* exclusivamente no Híbrido de Timor.

Legenda: Quando maior a incidência da coloração vermelha, maior o nível de expressão.

O *Heatmap 7* foi desenvolvido com os dados identificado apenas para o HdT (resistente), sendo Caturra (susceptível) desconsiderado, sendo assim, pode-se observar que todos esses genes não aumentaram o nível de expressão e nem possuem diferença significativa em nenhum dos tempos na variedade Caturra.

Essa análise de expressão foi realizada considerando a expressão gênica dos dados do transcriptoma da interação entre *Coffea-H.vastatrix*, sendo os genótipos de suscetibilidade (Caturra) e de resistência (HdT). O genoma de *C. arabica* foi utilizado como referência para o

HdT porque esse Híbrido é uma mistura natural entre *C. arabica* e *C. canephora*. Ademais, não existe ainda em literatura a disponibilidade do genoma do HdT, sendo assim, futuros trabalhos precisam ser realizados para gerar esse genoma, e a partir desse, esses dados disponibilizados podem ser re-analizados.

5.5. Genes up regulados exclusivamente no Híbrido de Timor encontrados na sub genoma de *C. canephora* e *C. eugenioides*

O genoma utilizado como referência para a análise de expressão gênica foi o genoma de *C. arabica*. Esse genoma é subdividido em duas porções, *C. eugenioides* e *C. canephora* (LASHERMES et al., 1999; SETOTAW et al., 2013; YUYAMA et al., 2016), por ser um alotetraploide originário dessas duas espécies.

Sendo assim, na porção de C^C, se espera que sejam encontrados genes que geralmente estão associados com a resistência, por isso, é relevante olhar os genes que estão especificamente nessa porção (CHARRIER & MICHEL, 1998; CARVALHO et al., 2010). A tabela 2 indica a localização cromossômica no genoma de *C. arabica* dos sub genomas de C^C e C^E, a partir da localização (LOC) disponibilizados a partir da Figura 7.

Tabela 2: Localização dos genes de resistência *up regulados* no Híbrido de Timor no genoma de *C. arabica*.

Gene identificado	Chr	mRNAID--> Protein ID	RRGpredictor	Drago2
LOC113700598	1e	XM_027221068.1 → XP_027076869.1		RLK
		XM_027217535.1 → XP_027073336.1	NL	NL
		XM_027217526.1 → XP_027073327.1	CNL	CNL
LOC113697899	1e	XM_027217512.1 → XP_027073313.1	CNL	CNL
		XM_027217516.1 → XP_027073317.1	CNL	CNL
		XM_027217506.1 → XP_027073307.1		CNL
		XM_027217556.1 → XP_027073357.1		CNL
		XM_027217541.1 → XP_027073342.1	CNL	CNL
LOC113690209	5c	XM_027208035.1 → XP_027063836.1	CNL	CNL
LOC113742580	4e	XM_027270445.1 → XP_027126246.1		KIN
		XM_027270446.1 → XP_027126247.1		KIN
LOC113707110	8c	XM_027229270.1 → XP_027085071.1		RLK
LOC113697999	7c	XM_027217656.1 → XP_027073457.1		KIN
LOC113718869	11e	XM_027243794.1 → XP_027099595.1		KIN
LOC113704833	8e	XM_027226706.1 → XP_027082507.1		RLP
LOC113697141	1e	XM_027216620.1 → XP_027072421.1		RLP
		XM_027214655.1 → XP_027070456.1		RLK
LOC113695529	6e	XM_027214656.1 → XP_027070457.1		RLK
		XM_027209497.1 → XP_027065298.1		KIN
LOC113736535	3e	XM_027263560.1 → XP_027119361.1	CNL	
		XM_027263559.1 → XP_027119360.1	CNL	
LOC113726985	2c	XM_027250916.1 → XP_027106717.1	CNL	CNL
		XM_027250914.1 → XP_027106715.1	CNL	CNL

		XM_027250917.1 → XP_027106718.1	CNL	CNL
		XM_027250915.1 → XP_027106716.1	CNL	CNL
		XM_027250918.1 → XP_027106719.1	CNL	CNL
LOC113720053	<i>Unplaced Scaffold</i>	XM_027245088.1 → XP_027100889.1	CNL	CN
		XM_027245087.1 → XP_027100888.1	CNL	CN
LOC113701580	7e	XM_027222307.1 → XP_027078108.1	N	N
		XM_027222308.1 → XP_027078109.1	N	N
LOC113718310	11e	XM_027243224.1 → XP_027099025.1	CNL	CNL
LOC113707061	8c	XM_027229216.1 → XP_027085017.1	CNL	CN
		XM_027256192.1 → XP_027111993.1		RLK
LOC113731113	2e	XM_027256191.1 → XP_027111992.1		RLK
		XM_027256193.1 → XP_027111994.1		
		XM_027256194.1 → XP_027111995.1		RLP
LOC113711807	10e	XM_027235016.1 → XP_027090817.1		KIN
		XM_027241782.1 → XP_027097583.1		KIN
LOC113717120	11c	XM_027241780.1 → XP_027097581.1		KIN
		XM_027241781.1 → XP_027097582.1		
		XM_027241779.1 → XP_027097580.1		KIN
LOC113723601	<i>Unplaced Scaffold</i>	XM_027246617.1 → XP_027102418.1	NL	NL
LOC113703519	8e	XM_027224916.1 → XP_027080717.1		RLK
		XM_027208004.1 → XP_027063805.1	CNL	CN
LOC113690175	5c	XM_027208005.1 → XP_027063806.1	CNL	CN
		XM_027208003.1 → XP_027063804.1	CNL	CN
LOC113704413	8e	XM_027226319.1 → XP_027082120.1	CNL	CN
LOC113731112	2e	XM_027256189.1 → XP_027111990.1		RLK
LOC113688272	5e	XM_027206050.1 → XP_027061851.1	NL	N
LOC113716390	11c	XM_027240698.1 → XP_027096499.1		RLP
		XM_027240697.1 → XP_027096498.1		RLP
LOC113734482	3c	XM_027261054.1 → XP_027116855.1	CN	CN
		XM_027261055.1 → XP_027116856.1	CN	CN
LOC113730608	2e	XM_027255409.1 → XP_027111210.1		KIN
LOC113690093	5c	XM_027207910.1 → XP_027063711.1	CN	CN
LOC113703475	8c	XM_027224854.1 → XP_027080655.1	CN	N
		XM_027224855.1 → XP_027080656.1	CN	N
LOC113708875	9c	XM_027231552.1 → XP_027087353.1	RLK	KIN
LOC113723826	2c	XM_027246794.1 → XP_027102595.1	RLK	KIN
LOC113740614	4e	XM_027268162.1 → XP_027123963.1	CNL	CN
LOC113688566	5e	XM_027206425.1 → XP_027062226.1		
		XM_027206426.1 → XP_027062227.1	NL	N
LOC113697331	6e	XM_027216910.1 → XP_027072711.1		RLK
LOC113716546	11c	XM_027240932.1 → XP_027096733.1	NL	N
LOC113704266	8e	XM_027226058.1 → XP_027081859.1	CNL	CNL
LOC113711781	10e	XM_027234980.1 → XP_027090781.1		KIN
		XM_027208996.1 → XP_027064797.1		KIN
LOC113690887	5c	XM_027208997.1 → XP_027064798.1		KIN
		XM_027208998.1 → XP_027064799.1		KIN
		XM_027257585.1 → XP_027113386.1		KIN
LOC113732008	2e	XM_027257588.1 → XP_027113389.1		KIN
		XM_027257586.1 → XP_027113387.1		KIN
LOC113700709	7e	XM_027221167.1 → XP_027076968.1	NL	NL
LOC113701971	7e	XM_027222896.1 → XP_027078697.1		KIN
LOC113726392	2c	XM_027250086.1 → XP_027105887.1		KIN
LOC113738130	3e	XM_027265319.1 → XP_027121120.1		KIN
LOC113743478	5e	XM_027271497.1 → XP_027127298.1	RLK	KIN
		XM_027271496.1 → XP_027127297.1	RLK	KIN
LOC113743503	5e	XM_027271548.1 → XP_027127349.1		KIN

		XM_027271549.1 → XP_027127350.1		KIN
		XM_027271547.1 → XP_027127348.1		KIN
LOC113742306	1c	XM_027270124.1 → XP_027125925.1		L
LOC113708108	9c	XM_027230580.1 → XP_027086381.1	NL	NL
LOC113742857	9c	XM_027230580.1 → XP_027086381.1	NL	NL
LOC113701455	7c	XM_027222118.1 → XP_027077919.1		
LOC113728536	2e	XM_027252934.1 → XP_027108735.1	RLK	KIN
LOC113696816	6e	XM_027216197.1 → XP_027071998.1		KIN
LOC113722794	<i>Unplaced Scaffold</i>	XM_027246017.1 → XP_027101818.1	RLKGNK2	KIN
LOC113723683	<i>Unplaced Scaffold</i>	XM_027246667.1 → XP_027102468.1	CNL	CN
LOC113687583	5e	XM_027205164.1 → XP_027060965.1	NL	N
LOC113696461	6e	XM_027215871.1 → XP_027071672.1		RLK
LOC113719338	11e	XM_027244549.1 → XP_027100350.1	NL	N
		XM_027244548.1 → XP_027100349.1	NL	N
LOC113698624	7c	XM_027218504.1 → XP_027074305.1		
		XM_027218503.1 → XP_027074304.1		KIN
LOC113695878	1c	XM_027215638.1 → XP_027071439.1	CNL	CN
		XM_027215180.1 → XP_027070981.1	CNL	CN
		XM_027215563.1 → XP_027071364.1	CNL	CN
		XM_027215495.1 → XP_027071296.1	CNL	CN
		XM_027215418.1 → XP_027071219.1	CNL	CN
		XM_027215344.1 → XP_027071145.1	CNL	CN
		XM_027215262.1 → XP_027071063.1	CNL	CN
		XM_027215096.1 → XP_027070897.1	CNL	CN
LOC113691453	6c	XM_027209588.1 → XP_027065389.1	CNL	CNL
		XM_027209589.1 → XP_027065390.1	CNL	CNL
		XM_027209590.1 → XP_027065391.1	CNL	CNL
LOC113743418	5e	XM_027271413.1 → XP_027127214.1		RLK
LOC113691436	1c	XM_027209899.1 → XP_027065700.1		NL
		XM_027209972.1 → XP_027065773.1		NL
		XM_027209669.1 → XP_027065470.1		NL
		XM_027209746.1 → XP_027065547.1		NL
		XM_027209602.1 → XP_027065403.1		NL
		XM_027209825.1 → XP_027065626.1		NL
LOC113702969	1e	XM_027224166.1 → XP_027079967.1		RLP
LOC113742856	4e	XM_027270866.1 → XP_027126667.1		KIN
LOC113711280	10e	XM_027234444.1 → XP_027090245.1		KIN
LOC113698979	1e	XM_027218987.1 → XP_027074788.1		RLP

Legenda: “Chr”: cromossomo; “*Unplaced Scaffold*”: não encontradas; “e”: localizado no sub genoma de *C. eugenioides*; “c”: localizado no sub genoma de *C. canephora*.

Observa-se na Tabela 2 a presença de 63 prováveis genes de resistência, sendo que, 38 estão na porção referente a espécie *C. eugenioides* enquanto que a porção referente a *C. canephora* foram encontrados 25 genes. Em relação às proteínas presentes em ambas as porções, foram encontradas oito classes: CNL, CN, NL, N, RLK no *RRGPredictor* e no *DRAGO2* e as classes RLK, KIN e L apenas no *DRAGO2*, sendo que, a classe KIN e L são exclusivas dessa ferramenta.

Realizando uma comparação entre *C. eugenioides* e *C. canephora*, as classes de proteínas presentes na Tabela 2 que apresentaram maior ocorrência em *C. eugenioides*, usando a ferramenta *RRGPredictor*, foram a NL e a RLK, com valor de superioridade equivalente a 2,33 e 1,5, respectivamente. A classe N foi encontrada por essa mesma ferramenta somente em *C. eugenioides*. Em relação a ferramenta *DRAGO2* as classes mais encontradas foram a KIN, RLK, RLP e a N (1,66; 10,0; 2,5; 2,33).

As classes que apresentaram maior incidência em *C. canephora* comparando com *C. eugenioides* (Tabela 2), pela ferramenta *RRGPredictor*, foi CNL com valor de superioridade de 2,13, seguindo pela classe CN que só aparece em *C. canephora* por essa ferramenta. Já na ferramenta *DRAGO2* podemos observar que a classe CN apresenta a incidência em ambas as porções, com o valor de superioridade de 7,5, seguindo da classe NL com 4 vezes maior em *canephora* comparado a *eugenioides*.

Das proteínas presentes exclusivamente em *C. eugenioides*, foram encontradas cinco classes no *RRGPredictor*: CNL, CN, NL, N, RLK e seis classes no *DRAGO2*: CNL, CN, NL, N, RLK, RLP e KIN (Tabela 2) identificando 22 e 54 vezes o aparecimento total da distribuição dessas classes, respectivamente para cada ferramenta. Já para *C. canephora* foram encontradas quatro classes no *RRGPredictor*: CNL, CN, NL, RLK e oito classes no *DRAGO2*: CNL, CN, NL, N, RLK, RLP, KIN e L (Tabela 2) identificando 31 e 51 vezes o aparecimento total, respectivamente.

Os RLKs são genes candidatos que podem conferir resistência a *H. vastatrix* (ALMEIDA et al., 2021), estes, foram encontradas em ambas as ferramentas utilizadas. Essa classe é considerada como o principal elemento dos complexos de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que possuem uma superfamília de proteínas transmembranares, sendo que, a grande maioria exercem função para detectar patógenos (TANG et al., 2015; SILVA & MICHELI, 2020).

As classes que apareceram em ambas as ferramentas utilizadas juntamente com a identificação cromossômicas, estão disponibilizadas na Figura 8.

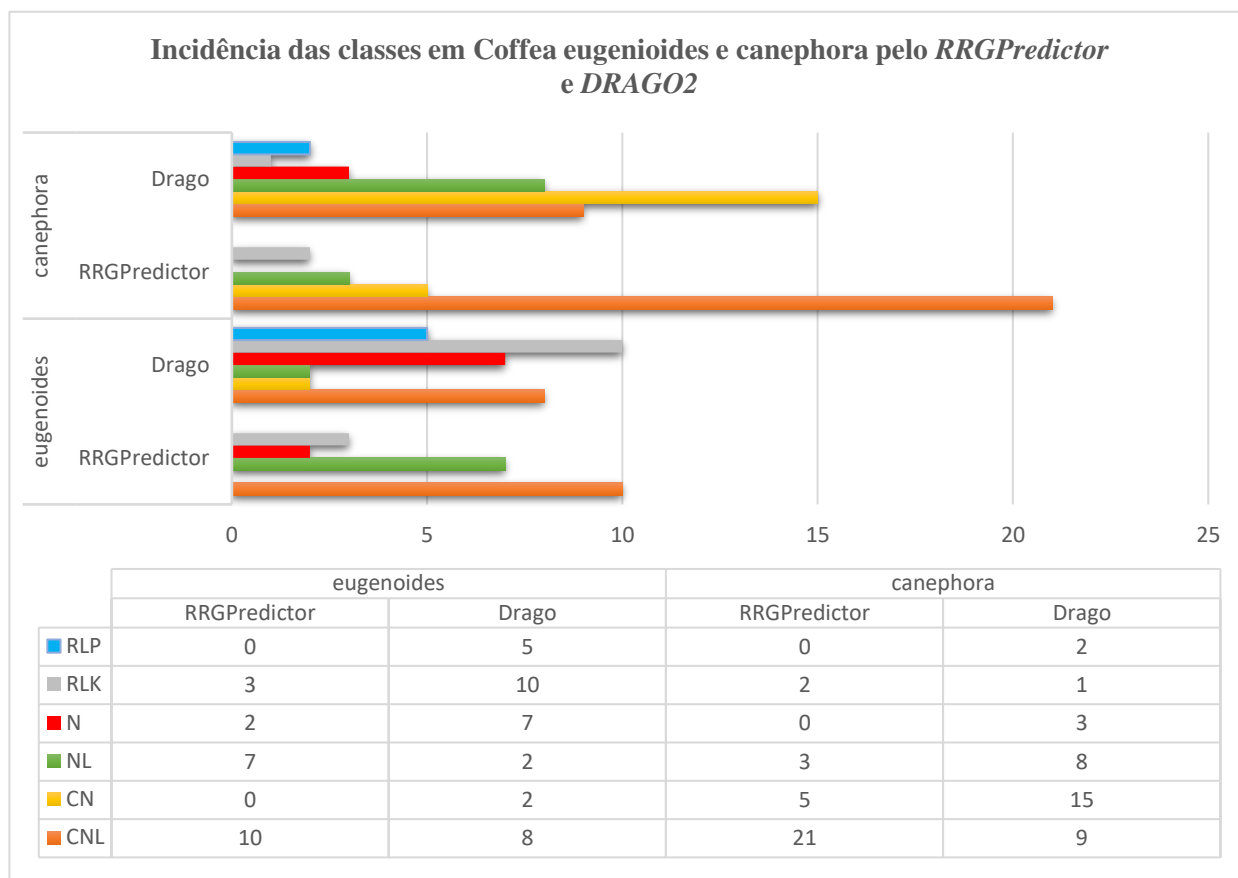


Figura 8: Distribuição da incidência das classes encontradas pelo *RRGPredictor* e *DRAGO2* nas porções C^E e no C^C

De acordo com a Figura 8 na porção de C^C , a classe que apresentou maior ocorrência, realizando o somatório em ambas as ferramentas, foi a CNL com 26,54%, seguido da classe CN com 17,69%. Em C^E CNL também foi a classe mais encontrada, com 23,68%, seguido da classe RLK com 17,10%. Levando em consideração apenas o *RRGPredictor* em C^C e C^E separadamente, a classe mais encontrada foi a CNL com 67,74% e 23,68%, respectivamente. Para o *DRAGO2* em C^C , CN foi a mais frequente (23,68%) e para C^E foi a RLK (17,10%).

As proteínas de resistência em plantas mais abundantes são as CNL, as quais apareceram em grande quantidade em ambas porções do genoma. No café, o gene S_{H3} codifica uma proteína semelhante a CNL conferindo importante fator de resistência a ferrugem (RIBAS et al., 2011).

Em quatro genes não foram encontradas as localizações cromossômicas (*Unplaced Scaffold*), impossibilitando as comparações realizadas anteriormente. No LOC113720053 e LOC113723683, de acordo com as ferramentas *RRGpredictor* e *DRAGO2*, foram encontradas as mesmas classes, CNL e CN respectivamente. No LOC113723601 foi observada a classe NL

para ambas as ferramentas. Somente no gene LOC113722794 que foi observada as classes que são encontradas exclusivamente em cada ferramenta, sendo elas, a classe KIN no *DRAGO2* e a classe RLKGNK2 pelo *RRGPredictor*.

A ocorrência do domínio KIN é relatado por Afal et al. (2007) como advindo da classe STK (Serine/ theonine Kinase), as quais interagem com outras proteínas em diferentes processos, conferindo resistência a doenças. Já a classe RLKGNK2 é uma variação da classe RLK com um domínio GNK2, que se caracteriza por sua atividade antifúngica (MIYAKAWA et al., 2014). Mucherino Muñoz et al. (2021) identificaram Genes/QTLs com domínios RLK e RLK + GNK2, agrupados nos cromossomos 4 e 6 do cacau, esses genes têm um grande potencial para ser parcialmente responsável pelo reconhecimento e resposta na interação com o patógeno *Phytophthora palmivora*.

As classes que foram encontradas em ambas as ferramentas podem ser caracterizadas como dados mais robustos. No entanto, vale ressaltar que nesse trabalho, no momento da seleção dos dados de expressão, não foi considerada apenas a sobreposição dos dados encontrados pelo *DRAGO2* e *RRGpredictor*.

Quando essa sobreposição é considerada algumas classes encontradas como a KIN e a RLKGNK2, seriam perdidas, sendo que, essas classes podem ser importantes para a classificação dos *RGAs*.

Essas informações possuem grande potencial para o entendimento da distribuição e classificação dessas classes e domínios presentes no genoma de *C. arabica*, bem como, para o desenvolvimento de recursos genéticos vantajosos para o desenvolvimento de cultivares resistentes à *H. vastatrix*.

6. Conclusão

Por meio da utilização das ferramentas *RRGpredictor* e *DRAGO2* foram identificadas dezenove classes gênicas (CNL, CN, MLO, NL, N, RLK, RLKGNK2 KIN, RLP, RPW8NL, TNL, TN, T, CLK, CL, CTNL, L, TL e TRAN), com potencial envolvidos na resistência de *C. arabica* a doenças. Dessas, a classe CNL foi a mais encontrada no genoma dessa espécie (22,54%), seguindo da RLK (19,14%).

- Para resistência do cafeeiro ao fungo *H. vastatrix*, foram identificados 25 genes candidatos distribuídos em 12 classes de proteínas: CNL, CN, NL, RLK, CNL, CN, NL, N, RLK, RLP, KIN e L.

- No processo de avaliação dos níveis de expressão dos *RGAs* no transcriptoma da interação *Coffea-H. vastatrix* foi observada uma possível atuação dos genes identificados na resistência pré-haustorial do cafeeiro.

- A identificação desses genes permitirá entender melhor como funciona a interação entre *Coffea* e *H. vastatrix*, além de contribuírem para a seleção assistida de cultivares cafeeiras resistentes nos programas de melhoramento.

Referências Bibliográficas

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.HH.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 9. ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2018.
- AFZAL, AJ.; WOOD, A.J.; LIGHTFOOT, D.A. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinase: Roles in signaling and Plant Defense. **MPMI**, v. 21, n. 5, p. 507-517. 2007.
- ANDREWS, S. **FastQC**: A quality control tool for high throughput sequence data. p. 2010.
- ALMEIDA, D.P.; CASTRO, I.S.L; MENDES, T.A.O.; ALVES, D.R.; BARKA, G.D.; BARREIROS, P.R.R.M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S.; CAIXETA, E.T. Receptor-Like Kinase (RLK) as a candidate gene conferring resistance to *Hemileia vastatrix* in coffee. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 6, 2020.
- ALVARADO, L.; VÉRTIZ, R.; BORJAS, R.; CASTRO, V.; JULCA, A. Caracterização agronômica de 95 acessos no banco de germoplasma de café em Chanchamayo (Peru), ano de 2016. **Rev. ECI Perú**, v. 14, p. 41-48. 2017.
- ALVARENGA, S.M.; CAIXETA, E.T.; HUFNAGEL, B.; THIEBAUT, F.; MACIEL-ZAMBOLIM; ZAMBOLIM, L., & SAKIYAMA, N. S. Molecular markers from coffee genome expressed sequences potentially involved in resistance to rust. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p. 890-898. 2011.
- AMANO, Y.; HONDA, H.; YUKO NUKADA, Y.; IKEDA, N.; YAMANE, M.; KOJI NAKANO, K.; KAMEYAMA, A.; MORITA, O. Safety Pharmacological Evaluation of the Coffee Component, Caffeoylquinic Acid, and Its Metabolites, Using Ex Vivo and In Vitro Profiling Assays. **Pharmaceuticals**, v. 12, n.110, 2019.
- ARAÚJO, I.S. Desempenho produtivo do café arábica no brejo paraibano. **Dissertação (Graduação)** - Curso de Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba :UFPB/CCA, 2021.
- ARAUZ, J. Coffee and the Liver. In: **Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants**. Elsevier, p. 675–685. 2017.
- BARKA, G.D.; CAIXETA, E.T.; Ferreira, S.S.; Zambolim, L. In silico guided structural and functional analysis of genes with potential involvement in resistance to coffee leaf rust: A functional marker based approach. **PLOS ONE**, v. 15, n. 7, p. 1-22, 2020.

BRAY, N.L.; PIMENTEL, H.; MELSTED, P.; PACHTER, L. Quantificação probabilística de RNA-seq quase ótima, **Nature Biotechnology** 34 , 525-527, 2016.

BETTENCOURT, A.J.; NORONHA-WAGNER, M. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Agronomia Lusitana**, v. 31, p. 285-292, 1971.

BETTENCOURT, A.J.; NORONHA-WAGNER, M.; LOPES, J. Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (“Híbrido de Timor”) à *Hemileia vastatrix* Berk. & BR. **Broteria Genética**, v. 1, n. 76, p. 53-8, 1980.

BETTENCOURT, A.J.; LOPES, J.; PALMA, S. Fatores genéticos que condicionam a resistência às raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. dos clones-tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de Híbridos de Timor. **Brotéria Genética**, v. 13, p.185-194.1992.

BETTENCOURT, A.J. Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de factores de resistência à *H. vastatrix* BERK & BR. para as principais cultivares de *Coffea arabica*. L. **Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC/IICT)**: 93. 1981.

BETTENCOURT, A. Considerações gerais sobre o ‘Híbrido de Timor’. **Instituto Agronomico de Campinas**, Circular nº. 23, p. 20. Campinas, Brasil. 1973.

BERTRAND, B.; GUYOT, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on the beverage quality of *C. arabica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 387-394. 2003.

BLUM, M.; CHANG, H.Y.; CHUGURANSKY, S.; GREGO, T.; KANDASAAMY, S.; MITCHELL, A.; NUKA, G.; PAYSAN-LAFOSSE, T.; QURESHI, M.; RAJ, S.; RICHARDSON, L.; SALAZAR, G.A.; WILLIAMS, L.; BORK, P.; BRIDGE, A.; GOUGH, J.; HAFT, D.H.; LETUNIC, I.; MARCHLER-BAUER, A.; MI, H. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. **Nucleic Acids Research**, 2021 v. 8, n. 49, p. D344-D354. 2021.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics** (Oxford, England), 30(15), 2114–2120. 2014.

BOSSO, H.; ARANTES, G.E.S.; BARBALHO, S. M.; GUIGUER, É.L.; DE SOUZA, M.; BUENO, P.; CHIES, A.B.; OLIVEIRA, P.B.; MENDES, C.G.; ARAÚJO, A.C. Effects of

Green and Ripe Coffee in the Metabolic Profile and Muscle Enzymes in Animals Practicing Physical Exercise. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 4, p. 416–420, 2019.

BRAINER, M.S.C.P. Panorama setorial do café. **Caderno Setorial ETENE**, n. 48, p. 1–15, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café no Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares**. 2020 Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

BRIDSON, D.M. Additional notes on Coffea (Rubiaceae) from tropical East Africa. **Kew Bulletin**, v. 49, n. 2, p. 331-342, 1994.

BOUTROT, F.; ZIPFEL, C. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. **Annu Rev Phytopathol**, v.55, p. 257–286, 2020.

CABRAL, P.G.C.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; OLIVEIRA, S.A.S.; CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, L. Genetic diversity and structure of Hemileia vastatrix populations on Coffea spp. **Plant Pathology**, v. 65, p. 196-214, 2016.

CANO-MARQUINA, A.; TARÍN, J.J.; CANO, A. The impact of coffee on health. **Maturitas**, v. 75, p. 7-21. 2013.

CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, E. M.; FREITAS, R. L.; HADDAD, F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, L. Identification of race XXXIII of Hemileia vastatrix on Coffea arabica Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, 7(1), 189-191.2012

CARDOSO, R.M.L.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Novas raças de Hemileia vastatrix Berk. et Br. identificadas em cafeeiros de genótipos complexos. **Fitopatol Bras**, 11:318. 1986.

CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1993. 7 p. (Documentos IAC, 34).

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C. Café. In: FURLANI, A.M.C.; VIEGAS, G.A. (Eds.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico**. Campinas: Instituto Agrônômico, cap.2, p.29-76. 1993.

CARVALHO, C.R.; FERNANDES, R.C.; CARVALHO, G.M.A.; BARRETO, R.W.; EVANS, H.C. Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. **PLOS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1–7, 2011.

CARVALHO, F.S. O impacto das mudanças climáticas na produção de café arábica nos municípios de Alfenas e Conceição do Rio Verde. 159 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Escola de Economia de São Paulo, Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 2019.

CARVALHO, V.; CHALFOUN, S.; CUNHA, R. Manejo de doenças do cafeeiro. In: Reis, P., Cunha, R. (Eds.). *Café arábica: do plantio à colheita*. Lavras: U.R. **EPAMIG SM** . pp. 689 - 755.2010.

CASTILLO, G. **Controle químico da ferrugem do cafeeiro**. 2016. Universidade Federal de Lavras - 3rlab. Disponível em: <<https://www.3rlab.com.br/2016/06/10/control-quimico-da-ferrugem-do-cafeeiro/>>. Acesso em: 11 jan. 2020.

CASTRO, I.S.L.; FREITAS-LOPES, R.D.L.; FERREIRA, S.D.S.; MACIEL, T.E.F.; FLOREZ, J.C.; ZAMBOLIM, E.M.; CAIXETA, E.T. Transcriptome Analysis Uncovers the Gene Expression Profile of *Hemileia vastatrix* (Race XXXIII) during the Interactions with Resistant and Susceptible Coffee. **Agronomy**, v. 12, n.2, 2022.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical Classification of Coffee. In: CLIFFORD, M. I.; WILLSON, K. C. *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*. **Botanical Classification of Coffee**, p.13-47, 1985.

CHARRIER, A.; ESKES, A.B. Botany and Genetics of Coffee. In: WINTGENS, J. N. (Ed.). **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**. Darmstadt: WILEY-VCH, p. 25-56. 2004.

CHARRIER, A.; JACQUOT, M.; HAMON, S.; NICOLAS, D.(eds.). *L'amélioration des plantes tropicales*. Collection Repères, CIRAD-ORSTOM, **Montpellier**. 1998.

CLIFFORD, M.N.; WILLSON, K.C. *Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverage*. In: **Coffee**. [s.l.] Springer US, p. 13–47. 1985.

COFFEE GENOME HUB. **Documentation**. Disponível em: <<https://coffee-genome.org/documentation>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café**. Brasília, v.9, n.1, p. 1-60, 2022.

CONESA, A.; CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; GOMEZ-CABRERO, D.; CERVERA, A.; MCPHERSON, A.; SZCZEŚNIAK, M.W.; GAFFNEY, D.J.; ELO, L.L.; ZHANG, X.; MORTAZAVI, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biol**, v. 17, n. 1, p. 13. ISSN 1474-760X (Electronic) 1474-7596 (Linking) 2016.

COUTO, C.C.; SANTOS, T.F.; MAMEDE, A.; OLIVEIRA, T.C.; SOUZA, A.M.; FREITAS-SILVA, O.; OLIVEIRA, E. Coffea arabica and C. canephora discrimination in roasted and ground coffee from reference material candidates by real-time PCR. **Food Research International**, v. 115, p. 227–233, 2019.

DALIO, R.J.; PASCHOAL, D.; ARENA, G.D.; MAGALHAES, D.M.; OLIVEIRA, T. S.; MERFA, M.V.; MACHADO, M.A. Hypersensitive response: From NLR pathogen recognition to cell death response. **Annals of Applied Biology**, v, 178, n.2, p. 268-280, 2021.

DAVIS, A.P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D.M.; STOFFELEN, P. “An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae).” **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 152, p. 465–512, 2006.

DENOEUDE, F.; CARRETERO-PAULET, L.; DEREPPER, A.; DROC, G.; GUYOT, R.; PIETRELLA, M.; ZHENG, C.; ALBERTI, A.; ANTHONY, F.; APREA, G.; AURY, J. M.; BENTO, P.; BERNARD, M.; BOCS, S.; CAMPA, C.; CENCI, A.; COMBES, M. C.; CROUZILLAT, D.; DA SILVA, C.; DADDIEGO, L.; LASHERMES, P. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n. 6201, p. 1181-1184, 2014.

DIBY, L. Tea, Coffee, and Cocoa. In: **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. [s.l.] Elsevier Inc., v. 3, p. 420–425, 2016.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V.M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012.

FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; VERDIN FILHO, A.C.; VOLPI, P.C. Origem, dispersão, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. In: (Eds.). **Café conilon**. Vitória, ES: Incaper. Cap. 3, 2007.

FERREIRA, L.T.; SANTOS, J.; Produção dos Cafés do Brasil ocupa 1,82 milhão de hectares em 2022. Versão 3.119.0. p.04. **Embrapa Portal**. 2022.

FLOREZ, J.C.; MOFATTO, L.S.; FREITAS-LOPES, R.L; FERREIRA, S.S.; ZAMBOLIM, E.M.; CARAZZOLLE, M.F.; ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E.T. High throughput transcriptome analysis of coffee reveals prehaustorial resistance in response to *Hemileia vastatrix* infection. **Plant Mol. Biol.** v. 95, p. 607–623, 2017.

GABRIËLS, S.H.; VOSSEN, J.H.; EKENGREN, S.K.; VAN OOIJEN, G.; ABD-EL-HALIEH, A.M.; VAN DEN BERG, G.C.; RAINEY, D.Y.; MARTIN, G.B.; TAKKEN, F.L.; DE WIT, P.J.; JOOSTEN, M. H. An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra- and intracellular resistance proteins. **Plant J.**, v. 50, p. 14–28. 2007.

GARCIA, J.C.; GUADAGNO A.; PAYTUUVI-GALLART A.; SAERA-VILA A.; AMOROSO G.C.; D'ESPOSITO D.; ANDOLFO, G.; CIGLIANO, R.; SANSEVERINO, W.; ERCOLANO, M.R. PRGdb 4.0: uma base de dados atualizada dedicada a genes envolvidos no processo de resistência a doenças de plantas, **Nucleic Acids Research**. 2021.

GICHURU, E.K.; ITHIRU, J.M.; SILVA, M.C.; PEREIRA, P.; VARZEA, M.P.V. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 6, p. 424–427, 2012.

GUERREIRO-FILHO, O.; MALUF, M; BREEDING P. S. Coffee: Production, Quality and Chemistry. In A. Farah (Ed.), **London, Royal Society of Chemistry**.2019.

GU, H.; LIANG, S.; ZHAO, J. Novel Sequencing and Genomic Technologies Revolutionized Rice Genomic Study and Breeding. **Agronomy**, v. 12, n. 1, p. 218, 2022.

GURURANI, M.A. VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C.P.; NOOKARAJU, A. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51–65, 2012.

HAGHDOUST, R.; SINGH, D.; PARK, R.F.; DRACATOS, P. M. Characterizing the Genetic Architecture of Nonhost Resistance in Barley Using Pathogenically Diverse Puccinia Isolates. **Phytopathology**, v. 111, n.4, p.684-694, 2021.

HARLAN, J.R; DEWET, J.M.J. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. **Bot ver.**, v. 41, p. 361-390, 1975.

HOGEWEG, P.; HESPER, B. Instrução interativa em interações populacionais. **Comput Biol Med**, v. 8, p. 319–327. 1978.

HOGEWEG, P. The Roots of Bioinformatics in Theoretical Biology. **PLOS Computational Biology**, v. 7, n. 3, p. 1-5. 2011.

JHAVERI, R. Coffee: More Than Just Your Morning Pick-Me-Up. **Clinical Therapeutics**, v.43, n.3, p. 431-433, 2021.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v 444, p. 323-329, 2006.

JONES, P.; BINNS, D.; CHANG, H.Y.; FRASER, M.; LI, W.; MCANULLA, C.; MCWILLIAM, H.; MASLEN, J.; MITCHELL, A.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; QUINN, A. F.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; YONG, S. Y.; LOPEZ, R.; HUNTER, S. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.

JOSHI, R.K.; NAYAK, S. Perspectives of genomic diversification and molecular recombination towards R-gene evolution in plants. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 19, p. 1-9. 2013.

JUNGEUN, K. L.; CHANJU, L.; BONG-WOO, C.; JAE-PIL, O.; SANG KEUN, A.; RAZA, K.; SUK-YOON, A.; JISOOK, H.; CHEOL-GOO. A genome-wide comparison of NB-LRR type of Resistance Gene Analogs (RGA) in the plant Kingdom **Mol. Cell**, 33, pp. 385-392, 2012.

KEITH, L.M.; SUGIYAMA, L.S.; BRILL, E.; ADAMS, B.L.; FUKADA, M., HOFFMAN, K.M. & MELZER, M. J. First report of coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix* on coffee (*Coffea arabica*) in Hawaii. **Plant Disease**, v. 106, n. 2, 2022.

KIWUKA. C; GOUDSMIT E.; TOURNEBIZE R.; OLIVEIDA A.S; DOUMA J.C; BELLANGER L. Diversidade genética do café robusta ugandês nativo e cultivado (*Coffea*

canephora Pierre ex A. Froehner): influências climáticas, potencial de reprodução e conservação da diversidade. **PLoS ONE** 16 (2).2021.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. Genome. **Molecular and General Genetics**, v. 261, n. 2, p. 259–266, 1999.

LEITE, N.O.G.; CHAGAS, A.B.; COSTA, M.L.A.; FARIAS, L.R.A.; CUNHA, A.L.; ROCHA, M.A.N.; NASCIMENTO, C.M.A.; ROCHA, J.E.F.; MARANHÃO, T. L. G.Q.; SANTOS, A.F.; SILVA, J.V. Influences of Pathogen- Host interactions in the Environment on the Biological functions of plants. **Research Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020.

LOVE, M.I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

LOZANO, R.; HAMBLIN, M.T.; PROCHNIK, S.; JANNINK, J.L. Identification and distribution of the NBS-LRR gene family in the Cassava genome. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 360, 2015.

MAIA, T.A.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; CAIXETA, E.T.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZAMBOLIM, L. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathol**, v. 42, p. 533–542, 2013.

MAURIN, O.A.P.; DAVIS, M.; CHESTER, E.F.; MVUNGI, Y.; JAUFEERALLY-FAKIM.; FAY, M. F. Towards a phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): Identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**. v. 100, p. 1565–1583, 2007.

MARTEL, A.; RUIZ-BEDOYA, T.; BREIT-MCNALLY, C.; LAFLAMME, B.; DESVEAUX, D.; GUTTMAN, D.S. The ETS-ETI cycle: evolutionary processes and metapopulation dynamics driving the diversification of pathogen effectors and host immune factors. **Curr Opin Plant Biol**, p.62, 2021.

MATIELLO, J.B.; ALMEIDA, S.R.; PAIVA, R. N. **Procafé: Avaliação da ferrugem do cafeeiro – diferenças entre a prática e a academia**. 2019. Notícias Agrícolas. Disponível em: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/cafe/229326-procafe-avaliacao-da-ferrugem-do-cafeeiro-diferencas-entre-a-pratica-e-a-academia.html#.YGsfaa9KjIU>>. Acesso em: 24 mar. 2021.

MATIELLO, J.B. **O café do cultivo ao consumo**. São Paulo, SP: Globo, 320p., 1991.

MATIELLO, J.B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A.W.R.; FERNANDES, D.R. Cultura do café no Brasil: novo manual de recomendações. Rio de Janeiro/Varginha: **MAPA/PROCAFÉ**. p. 387. 2010.

MATIELLO, J.B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S.R.; FERNANDES, D.R. **Cultura de café no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Fundação Procafé. Rio de Janeiro-RJ e Varginha-MG. p. 728, 2020.

MCCOOK, S. Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. **Journal of Global History**, v. 1. n. 02, p. 177-195, 2006.

MEYERS, B.C.; KOZIK, A.; GRIEGO, A.; KUANG, H.; MICHELMORE, R. W. Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 15, p. 809-934. 2003.

MIYAKAWA, K.T.; HATANO, Y.; MIYAUCHI, Y.; SUWA, Y.; SAWANO, M. A secreted protein with plant-specific cysteine-rich motif functions as a mannose-binding Lectin that exhibits antifungal activity. **Plant Physiol.**, v. 166, p. 766-778. 2014.

MIYAKAWA, T.; MIYAZONO K.; SAWANO S.; HATANO K.; TANOKURA M. Estrutura cristalina de ginkbilobin-2 com homologia com domínio extracelular de quinases semelhantes a receptores ricos em cisteína vegetal, **Proteínas**, v. 77 .p. 247-251. 2009.

MOHAMMED, A.B.D.I. Importance and Characterization of Coffee Berry Disease (*Colletotrichum kahawae*) in Borena and Guji Zones, Southern Ethiopia. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 06, n. 09, 2015.

MUCHERINO, M.J.J.; MELO, C.A.F.; SANTANA S.R. J.; LUZ, E.D.M.N., & CORRÊA, R.X. Structural and Functional Genomics of the Resistance of Cacao to *Phytophthora palmivora*. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 961, 2021.

MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. **Journal of Bioscience**, v. 38, p. 433–449, 2013.

NUNES, C.C.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; SILVA, J.C. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, p. 445-452. 2009.

OSUNA-CRUZ, C.M.; PAYTUVI-GALLART, A.; DI DONATO, A.; SUNDESHA, V.; ANDOLFO, G.; AIESE CIGLIANO, R.; SANSEVERINO, W.; ERCOLANO, M. R. PRGdb 3.0: A comprehensive platform for prediction and analysis of plant disease resistance genes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1197–D1201, 2018.

ORTIZ, A.S.M. Análises bioinformáticas de proteínas de resistência do tipo nucleotide binding site-leucine rich repeat (nbs-*lrr*) de café. (**Dissertação - Mestrado**). 68f. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

PACHTER, L. **Near-optimal RNA-Seq quantification with kallisto**. 2016. Disponível em: <<https://liorpachter.wordpress.com/2015/05/10/near-optimalrna-seq-quantification-with-kallisto/>>. Acesso em: 06/03/2022.

PEIXOTO, J.N.S; NUNES, M.; BALIZA, D.P; PEREIRA, S.P.; ROSA, B.T. Family coffee and good agricultural practices in Bom Sucesso - MG. **Coffee Science**, v. 12, n. 3, p. 365–373, 2017.

PIFFANELLI, P.; NILSSON, E.U; WALLIN, E.; PANSTRUGA, R.; VON HEIJNE G.; SCHULZE-LEFERT, P. Topologia, localização subcelular e diversidade de sequências da família Mlo em plantas, **J. Biol. Química**, v. 274, p. 34993-35004.1999.

POOLE, R.; KENNEDY, O.J.; RODERICK, P.; FALLOWFIELD, J.A.; HAYES P.C.; PARKES, J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 359, p. j5024, 2017.

PORTO, B.N. Sequenciamento do genoma e identificação de candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix*, **Tese(doutorado)**–Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, 2016.

PORTO, B.N.; CAIXETA, E.T.; MATHIONI, S.M.; VIDIGAL, P.M.P.; ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M.; RESENDE, M.L.V.D. Genome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* reveal expression dynamics of candidate effectors dependent on host compatibility. **PLoS One**, v. 14, n. 4, 2019.

PRUITT, R.N.; GUST, A.A.; NÜRNBERGER, T. Plant immunity unified. **Nature plants**, v. 7, n. 4, p. 382-383, 2021.

RABELO, M.S. Acompanhamento da evolução de ferrugem e cercosporiose em função de cultivares de cafeeiro. 31 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia)** – Centro Universitário do Cerrado Patrocínio, Patrocínio, 2018.

RAMIRO, D.A.; ESCOUBE, J.; PETITOT, A.S.; NICOLE, M.; MALUF, M.P.; FERNANDEZ, D. Biphasic haustorial differentiation of Coffee Rust (*Hemileia vastatrix* Race II) associated with 50 defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology** 58: 944- 955. 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R: Uma Linguagem e Ambiente para Computação Estatística. R Foundation for **Statistical Computing**, Viena.2009.

RIBAS, A.F.; CENCI, A.; COMBE, M.C.; ETIENNE, H.; LASHERME, P. Organization and molecular evolution of a disease-resistance gene cluster in coffee trees. **BMC Genomics**, v. 12, p. 240, 2011.

RODEN, C. **Coffee**. London, United Kingdom: Penguin Books, 1994.

RODRIGUES, C.J.; BETTENCOURT, A.J. Races of the Pathogen and Resistance to Coffee Rust. **Annual Review of Phytopathology**, v. 13, n. 1, p. 49–70, 2003.

ROMANO, L.S. Caracterização de linhagens do cafeeiro Bourbon Amarelo para a produção de cafés especiais. (**Dissertação - Mestrado**). 65f. Unesp, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal 2021.

SANSEVERINO, W.; ROMA, G.; SIMONE, M.; FAINO, L.; MELITO, S.; STUPKA, E.; FRUSCIANTE, L.; ERCOLANO, M.R. PRGdb: A bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 1, p. D814-D821, 2009.

SANSEVERINO, W.M.R.E. In silico approach to predict candidate R proteins and to define their domain architecture. **BMC Res. Notes**, n. 5, p. 678. 2012.

SAUR, I.M.L.; PANSTRUGA, R.; SCHULZE-LEFERT, P. NOD-like receptor-mediated plant immunity: from structure to cell death. **Nat Rev Immunol**, v. 21, p. 305–318, 2021.

SCALABRIN, S.; TONIUTTI, L.; DI GASPERO, G.; SCAGLIONE, D.; MAGRIS, G., VIDOTTO, M. A single polyploidization event at the origin of the tetraploid genome of *Coffea arabica* is responsible for the extremely low genetic variation in wild and cultivated germplasm. **Scientific reports** v. 10, n. 1, p. 4642, 2020.

SEKHWAL, M.K.; LI, P.; LAM, I.; WANG, X.; CLOUTIER, S.; YOU, F. M. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 8, p. 19248-19290, 2015.

SEO, E.; KIM S.; YEOM, S.I.; CHOI, D. Genome-Wide Comparative Analyses Reveal the Dynamic Evolution of Nucleotide-Binding Leucine Rich Repeat Gene Family among Solanaceae Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1205. 2016.

SETOTAW, T.A.; CAIXETA, E.T.; PEREIRA, A.A.; OLIVEIRA, A.C.B.; CRUZ, C. D.; ZAMBOLIM, E.M.; SAKIYAMA, N.S. Coefficient of Parentage in *Coffea arabica* L. Cultivars Grown in Brazil. **Crop Science**, v. 53, n. 4, p. 1237-1247. 2013.

SILVA, R.A. Caracterização de raças fisiológicas e análise de proteínas candidatas a efetoras em população de *Hemileia vastatrix* no Brasil. 75 f. **Tese (Doutorado em Fitopatologia)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

SILVA, R.A.; ZAMBOLIM, L.; CASTRO, I.S.L.; RODRIGUES, H.S.; CRUZ, C.D.; CAIXETA, E.T. The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. **Euphytica**, v. 214, n. 9, 2018.

SILVA, R.J.S.; MICHELI, F.R.R.G. Predictor, a set-theory-based tool for predicting pathogen-associated molecular pattern receptors (PRRs) and resistance (R) proteins from plants. **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2666–2676, 2020.

SILVA, V.A; ABRAHÃO, J.C.R; LIMA, L.A.; CARVALHO, G.R.; GAVA, M.A.; SALGADO, M.L.; VOLPATO, M.L.; BOTELHO C.E. Selection of conilon coffee clones tolerant to pests and diseases in Minas Gerais. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, p. 269-276. 2019.

SOUZA, F.F.; SANTOS, J.C.F.; COSTA, J.N.M.; SANTOS, M.M. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. EMBRAPA, Porto Velho, RO, 2004.

SYLVAIN, P.G. Some observations on *Coffea arabica* L. in Ethiopia. **Turrialba**, v. 5, p. 37–53, 1955.

TALHINHAS, P.; BATISTA, D.; DINIZ, I.; VIEIRA, A.; SILVA, D.N.; LOUREIRO, A.; TAVARES, S.; PEREIRA, A.P.; AZINHEIRA, H.G.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; VÁRZEA, V.; SILVA, M. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039–1051, 2017.

TANG, S.; ZHONGHUA, T.; ZHAI, T.; FANG, X.; LIU, F.; LIU, D.; ZHANG, J.; LIU, D.; WANG, S.; ZHANG, K.; SHAO, Q.; TAN, Z.; PATERSON, A.H.; ZHANG, Z Construction

of genetic map and QTL analysis of fiber quality characteristics for Upland cotton. **Euphytica**, v. 201, n. 2, p. 195-213, 2015.

TANAKA, N.M.; SHENTON, Y.; KAWAHARA, M.; KUMAGAI, H.; SAKAI, H.; KANAMORI; YONEMARU, J.; FUKUOKA, S.; SUGIMOTO, K.; ISHIMOTO, M.; WU, J.; EBANA, K. Whole-genome sequencing of the NARO World Rice Core Collection (WRC) as the basis for diversity and association studies. **Plant Cell Physiol.**, v. 61, p. 922-932, 2020.

TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, W.; GLAZEBROOK, J.; CHANG, HS; HAN, B.; ZHU, T.; ZOU, G.; KATAGIRI, F. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Cell**, v. 15, p. 317–330, 2003.

TRIMMOMATIC MANUAL, V0.32. Disponível em <http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/TrimmomaticManual_V0.32.pdf>.

USA. United States Government. **NCBI: National Center for Biotechnology Information Search database 2020**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

VALENCIA, A.; MORALES, A.Y.; MONCADA, M.P.; CORTINA, H.A. Introgression of the SH3 gene resistant to rust (*Hemileia vastatrix*) in improved lines of CASTILLO ® variety (*Coffea arabica* L.). **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 9, p. 130–138, 2017.

VÁRZEA, V.M.P.; MARQUES, D. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolim, L.; Zambolim, E. M.; Várzea, V. M. P. (Eds). **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust**. Viçosa: Editora UFV, p. 53-74 , 2005.

VENTURA, R.B.; HUAMAN, L.A.; CEPERO, V.C.; FERNÁNDEZ, D.R.; PANDO, L.G.; OTINIANO, A.J. **Comportamiento de variedades de CAFÉ en San Ramón, Chanchamayo, Perú**. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2020. Disponível em:<https://issuu.com/marcialencisoojeda9/docs/comportamiento_de_variedades_de_cafe__2020>. Acesso em: 23 jan. 2021.

VELÁSQUEZ, D.; ALEJANDRO SÁNCHEZ, A.; SEBASTIÃO SARMIENTO, S.; MAURÍCIO TORO, M.; MAIZA, M.; SERRA, B.A Method for Detecting Coffee Leaf Rust

through Wireless Sensor Networks, Remote Sensing, and Deep Learning: Case Study of the Caturra Variety in Colombia. **Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 697, 2020.

VELOSO, T.G.R.; SILVA, M.; CARDOSO, W.S.; GUARÇONI, R.C.; KASUYA, M.; PEREIRA, L. L. Effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of *Coffea arabica* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14692, 2020.

WACHAMO, H.L. Review on Health Benefit and Risk of Coffee Consumption. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 6, n. 4, p. 1-12, 2017.

WANG, W.; FENG, B.; ZHOU, J.; TANG, D. Plant immune signaling: Advancing on two frontiers. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 2–24, 2020.

WANG, J.; SIDHARTH, S.; ZENG, S.; JIANG, Y.; CHAN, I.; LYU, Z.; MCCUBBIN, T.; MERTZ, R.; SHARP, R.E.; JOSHI, T. Bioinformatics for plant and agricultural discoveries in the age of multiomics: A review and case study of maize nodal root growth under water deficit. **Physiologia Plantarum**, v. 174, n. 2, 2022.

XIAO, S.; ELLWOOD, S.; CALIS, O.; PATRICK, E.; LI, T.; COLEMAN, M.; TORNEIRO, J.G. Resistência ao míldio de espectro amplo em *Arabidopsis thaliana* mediada por RPW8, **Ciência**, v. 291, p. 118-120. 2001.

YUYAMA, P.M.; JÚNIOR, O.R.; IVAMOTO, S.T.; DOMINGUES, D.S.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.; CHARMETANT, P.; LEROY, T.; PEREIRA, L.F. Transcriptome analysis in *Coffea eugenioides*, an Arabica coffee ancestor, reveals differentially expressed genes in leaves and fruits. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 1, p. 323–336, 2016.

ZAMBOLIM, L.; BRENAS, B. M. **Doenças do Café no Brasil: Enfermidades del café en Central-America**. Viçosa: Editora Ufv, 313p., 2018.

ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E.T. An overview of physiological specialization of coffee leaf rust-new designation of pathotypes. **International Journal of Current Research**, v. 13, n. 01, p. 15564-15575, 2021.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2016.

ZAMBOLIM, L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A.A.; SAKYIAMA, N.S.; CAIXETA, E.T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil: physiological

variability, current situation and future prospects. In: ZAMBOLIM, L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V.M.P. (eds) **Durable resistance to coffee leaf rust**. UFV, Viçosa, p. 53–74. 2005.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H.; PEREIRA, A.A.; 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**. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, UFV, p. 369-450, 2002.