

DÊNIA PIRES DE ALMEIDA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO GENE PUTATIVO DE  
RESISTÊNCIA DO CAFEIRO A *Hemileia vastatrix* E APLICAÇÃO NA  
SELEÇÃO ASSISTIDA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A447c  
2019 Almeida, Dênia Pires de, 1988-  
Clonagem e caracterização de um novo gene putativo de  
resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix* e aplicação na  
seleção assistida / Dênia Pires de Almeida. – Viçosa, MG, 2019.  
xii, 52 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eveline Teixeira Caixeta.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Ferrugem-do-cafeeiro. 3. Marcadores  
genéticos. 4. Café - Resistência a doenças. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.732

DÊNIA PIRES DE ALMEIDA

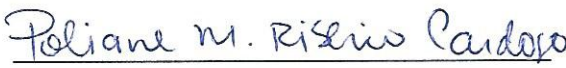
**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO GENE PUTATIVO DE  
RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO A *Hemileia vastatrix* E APLICAÇÃO NA SELEÇÃO  
ASSISTIDA**


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

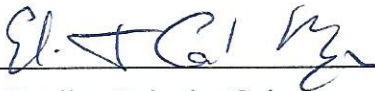
APROVADA: 11 de março de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Ney Sussumu Sakiyama

  
\_\_\_\_\_  
Antonio Carlos Baião de Oliveira

  
\_\_\_\_\_  
Poliane Marcele Ribeiro Cardoso

  
\_\_\_\_\_  
Tiago Antônio de Oliveira Mendes  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Eveline Teixeira Caixeta  
(Orientadora)

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

*Dedico primeiramente a Deus, que sempre esteve presente em minha vida, aos meus pais Maria Aparecida e João e meus irmãos Denise e Rafael e também ao meu esposo Marcelo pelo amor e apoio.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida e iluminar meu caminho, dando-me saúde e força para enfrentar os desafios e para tornar possível este sonho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) pela infraestrutura disponibilizada à realização do trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, João e Cida, por sempre me apoiarem, por nunca me deixarem desistir, pelo amor incondicional, pela educação, pela confiança, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos Denise e Rafael, pelo incentivo, carinho, paciência e amizade.

Ao meu esposo Marcelo, pelo amor, pela atenção, pelo incentivo, pela ajuda na realização desse trabalho e pela paciência durante esse tempo.

As minhas avós Maria de Lourdes e Maria da Conceição (*in memorium*) pelo amor incondicional e incentivo nos estudos.

À doutora Eveline Teixeira Caixeta, não só pela excelente orientação, mas, sobretudo pela amizade, pela confiança e incentivo. Pelos sábios ensinamentos responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional e por sempre me atender atenciosamente em sua sala, mesmo ocupada.

Aos Coorientadores Professor Laércio Zambolim e professor Tiago Antonio Mendes pelos valiosos ensinamentos, pelo incentivo, pelos aconselhamentos e disponibilidade de participação na banca.

Ao doutor Antonio Carlos Baião de Oliveira, doutor Ney Sussumu Sakiyama e a doutora Poliane Marcele Ribeiro Cardoso pela disponibilidade de participação na banca.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em especial àqueles que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos amigos do Biocafé pela amizade, incentivo, descontração nas horas vagas e por toda ajuda na realização deste trabalho.

Ao pessoal de campo (Senhor Mário e Senhor Geraldo), pelo apoio para a realização deste trabalho.

Aos amigos das coordenações 2016 e 2017 do Grupo de Estudo em Genética e Melhoramento (GenMelhor) pela amizade e companheirismo.

Aos amigos que aqui conquistei, pela amizade e companheirismo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

DÊNIA PIRES DE ALMEIDA, filha de João Pires de Almeida e Maria Aparecida Pinto de Almeida, nasceu no dia 28 de novembro de 1988, em Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino fundamental em 2003, na Escola Estadual José Albino Leal, em Pedra do Anta-MG e o ensino médio em 2006, na Escola Estadual Santa Rita de Cássia, Viçosa-MG.

Em Julho de 2013 diplomou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, sob orientação do professor Ney Sussumu Sakiyama.

Em agosto de 2013, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração Genética Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação da Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pesquisadora da Embrapa Café.

Em agosto de 2015, iniciou o curso de doutorado no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração Genética Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação da Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pesquisadora da Embrapa Café.

Atualmente está aprovada no Programa Nacional de Pós-Doutorado – PNPd em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, onde iniciará seus trabalhos, sob orientação da Dra. Eveline Teixeira Caixeta.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REFERÊNCIAS .....	3
CAPÍTULO 1 .....	6
Identification of Receptor-Like Kinase (RLK) as a putative gene conferring resistance to <i>Hemileia vastatrix</i> in coffee .....	7
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUCTION.....	8
2. MATERIAL AND METHODS .....	9
2.1. Screening of BACs .....	9
2.2. New generation sequencing of BAC clones and contig assembly.....	10
2.3. Prediction and annotation of genes .....	10
2.4. Gene expression analysis .....	11
2.5. PCR amplification in coffee clones .....	12
3. RESULTS.....	12
3.1. BAC clone identification, sequence assembly and gene prediction .....	12
3.2. Gene expression analysis .....	21
3.4. Gene HdT_LRR_RLK2 in differential coffee clones.....	22
4. DISCUSSION .....	24
5. REFERENCES .....	26
CAPÍTULO2 .....	32
Seleção de cafeeiros resistentes a <i>Hemileia vastatrix</i> e <i>CBD</i> por marcadores SCAR, CAPS, SSR, CARF005, HdT_LRR_RLK2, CBD-Sat207 e CBD-Sat235 .....	33
RESUMO .....	33
1. INTRODUÇÃO .....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1. Material vegetal e extração de DNA.....	36

2.2. Desenvolvimento de marcadores SCAR e CAPS.....	36
2.3. Marcadores de validação e mapeamento .....	37
2.4. Análises da Eficácia dos marcadores SCAR, CAPS e SSR na SAM.....	38
2.5. Seleção de plantas F <sub>3</sub> e RCS <sub>2</sub> para avanço de geração com base em marcadores moleculares .....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
3.1. Desenvolvimento e mapeamento de marcadores moleculares .....	39
3.2. Eficiência dos marcadores SCAR, CAPS e SSR na SAM em populações F <sub>3</sub> e RCS <sub>2</sub> ..	43
3.3. Plantas F <sub>3:4</sub> e RCS <sub>3</sub> com locos A,B, C e D de resistência a ferrugem e loco E de resistência a CBD.....	46
6. REFERÊNCIAS .....	48

## RESUMO

ALMEIDA, Dênia Pires de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Clonagem e caracterização de um novo gene putativo de resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix* e aplicação na seleção assistida.** Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta. Coorientadores: Laércio Zambolim e Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é uma das doenças mais preocupantes para a cafeicultura mundial. A alta variabilidade genética desse fungo e, conseqüentemente, o surgimento de novas raças do patógeno, tem resultado na suplantação da resistência de cultivares lançadas pelos programas de melhoramento genético. Para desenvolver cultivares com resistência durável, é essencial o entendimento dos genes de resistência envolvidos e seus mecanismos moleculares de atuação na resistência. Dessa forma, nesse estudo, foi realizada a clonagem e caracterização molecular de um novo gene (*Receptor Like Kinase*) presente no Híbrido de Timor (HdT) CIFC 832/2, uma das principais fontes de resistência dos programas de melhoramento. A clonagem foi realizada a partir de *screening* de uma biblioteca de clones BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*), usando um gene que foi selecionado de biblioteca subtrativa entre interação compatível e incompatível de Cafeeiro-*H. vastatrix*. A sequência da BAC selecionada foi analisada, sendo identificado dois genes putativo para resistência do cafeeiro. Por meio de RT-qPCR, um dos genes, denominado de HdT\_LRR\_RLK2 (*Leucine-rich repeat receptor like kinase*), apresentou pico de expressão apenas na interação incompatível, sendo esse considerado um novo gene putativo de resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*. A partir desse gene caracterizado, foi desenvolvido um marcador molecular funcional, o qual foi analisado e validado em um conjunto de clones de cafeeiros diferenciadores de raças de *H. vastatrix* e, então, usados na seleção assistida (SAM). Na SAM, cafeeiros em diferentes gerações de melhoramento foram analisados com o marcador funcional desenvolvido, além de outros marcadores previamente obtidos e associados a diferentes genes de resistência a *H. vastatrix*. Foi utilizado marcadores SCAR, CAPS e SSR flanqueando dois locos (genes maiores) de resistência a raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*, previamente localizados em mapa genético, além de marcador funcional originado de outro gene clonado (CC-NBS-LRR) alocado em outra região do mapa genético. Nesse trabalho, também foram usados os marcadores *CBD-Sat207* e *CBD-Sat235* associados ao gene *Ck1* de resistência a *Coffee Berry Disease (CBD)*. Essa doença se encontra presente somente no continente africano, no entanto, o uso dos marcadores permite realizar melhoramento preventivo para essa importante doença. Nas gerações F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e

Retrocruzamento Suscetível (RCS<sub>2</sub>) (Híbrido de Timor UFV 443-03 x Catuaí Amarelo IAC 64), as plantas foram genotipadas e fenotipadas com a raça II de *H. vastatrix*, para validação dos marcadores. As populações F<sub>3:4</sub> e RCS<sub>3</sub> foram genotipados com os marcadores validados. Foram identificados na F<sub>3:4</sub> cafeeiros com o genótipo AABBCCDDEe e no RCS<sub>3</sub>, genótipo AaBbCcD\_E\_, sendo que o loco A, B, C e D correspondem aos quatro locos de resistência a *H. vastatrix* e E ao loco de resistência a CBD. A SAM permitiu a identificação e obtenção de piramidação de múltiplos genes de resistência a ferrugem e a CBD. Os genótipos identificados serão usados para avanço de geração e plantados para os testes de campo. O uso das estratégias de SAM e piramidação de genes têm potencial de obtenção de resistência duradoura à doenças, além de reduzir tempo, espaço e custo dos testes de campo, por permitirem o descarte de plantas contendo os alelos recessivos nos diferentes locos.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Dênia Pires de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Cloning and characterization of a new putative gene of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and application in assisted selection.** Adviser: Eveline Teixeira Caixeta. Co-advisers: Laércio Zambolim and Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Coffee leaf rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, is one of the most important phytosanitary problems affecting global coffee production. The high genetic variability of this fungus and, consequently, the emergence of new pathogen races, has resulted in resistance replacement of cultivars released by breeding programs. To develop cultivars with durable resistance, it is essential to understand the genes associated with the resistance and their molecular mechanisms. Thus, in this work, a new gene (Receptor Like Kinase) present in the Híbrido de Timor (HdT) C1FC 832/2, one of the main sources of coffee resistance, was cloned and molecularly characterized. The gene cloning was performed by screening a BAC library (Bacterial Artificial Chromosomes) using a gene that was selected from a subtractive library between compatible and incompatible *Coffee-H. vastatrix* interaction. The sequence of the selected BAC was analyzed, and two putative genes for coffee resistance were identified. By RT-qPCR analysis, one of the genes, called HdT\_LRR\_RLK2 (Leucine-rich repeat receptor like kinase), showed a peak expression only in the incompatible interaction. This gene was, therefore, considered a novel putative coffee resistance gene to *H. vastatrix*. From this characterized gene, a functional molecular marker was developed, which was analyzed and validated on a set of coffee clones bearing different resistance gene combinations. The developed marker was then used in molecular assisted selection (MAS). In the MAS, coffee plants belonging to populations of different generations were analyzed with the developed functional marker, in addition to other previously obtained markers that are also associated with different *H. vastatrix* resistance genes. We used SCAR, CAPS and SSR markers flanking two loci (major genes) of resistance to races I and II and pathotype 001 of *H. vastatrix*, previously located in a genetic map. A functional marker originated from another cloned gene (CC-NBS-LRR) and located in a different locus in genetic map, was also analyzed. In addition, we used the markers CBD-Sat207 and CBD-Sat235, which are associated with the *Coffee Berry Disease* (CBD) resistance gene *Ck1*. This disease is confined to Africa; however, the use of the markers allows to make a preventive breeding for this important disease. In the generations F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> and Susceptible Backcross (BCS<sub>2</sub>) (Híbrido de Timor UFV 443-03 x Catuaí Amarelo IAC 64), the plants were genotyped and phenotyped with race II of *H. vastatrix* for validation of the markers. F<sub>3 4</sub> and BCS<sub>3</sub> populations were only genotyped

with the validated markers. F<sub>3:4</sub> coffee plants with the genotype AAB<sup>B</sup>CCDDEe and BCS<sub>3</sub> coffee plants with the genotype AaBbCcD\_E\_ were selected. Locus A, B, C and D correspond to the four loci of *H. vastatrix* resistance and E to the locus of CBD resistance. SAM allowed the identification and obtaining coffee plants with multiple genes of resistance to rust and CBD. The selected genotypes will be used to obtain the next generation e planted for field trials. The use of SAM and gene pyramiding strategies have the potential to achieve durable resistance to diseases, as well as to reduce the time, space and cost of the field trials, since they allow the disposal of plants containing the recessive alleles in the different loci.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Um dos principais focos dos programas de melhoramento do cafeeiro em várias instituições do mundo é a obtenção de cultivares com resistência múltipla e durável a doenças, principalmente à ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* (Ligabo et al. 2015; Guerra-Guimarães et al. 2015; Avelino et al. 2015; Daba et al., 2018; Fazuoli et al. 2018; Silva et al. 2018). A ferrugem do cafeeiro chegou ao Brasil em 1970 e se espalhou rapidamente por todo país. Desde então, os programas de melhoramento do cafeeiro no país, como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA), dentre outras instituições têm acumulado esforços nos estudos da a genética e obtenção de cultivares resistentes a *H. vastatrix*.

Para dar suporte a esses programas de melhoramento, foi introduzido no Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFV, um número expressivo de acessos contendo genes de resistência a *H. vastatrix* proveniente do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Portugal, Centro Nacional de Investigação do Café (Cenicafé), Colômbia, Instituto Internacional de Ciências Agrícolas (IICA), Costa Rica e IAC, Brazil (Pereira et al. 2005). Para a introgressão dos genes de resistência presentes nesses acessos em variedades de interesse agrônomo, é essencial que se faça um estudo inicial da herança dessas características (Pestana et al. 2015), bem como a caracterização detalhada desses genes. Com base nas análises de inoculação de cafeeiros com diferentes isolados de *H. vastatrix*, e considerando a teoria gene-a-gene de Flor (1971), foram identificados pelo menos nove genes dominantes ( $S_{H1}$  a  $S_{H9}$ ), simples ou associados, conferindo a resistência de cafeeiros a *H. vastatrix*. Os genes  $S_{H1}$ ,  $S_{H2}$ ,  $S_{H4}$  e  $S_{H5}$  foram caracterizados em genótipos de *C. arabica* da Etiópia (Bettencourt e Noronha-Wagner. 1971; Noronha-Wagner & Bettencourt. 1967). O gene  $S_{H3}$  foi identificado em cafeeiros derivados de *C. liberica* e os genes  $S_{H6}$ ,  $S_{H7}$ ,  $S_{H8}$  e  $S_{H9}$  em *C. canephora* (Bettencourt et al. 1980; Bettencourt, 1973).

Pestana et al. (2015) estudaram a herança dos genes de resistência presente no Híbrido de Timor UFV 443-03 em cruzamentos com a cultivar comercial suscetível Catuaí Amarelo IAC 64. Foram identificados dois genes maiores dominantes independentes que conferem resistência a três isolados de *H. vastatrix* (raças I e II e patótipo 001). Esses genes foram localizados em mapa genético e os marcadores que os flanqueiam foram identificados e disponibilizados para uso no melhoramento genético (Pestana et al. 2015; Almeida 2015).

Apesar de alguns estudos genéticos da resistência do cafeeiro estarem disponíveis, poucos trabalhos de caracterização molecularmente desses genes foram realizados. Barka (2017) realizou um dos primeiros estudos sobre a natureza molecular dos genes  $S_H$ . Nesse trabalho foi identificado e caracterizado um novo gene que compartilha sequências conservadas com outros genes  $S_H$ , mas diferente dos nove ( $S_{H1}$  a  $S_{H9}$ ) previamente caracterizados. A partir desse gene foi desenvolvido um marcador funcional para auxiliar a identificação desse gene nas populações em melhoramento.

O uso de marcadores moleculares associados aos locos de resistência do cafeeiro que conferem resistência a diferentes raças de *H. vastatrix* são de grande importância para obtenção de cultivares com resistência durável nos programas de melhoramento. Com o surgimento de novas raças de *Hemileia vastatrix*, devido a alta variabilidade do patógeno, as cultivares que antes eram resistentes, têm se tornando suscetíveis a essa doença (Cabral et al. 2016; Tahinhas et al. 2017). Essa suplantação da resistência tem sido uma preocupação dos programas de melhoramento do cafeeiro que levam cerca de 30 anos para obtenção de uma cultivar que pode ter sua resistência suplantada.

Uma estratégia para a obtenção de cultivares com resistência duradoura é a piramidação de genes. Van der Vossen et al. (2015) afirmam que a resistência durável está relacionada ao efeito de uma combinação de genes, seja por empilhamento dos principais genes, ou pelo acúmulo de vários genes menores.

Poucos estudos foram feitos em busca de cultivares com múltipla resistência a ferrugem do cafeeiro com utilização de marcadores moleculares. Alkimim et al. (2017) realizaram um dos primeiros esforços em identificar genótipos de café com resistência múltipla utilizando marcadores moleculares por meio da seleção assistida. Com base nos marcadores associados a diferentes genes, identificaram em progênies de cruzamento entre seleções indianas com cultivares de *Coffea arabica*, os genes de resistência a ferrugem  $S_{H3}$  (Mahé et al. 2008) e  $S_H?$  (Diola et al. 2011), bem como o gene *Ck1* que confere resistência a *Coffee Berry Disease* (CBD) (Gichuru et al. 2008). Para que novos genes sejam piramidados e acompanhados em diferentes gerações de melhoramento, é necessário a identificação de novos locos e desenvolvimento de novos marcadores associados à resistência a diferentes raças e diferentes doenças.

Nesse trabalho, objetivou-se identificar e caracterizar novos genes de resistência do cafeeiro a *H. vastatrix* a partir do sequenciamento de clones BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*), usando um gene que foi selecionado de biblioteca subtrativa entre interação compatível e incompatível de cafeeiro - *H. vastatrix*. Marcadores moleculares funcionais serão desenvolvidos a partir do(s) gene(s) clonado e utilizados em conjunto com outros



marcadores associados a resistência a doenças para teste de eficiência e validação para seleção assistida por marcadores. Marcadores validados serão utilizados para piramidação de genes em populações de melhoramento.

## 2. REFERÊNCIAS

Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV et al (2017). Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Molecular Breeding*, 37:6.

Almeida DP (2015). Desenvolvimento e utilização de marcadores moleculares para seleção de cafeeiros resistentes a ferrugem. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação.

Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, e Morales C (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303-321.

Barka (2017). Identification, molecular characterization and differential expression studies of genes activated during *Coffea arabica* L.-*Hemileia vastatrix* interactions Berk. & Broome. Universidade Federal de Viçosa. Tese.

Bettencourt AJ, Noronha-Wagner M. (1971). Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk & Br. *Agronomia Lusitana*, 31:285–292.

Bettencourt A. (1973) Considerações gerais sobre o ‘Híbrido de Timor.’ Instituto Agrônomo de Campinas, 23:20.

Bettencourt AJ, Noronha-Wagner M e Lopes J (1980). Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Broteria Genética* XIII,v.1, n.LXXVI, p.53-58.

Cabral PGC, Maciel- Zambolim E, Oliveira SAS, Caixeta ET e Zambolim L (2016). Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*, 65(2), 196-204.

Daba G, Helsen K, Berecha G, Lievens B, Debela A e Honnay O (2018). Seasonal and altitudinal differences in coffee leaf rust epidemics on coffee berry disease-resistant varieties in Southwest Ethiopia. *Tropical Plant Pathology*, 1-7.

Diola V, de Brito GG, Caixeta ET, Maciel-Zambolim E, Sakiyama NS, Loureiro ME (2011). High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. *Tree Genetic Genomes*, 7:1199–1208.

Fazuoli LC, Braghini MT, Silvarolla MB, Gonçalves W, Mistro JC, Gallo PB e Guerreiro Filho O (2018). IAC Obatã 4739-dwarf arabic coffee cultivar with yellow fruits and resistant to leaf rust. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18(3), 330-333.

Flor HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 275-296.

Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC et al (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease ( *Colletotrichum kahawae* ) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology*, 57:1117–1124.

Guerra-Guimarães L, Tenente R, Pinheiro C, Chaves I, Silva M, do C, Cardoso FMH, Planchon S, Barros DR, Renaut J, Ricardo CP (2015). Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Frontier Plant Science*, 6:1–16.

Ligabo SG, Gichuru EK, Kiplagat O e Gichimu B (2015). Status of Coffee Leaf Rust resistance on Kenyan commercial resistant cultivars. *Brazilian Journal of Microbiology*, 8, 655-662.

Mahé L, Combes MC, Várzea VMP, Guilhaumon C, Lashermes P (2008). Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Molecular Breeding*, 21:105–113.

Noronha-Wagner M, Bettencourt AJ (1967). Genetic study of resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. I. Identifi cation and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea*

*arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. Canadian Journal of Botany, 45(11), 2021-2031.

Pereira AA, Sakiyama NS, Zambolim L, Moura WM, Maciel-Zambolim E, Caixeta, ET (2005) Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust in the UFV/EPAMIG breeding program. In: Zambolim L et al (eds) Durable resistance to coffee leaf rust. UFV, Viçosa, Brasil, 137–185

Pestana K N, Capucho AS, Caixeta ET, DE Almeida DP, Zambolim EM, Cruz CD and Sakiyama NS. (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. Tree Genetics & Genomes, 11(4), 1-13.

Silva RA, Zambolim L, Castro ISL, Rodrigues HS, Cruz CD and Caixeta ET (2018). The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. Euphytica, 214(9), 153.

Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A e Várzea V (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. Molecular plant pathology, 18(8), 1039-1051.

Van der Vossen H, Bertrand B e Charrier A (2015). Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. Euphytica, 204(2), 243-256.

## **CAPÍTULO 1**

## **Identification of Receptor-Like Kinase (RLK) as a putative gene conferring resistance to *Hemileia vastatrix* in coffee**

### **ABSTRACT**

*Hemileia vastatrix* causes Coffee Leaf Rust (CLR), one of the most devastating diseases of *Coffea arabica*. Coffee, like other plants, has developed effective mechanisms to recognize and respond to infections caused by pathogens. Plant Resistance Gene Analogues (RGAs) have been identified in some plants as candidates for resistance gene (*R*) or membrane receptors that activate the *R* genes. The RGAs identified in different plants possess conserved domains and motifs that play specific roles against pathogens. Despite the importance of RGAs, in coffee plants, these genes and other molecular mechanisms of disease resistance are still unknown. In this study, candidate genes from coffee plants with the potential to be involved in resistance to *H. vastatrix* were sequenced and characterized. Sequencing was performed based on a BAC library of the coffee Híbrido de Timor (HdT) CIFC 832/2 and screened using a functional marker. Two RGAs, HdT\_LRR\_RLK1 and HdT\_LRR\_RLK2, containing the motif of LRR receptor-like kinase was identified and mapped in *C. canephora* and *C. arabica* genomes. These genes were also analyzed by RT-qPCR and had an expression peak at 24 hour after infection in the compatible and incompatible interactions of coffee-*H. vastatrix*, for HdT\_LRR\_RLK1 and HdT\_LRR\_RLK2, respectively. Primers developed to amplified the genes were used on a set of coffee clones bearing different rust resistance gene combinations. Based on theses data, we propose the HdT\_LRR\_RLK2 RGA as a novel *R* gene. These results are valuable for breeding programs aimed at developing CLR resistant cultivars, besides enabling a better understanding of the interactions between coffee and *H. vastatrix*.

## 1. INTRODUCTION

For many centuries, rust diseases have been a major threat to many crops, causing huge damages to the production on farms. In coffee (*Coffea arabica*), leaf rust (*Hemileia vastatrix*) is the most threatening disease worldwide (Silva et al. 2006; Zambolim 2016). This pathogen is present in almost all coffee regions worldwide, with its distribution occurring in the 19<sup>th</sup> century, and has devastated coffee cultivation in Sri Lanka causing severe economic damage. The cultivation and selection of resistant cultivars for different fungal races from various parts of the world has been successful (Silva et al. 2006; Del Grossi et al. 2013; Shigueoka et al. 2014; Pestana et al. 2015; Valencia et al. 2017; Alkimim et al. 2017), but due to the high adaptive potential of the pathogen, the emergence of new physiological rust and the corresponding ‘breakdown’ of resistance has been observed in many coffee cultivars (Várzea and Marques 2005; Gichuru et al. 2008; Capucho et al. 2012; Cressey 2013).

The pathogen, in general, employs several strategies to infect its host. One strategy is the secretion of effector proteins capable of suppressing the plant defense responses and allowing the colonization of host tissues. Plants, in response to the infection, have evolved an innate immune system constituted by two lines of defense that limit the proliferation of pathogens in their tissues. The PTI (immunity is triggered by PAMP (Pathogen-associated molecular patterns)) and ETI (Effector triggered immunity) (Boller and He 2009; Dodds and Rathjen 2010). PTI is mediated by a wide variety of PRRs (Pattern Recognition Receptors) some of which recognize PAMPs - fungal chitin and flagellin in bacteria (Li et al. 2015; Yu et al. 2017). PRRs are either surface-localized receptor-like kinases (RLKs) or receptor-like proteins (RLPs). RLKs comprise a ligand-binding ectodomain, transmembrane domain, and intracellular kinase domain, while RLPs contain both an ecto-ligand binding and transmembrane domain with only a short cytoplasmic domain that lacks the signaling intracellular kinase domain (Tor et al. 2009; Sanabria et al. 2010; Antolín-Llovera et al. 2012; Macho and Zipfel. 2014). The ETI is triggered by the recognition of virulence protein of the pathogen by the intracellular receptors containing the NB domain (nucleotide binding) and LRR (leucine rich repeat). This recognition fits the gene-to-gene theory (Flor 1971). According to this theory, a hypersensitivity reaction is the result of an incompatible interaction between the avirulence gene of the pathogen and the host-resistance gene, resulting in cell death localized at the site of penetration of the pathogen, production of reactive oxygen species (ROS), cell wall fortification, calcium and lignin accumulation, increased activity of enzymes, such as chalconase and peroxidases, accumulation of antimicrobial compounds and phytoalexins, induction of proteins related to pathogenesis (PR)

and the synthesis of secondary metabolites, such as the production of plant hormones: salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) ethylene (ET) (Dodds e Rathjen. 2010).

The interaction between coffee and *H. vastatrix* is explained by the gene-to-gene model, where the resistance of coffee plants is conditioned by at least nine dominant genes with main effects (S<sub>H</sub>1-S<sub>H</sub>9). S<sub>H</sub>1, S<sub>H</sub>2, S<sub>H</sub>4 and S<sub>H</sub>5 genes were identified in *C. arabica*, while S<sub>H</sub>6, S<sub>H</sub>7, S<sub>H</sub>8 and S<sub>H</sub>9 in *C. canephora*, and S<sub>H</sub>3 in *C. liberica* (Noronha-Wagner and Bettencourt 1967; Bettencourt and Noronha-Wagner 1971; Bettencourt, Noronha-Wagner and Lopes 1980; Bettencourt and Rodrigues 1988).

Barka (2017) cloned a novel gene (CC-NBS-LRR) from the Híbrido de Timor (HdT) CIFIC 832/2, which is different from the previously characterized S<sub>H</sub>1 to S<sub>H</sub>9 genes. Molecular characterization of the (CC-NBS-LRR) showed a conserved domain similar to the S<sub>H</sub>6 gene domain. The characterization of genes in HdT is important for coffee breeding programs, since this coffee is considered one of the most important sources of resistance to the main coffee diseases (Romero et al. 2014; Pestana et al. 2015).

In our study, a novel and important candidate gene was identified cloning was performed by screening a library of BAC clones (Bacterial Artificial Chromosomes) corresponding HdT CIFIC 832/2 (Cação et al. 2013), using a molecular marker HT24F133 that corresponds to LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase gene that was selected from a suppression subtractive hybridization (SSH) between compatible and incompatible *Coffee-H. vastatrix* interaction. (Barka et al. 2017)

Our results enable a better understanding of the resistance gene structure and will allow the use of accessions of HdT as promising parents in breeding programs. In addition to studying the modes of action, and signal transduction pathways mediated by RLKs in coffee plants, we should aim to decipher their conserved and specific roles in infections caused by *H. vastatrix*.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Screening of BACs**

A library of 56,832 BAC clones derived from one of the main resistance sources, HdT CIFIC 832/2 (Cação et al. 2013) was screening for molecular marker HT24F133 that corresponds to LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase NIK1/protein NSPinteractingkinase 1-like, which was found to be up-regulated in resistant coffee lines (Barka et al. 2017).

The BAC library was replicated in 384-well titration plates using a plate replicator sterilized in a laminar airflow hood. Old cultures were copied to a new 384-well titration plate with 70  $\mu$ l of fresh LB medium (containing 12.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> chloramphenicol) in each well. Multiplication of the cultures was done by incubating them at 37°C for 18 h on a shaker at 180 rpm. The plasmid DNA of the selected BAC library was screened using PCR with the molecular marker HT24F133. Clones were identified by grouping and subsequent group decomposition of the 384 clones until a single clone was identified. The plasmid DNA of the selected BAC clone 104-O-23 was extracted using a Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep DNA purification kit (Promega), and following the manufacturer's recommendations.

## 2.2. New generation sequencing of BAC clones and contig assembly

The DNA fragment isolated from BAC library was sequenced in an Illumina HiSeq2000/2500 100PE platform (paired-end run with 101 bases per read), applying multiplexed shotgun sequencing. DNA samples were prepared for sequencing using Illumina's Nextera<sup>®</sup> XT DNA sequencer at Macrogen (Seoul, South Korea). Sequences were processed and contig assembled using the software SPAdes (Bankevich et al. 2012).

The quality of each base of sequence were estimated by a quality score phred. Estimates the probability P of a base to be wrong and reports the corresponding quality score  $Q = -10 \log_{10} (P/(1-P))$ .

## 2.3. Prediction and annotation of genes

Gene prediction was performed using AUGUSTUS software, which provides a General Feature Format (GFF3) file containing information such as the position of genes, exons, introns, and transcripts for each gene (Stanke et al. 2004). Contigs longer than 500 bp were selected for gene prediction in AUGUSTUS software (Stanke et al. 2004). *Solanum lycopersicum* data was used as a reference genome because they share common gene repertoires and had similar genome sizes (Lin et al. 2005). The predicted ORFs (Open Reading Frame) were queried against BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Johnson et al. 2008) database to check for coding sequences (CDS) of *S. lycopersicum* (Sol Genomics Network: <https://solgenomics.net/tools/blast/>), *V. vinifera* (Phytozome11: <https://phytozome.jgi.doe.gov>), *C. canephora* (<http://coffee-genome.org/blast>) and *C. arabica* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). The detection of conserved domains were annotated in



PFAM proteins families (Finn et al 2013). The transmembrane domains of proteins were analyzed by TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

## 2.4. Gene expression analysis

Sequences of the identified genes were used to design primers. The primers were designed using GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design. (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>).

Expression analysis was performed for the identified genes HdT\_LRR\_RLK1 and HdT\_LRR\_RLK2 with primers P1 (F:TGCATCGGAGTGGGAGGATTT, R:TTTGGCCTCCTCAAGGCACA, 113 bp and  $T_m$ : 60°C) and primer P2 (F:GCTCACAGGTCCGATTCCTCTG, R:TTTGGGAATAGGCCCGGAAAGA, 94 bp and  $T_m$ : 60°C), respectively.

CaturraVermelho CIFC 19/1 was used as the susceptible coffee line and HdT CIFC 832/1 as the resistant line. The experiment was conducted in a growth chamber in a completely randomized design, with two biological replicates. One-year-old greenhouse-grown young plants of Caturra and HdT were challenged with the pathogen race XXXIII of *H. vastatrix* as proposed by Capucho et al. (2009). The samples were collected at 0, 12, 24 and 96 hours after inoculation (h.a.i).

For RNA extraction, the inoculated leaves were collected and macerated in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using 100mg of the macerated tissue with RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), and following the manufacturer recommendations. The RNA was quantified by Qubit RNA BR (Life Technologies) and NanoDrop<sup>TM</sup> spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis (1.5%) stained with ethidium bromide. The samples were stored in an ultra-freezer at -80°C, until use.

The cDNA was synthesized with 3µg of total RNA, pretreated with 1 µl of DNase for 15 min (50 U/µL, amplification grade DNase I, Invitrogen<sup>TM</sup>) to remove possible genomic DNA contamination. The first cDNA strand was synthesized using the ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription system protocol RT-PCR kit (Promega), according to the manufacturer's guidelines and subsequently stored at -20°C until use.

Real-time quantitative PCR was performed in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA). Reactions were in a final volume of 10µl with 50ng/µl of cDNA and 2µM of forward and reverse primers in 1x GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA). Reaction conditions were 95°C for 10min followed

by 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1min. The melting curve stage was set to default conditions.

The expression level of the genes was quantified by relating the threshold cycle (Ct) value to a standard curve resulting from three biological replicates and three technical replicates. For data normalization, we used two selected constitutive genes (UBQ10 e GAPDH) that have stable expression levels.

Statistical analyses were performed using Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA). All data are presented as mean  $\pm$  SEM, unless otherwise stated. The Student's *t*-test values at  $p < 0.05$  were considered significant.

## **2.5. PCR amplification in coffee clones**

For the purpose of characterization of the identified gene HdT\_LRR\_RLK2, a set of coffee clones bearing different resistance gene combinations was analyzed. These 27 differential coffee clones proposed by the Coffee Rusts Research Center (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro-CIFC, Portugal) have been used to characterize the physiological races of *H. vastatrix*. All clones were vegetatively propagated in the greenhouse at the Department of Plant Pathology, Universidade Federal de Viçosa.

Genomic DNA was extracted from young second pair of leaves following Diniz et al. (2005). DNA integrity was checked by subjecting to electrophoresis in 1% gel stained with ethidium bromide (0.5 $\mu$ g/ml) and Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and stored at -20°C until use.

PCR was optimized containing 50 ng genomic DNA, 0.1  $\mu$ M of primers forward and reverse of gene HdT\_LRR\_RLK2 0.15 mM of each dNTP (Promega), 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), and 1xPCR reaction buffer, to make up a final volume of 20  $\mu$ L reaction. DNA was amplified in two different thermocyclers (PTC-200, MJ Research, and Veriti, Applied Biosystems), programmed with initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 36 amplification cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 65°C for 30 sec; extension at 72°C for 1 min. A final extension of 72°C for 10 min was performed. The amplification products were visualized after electrophoresing in a 1.5% agarose gel.

## **3. RESULTS**

### **3.1. BAC clone identification, sequence assembly and gene prediction**

The BAC clone 104-O-23 (with ~120 kb insert) was identified using the HT24F133 marker (Barka et al. 2017) and sequenced. The reads were assembled as 145 contigs, with 44.1% GC and 55.9% AT. In the 145 contigs, 1484 ORFs were found. Ten contigs, with 37 ORFs were annotated using the *C. canephora* and *C.arabica* reference genomes (Table 1).

The contig 37 (16.570 bp), contig 51 (8.285 bp) and contig 65 (17.594 bp) appeared to be related to host defense to the pathogen. Contig\_37\_g339.t1, Contig\_65\_g153.t1 and Contig\_65\_g154.t1 had coverage greater than 50% homology with genes present in the genome of *C.canephora* and *C.arabica*, while Contig\_37\_g342.t1, Contig\_51\_g62.t1 and Contig\_65\_g153.t1 had coverage less than 50% only with *C. arabica* genes and not for *C. canephora*. Contig\_37\_g339.t1 and Contig\_37\_g342.t1 revealed the presence of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein (Table 2).

**Table 1.** Annotation of genes BAC in *C. canephora* and *C. arabica* genome

ORFs	Locus ID	Annotation in <i>C.canephora</i>	E-value	Query Coverage (%)	Annotation in <i>C.arabica</i>	Locus ID	E-value	Query Coverage (%)
Contig_32_g287.t1	Cc01_g18850	Putative uridine kinase C227.14	2e-46	29.38	Putative uridine kinase C227.14 isoform X4	NC_039899	8e-42	100
Contig_32_g288.t1	-----	-----			Putative uridine kinase C227.14 isoform X4	NC_039899	2e-108	99
Contig_32_g289.t1	Cc01_g18870	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit, Putative	8e-60	15.82	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NC_039899	4e-55	100
Contig_32_g289.t2	Cc01_g18860	Auxin-induced protein 22D	2e-74	11.93	Auxin-induced protein 22D-like	NC_039899	2e-98	99
Contig_32_g289.t3	Cc01_g18860	Auxin-induced protein 22D	1e-76	50.25	Auxin-induced protein 22D-like	NC_039899	2e-98	99
Contig_32_g290.t1	Cc01_g18880	Transcription factor UNE12	0.0	40.55	Transcription factor UNE12 isoform X2	NC_039899	0.0	100
Contig_32_g291.t1	Cc01_g18890	Histone acetyltransferase GCN5	0.0	27.09	Histone acetyltransferase GCN5, transcript variant X2	NC_039899	0.0	96
Contig_32_g292.t1	Cc06_g17020	Putative Receptor-like protein 12	3e-28	35.55	Histone acetyltransferase GCN5, transcript variant X2	NC_039899	0.0	99

Contig_32_g293.t1	Cc06_g15030	MuDR family transposase	4e-12	5.33	Deoxyhypusine hydroxylase-like	NC_039903	0.0	100
Contig_32_g294.t1	-----	-----	-----	-----	Histone acetyltransferase GCN5, transcript variant X2	NC_039899	0.0	100
Contig_36_g334.t1	Cc03_g09110	Hypothetical protein	2e-26	4.59	Uncharacterized protein LOC113696238	NC_039899	0.0	100
Contig_36_g335.t1	Cc01_g18920	Protein of unknown function (DUF506)	0.0	32.53	Uncharacterized protein LOC113715832	NC_039899	0.0	100
Contig_36_g336.t1	Cc11_g14620	Hypothetical protein	0.0	50.05	Uncharacterized protein LOC113715832	NC_039899	0.0	100
Contig_36_g337.t1	Cc01_g18940	Putative uncharacterized protein	1e-114	63.80	Beta-carotene isomerase D27, chloroplastic-like	NC_039898	4e-114	93
Contig_36_g338.t1	Cc00_g27210	Putative unknown protein	0.0	46.08	Protein LONGIFOLIA 1-like isoform X1	NC_039898	0.0	75
Contig_36_g338.t2	Cc00_g27210	Putative unknown protein	0.0	18.35	Protein LONGIFOLIA 1-like isoform X1	NC_039898	0.0	75
Contig_37_g339.t1	Cc01_g03450	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	0.0	96.28	Probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710	NC_039899	0.0	100
Contig_37_g340.t1		-----	-----	-----	Glycine-rich cell wall structural protein 1.8-like	NC_039913	5e-64	21
Contig_37_g341.t1	Cc03_g08290	-----	-----	-----	Agamous-like MADS-box protein AGL23	NC_039915	1e-113	11

Contig_37_g342.t1	Cc01_g03490	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	0.0	17.52	Probable leucine-rich repeat receptor-like protein Kinase At1g35710	NC_039899	0.0	99
Contig_48_g45.t1	-----	-----	-----	-----	UDP-galactose/UDP-glucose transporter 7-like isoform X2	NC_039913	0.0	86
Contig_48_g46.t1	Cc10_g10570	-----	-----	-----	UDP-galactose/UDP-glucose transporter 7-like isoform X2	NC_039913	0.0	100
Contig_50_g52.t1	Cc11_g11240	-----	-----	-----	UDP-galactose/UDP-glucose transporter 7-like isoform X2	NC_039913	8e-37	29
Contig_51_g62.t1	Cc10_g06400	Probable WRKY transcription factor 51	7e-97	28.94	probable WRKY transcription factor 51	NC_039917	9e-166	100
Contig_51_g63.t1	Cc10_g09400	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2e-16	1.88	Probable WRKY transcription factor 51	NC_039917	0.0	100
Contig_60_g133.t1	Cc07_g08800	Protein of unknown function DUF6	4e-108	21.09	Uncharacterized protein LOC113699174	NC_039910	1e-99	100
Contig_60_g134.t1	Cc07_g08790	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0.0	32.58	Uncharacterized protein LOC113699276 isoform X1	NC_039910	0.0	100
Contig_60_g135.t1	Cc07_g08780	Mannose-6-phosphate isomerase, type I	0.0	27.17	Mannose-6-phosphate isomerase 1-like	NC_039910	0.0	100

Contig_60_g136.t1	Cc07_g08770	Histone acetylation protein 2	4e-97	40.59	Elongator complex protein 5-like	NC_039910	5e-89	100
Contig_62_g143.t1	Cc00_g00930	_____	_____	_____	Calcium-dependent protein kinase 24-like	NC_039903	5e-143	100
Contig_62_g144.t1	Cc11_g01120	Hypothetical protein~ unknown_gene~ missing_functional	2e-50	24.49	Alcium-dependent protein kinase 24-like	NC_039903	0.0	64
Contig_62_g145.t1	Cc10_g10570	_____	_____	_____	Calcium-dependent protein kinase 24-like	NC_039903	0.0	95
Contig_64_g152.t1	Cc00_g08680	Meristematic receptor-like kinase	2e-27	2.96	Uncharacterized protein LOC113737498	NC_039903	0.0	96
Contig_64_g152.t2	Cc11_g05370	Putative late blight resistance protein homolog R1B-16	7e-70	4.08	Uncharacterized protein LOC113737498	NC_039903	0.0	88
Contig_65_g153.t1	Cc07_g04920	Trichome birefringence-like 19	0.0	100	Trichome birefringence-like 19	NC_039910	0.0	100
Contig_65_g154.t1	Cc07_g04930	Trichome birefringence-like 19	0.0	70.76	Trichome birefringence-like 19	NC_039911	0.0	100
Contig_65_g155.t1	Cc07_g04930	Trichome birefringence-like 19	0.0	12.91	Pentatricopeptide repeat- containing protein At1g62670, mitochondrial- like	NC_039911	0.0	99
Contig_65_g156.t1	-----	Hypotetic protein	_____	_____	Uncharacterized protein LOC113712687	NC_039916	0.0	97

**Table 2.** Position of genes of contig 37 BAC in *C. canephora*, *C.arabica*, *S. lycopersicum*, *V. vinifera* genomes.

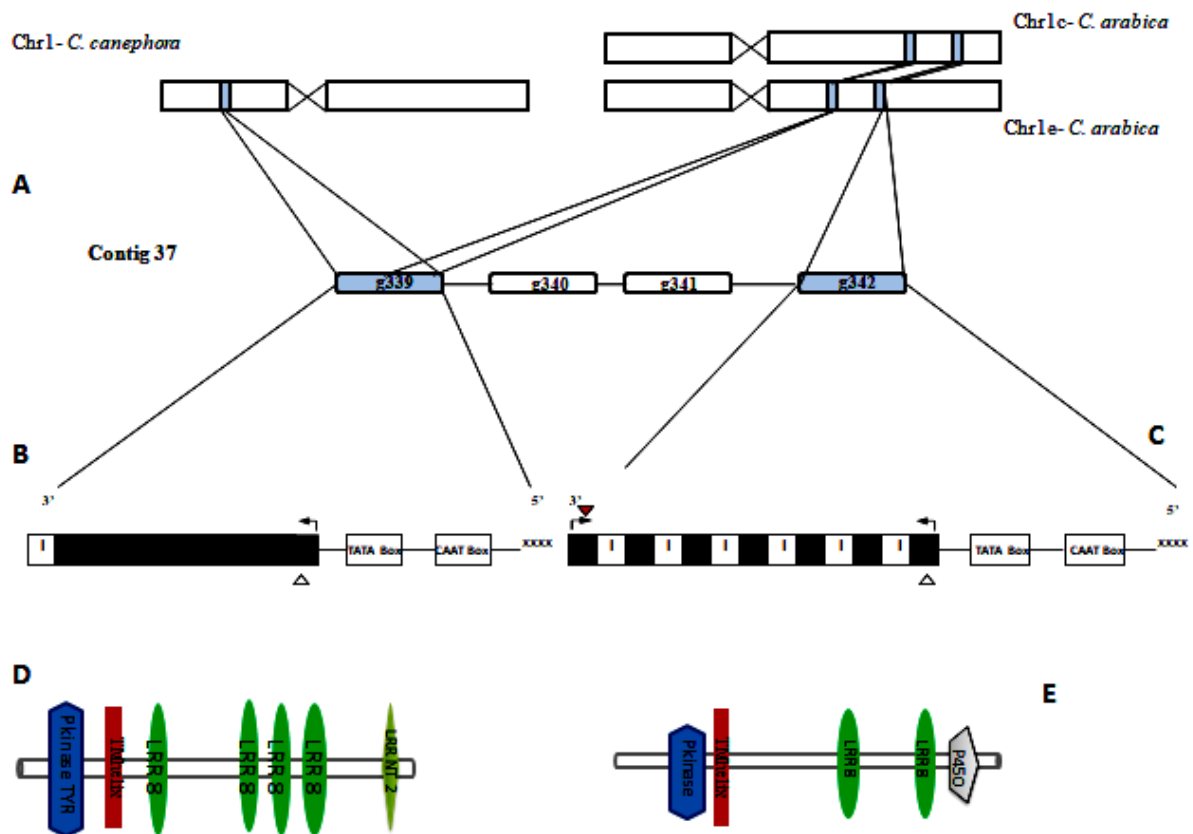
<i>C. canephora</i>						
Contig 37	Chr	Start	End	I (%)	E-value	Coverage
<b>g339.t1</b>	1	7.939.294	7.936.475	98.00	0.0	97.94
<b>g340.t1</b>	0	163.880.291	163.880.595	90.00	4e-111	10.53
<b>g341.t1</b>	1	7.943.782	7.944.010	93.00	5e-93	20.44
<b>g342.t1</b>	1	7.971.448	7.972.037	90.00	0.0	17.86
<i>C.arabica</i>						
Contig 37	Chr	Start	End	I	E-value	Coverage
<b>g339.t1</b>	Chr1e	6.699.099	6.701.921	98	0.0	100
	Chr1c	7.258.267	7.260.275	91	0.0	100
<b>g340.t1</b>	Chr8c	2.631.263	2.631.487	87	5e-64	21
<b>g341.t1</b>	Chr9e	29.984.070	29.984.372	91	1e-113	11
<b>g342.t1</b>	Chr1e	6.869.945	6.870.871	87	0.0	99
	Chr1c	7.106.697	7.107.226	92	0.0	98
<i>S. lycopersicum</i>						
Contig 37	Chr	Start	End	I	E-value	Coverage
<b>g339.t1</b>	4	58.665.113	58.665.502	64.53	1.30e-56	48.40
<b>g340.t1</b>	3	49.111.093	49.111.180	76.14	4.18e-07	8.40
<b>g341.t1</b>	10	42.361.059	42.361.184	74.60	1.12e-12	4.86
<b>g342.t1</b>	4	58.665.664	58.666.001	65.99	1.92e-10	11.52
<i>V. vinifera</i>						
	Chr	Start	End	I	E-value	Coverage
<b>g339.t1</b>	11	8.925.682	8.927.020	65.57	3.73e-67	47.51
<b>g340.t1</b>	16	9.757.759	9.757.810	86.54	7.06e-08	4.97
<b>g341.t1</b>	2	12.061.136	12.061.266	79.39	3.21e-23	5.05
<b>g342.t1</b>	11	8.740.730	8.741.291	70.00	4.51e-60	19.10
		8.926.691	8.927.252	70.00	4.51e-60	19.10



Contig 37 has four genes. The gene g339.t1 denominated in this work as HdT\_LRR\_RLK1 is homologous to sequences in *C. canephora* and *C. arabica* (coverage>50%) on chromosome 1, g340.t1 and g341.t1 have homology (coverage<50%) in *C. arabica*, *C. canephora*, *S. lycopersicum* and *V. vinifera* (Table 1). While the g342.t1 denominated as HdT\_LRR\_RLK2 is homologous to sequences in *C. arabica* on chromosome 1e and 1c (coverage>50%) (Figure 1A).

The structure of genes HdT\_LRR\_RLK1 and HdT\_LR\_RLK2 are represented in figure 1B and 1C respectively. This figure shows promoters regions, exons and introns. We can note that both genes are anti-sense (3'-5").

The protein domains in the genes were identified using PFAM software. HdT\_LRR\_RLK1 had four LRR domains, one Leucine Rich Repeat N Terminal (LRRNT) domain and Protein Tyrosine Kinases-Pkinase (TYR) domain (Figure 1D). HdT\_LRR\_RLK2 had two LRR domains, one cytochrome P450 and protein kinase-Pkinase domain (Figure 1E). These two genes have typical RLK domains, and in general contain an extracellular domain, a single transmembrane domain, and a cytoplasmic kinase domain. LRR kinases represent a large and functionally diverse family of transmembrane proteins critical for signal recognition and transduction at the plant cell plasma membrane (Huang et al 2018). The HdT\_LRR\_RLK1 and HdT\_LRR\_RLK2 identified in the BAC clone had protein transmembrane helices evident from the TMHMM analysis (Figures 1D and 1E).



**Figure 1. Structure and position of genes in reference coffee genomes.**

(A) Chromosome of *C. arabica* and *C. canephora* with regions matching the CDS of the gene

(B) structure of partial HdT\_LRR\_RLK1 showing the positions of CAAT BOX= 141 nucleotides, TATA BOX= 27 nucleotides downstream of the 5'UTR region= 2.939-2.941 nucleotides, TSS (transcription start site) = 2.997 nucleotides, Exon=122-2.997 nucleotides,  $\Delta$ = Start codon 2939-2941, Coding sequence (CDS)=122-2.941 nucleotides.

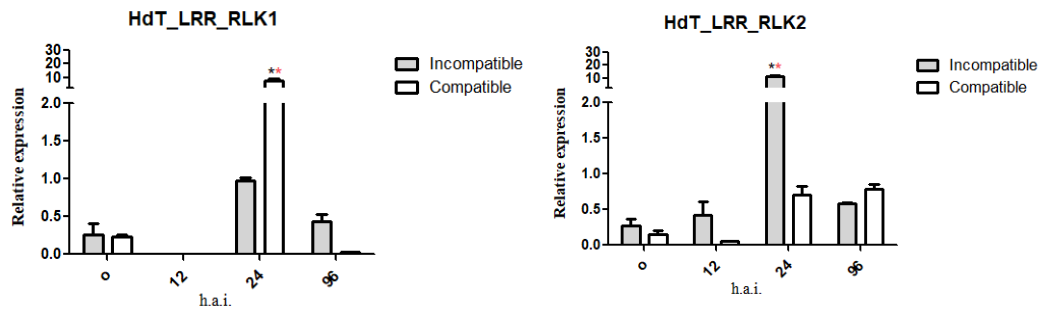
(C) structure of HdT\_LRR\_RLK2 showing the positions of CAT BOX= 193 nucleotides and TATA BOX= 29 nucleotides downstream of 5'UTR region= 35.189-35.191, TSS= 35.247,  $E_1$ = 34.897- 35.247,  $\Delta$  = Start codon 35189-35191,  $E_2$ = 33.812-33.913,  $E_3$ = 33.203- 33.565,  $E_4$ = 32.123-33.082,  $E_5$ = 31.419-31.986,  $E_6$ = 30.782-31.353,  $E_7$ = 30.250-30.586,  $\nabla$  = Stop codon 30462-30464, CDS= 30.462-30.586, CDS= 30.782-31.353, CDS=31.419-31.986, CDS= 32.123-33.082, CDS= 33.203-33.565, CDS= 33.812-33.913, CDS= 34.897-35.191, 3'UTR= 30.462-30.464, TTS= 30.250.

(D) HdT\_LRR\_RLK1 contains a N-terminal signal peptide domain (SP-LRRNT2, residues 43–83), four leucine rich repeat domains (LRR8, 111–170, 209–267, 279–339, 616–675) a transmembrane domain (TM, 750–770) and an intracellular kinase domain (Pkinase Tyr, 844–931).

(E) HdT\_LRR\_RLK2 contains a N-terminal signal peptide domain (P450, residues 88–151), two leucine rich repeat domains (LRR8, 144–204 and, 392–452) a transmembrane domain (TM, 738–760) and an intracellular kinase domain (Pkinase, 780–986).

### 3.2. Gene expression analysis

The genes HdT\_LRR\_RLK1 and HdT\_LRR\_RLK2 had differential expression in the compatible and incompatible Coffee-*H. vastatrix* interactions (Figure 2). The expression peak of the gene HdT\_LRR\_RLK1 was observed at 24 h.a.i in the compatible interaction. The expression of HdT\_LRR\_RLK2 was significantly higher at 24h.a.i in the incompatible interaction, as the appressorium and penetration hypha were differentiated. Based on these results, the gene HdT\_LRR\_RLK2 was considered to be a candidate resistance gene.



**Figure 2.** RT-qPCR quantification of two resistance-signaling genes at 0, 12, 24 and 96 h.a.i. in resistant (HDT CIFC- 832/1) and susceptible (Caturra 19/1) genotypes inoculated with *H. vastatrix* race XXXIII urediniospores. (\*) shows significant difference in expression levels at the same h.a.i. between interactions (\*) shows significantly up-or down-regulated relative to uninoculated samples (0 h.a.i.).

### 3.4. Gene HdT\_LRR\_RLK2 in differential coffee clones

The presence of the gene HdT\_LRR\_RLK2 in the differential coffee clones was analyzed using the primers P2. The marker was detected in nine differential coffee clones, CIFC 1343/269-HdT (S<sub>H6</sub>), H420/10 (S<sub>H5</sub>, S<sub>H6</sub>, S<sub>H7</sub>, S<sub>H9</sub>), H419/20 (S<sub>H5</sub>, S<sub>H6</sub>, S<sub>H9</sub>), CIFC 4106-HdT (S<sub>H5</sub>, S<sub>H6</sub>, S<sub>H7</sub>, S<sub>H8</sub>, S<sub>H9</sub>, S<sub>H?</sub>), 33/1- S.288-23 (S<sub>H3</sub>, S<sub>H5</sub>), 263/1- *C.congensis* Uganda (S<sub>H?</sub>), 1621/13- *C.congensis* Uganda (S<sub>H?</sub>), CIFC 832/1-HdT (S<sub>H6</sub>, S<sub>H7</sub>, S<sub>H8</sub>, S<sub>H9</sub>, S<sub>H?</sub>), CIFC 832/2-HdT (S<sub>H6</sub>, S<sub>H7</sub>, S<sub>H8</sub>, S<sub>H9</sub>, S<sub>H?</sub>) (Table 3). Based on the PCR amplicon gel analysis, we observed that the marker amplifies all coffee clones containing the S<sub>H6</sub> gene. However, the marker was also detected in CIFC 33/1, which is supposed to contain only S<sub>H3</sub> and S<sub>H5</sub> genes. HdT\_LRR\_RLK2 marker was also amplified in CIFC 263/1 and CIFC 1621/13 clones, which had resistance genes identified but not characterized (S<sub>H?</sub>). These results clarify that the gene has no relationship to previously identified S<sub>H</sub> in a set of differential coffee clones.

**Table 3.** Screening for gene HdT\_LRR\_RLK2 marker in 27 differential coffee clones used for S<sub>H</sub> Gene characterization and three susceptible coffee genotypes.

	*Differential clone	Susceptible to ( <i>H. vastatrix</i> physiological race)	**S <sub>H</sub> gene	HdT_LRR_RLK2
1	HW 17/12	XVI,XXIII, XXXVIII	1,2,4,5	-
2	1343/269-HdT	XXII,XXV,XXVI,XXVII,XXVIII,XXIX,XXXI,XXXII,,XXXVII,XXXIX,XL	6	+
3	H153/2	XII, XVI	1,3,5	-
4	H420/10	XXIX, XXXVII, XXXIX	5,6,7,9	+
5	110/5	X,XIV,XV,XVI,XXIII,XXIV,XXVI,XXVIII, XXXV, XXXVI, XXXVIII, XXXIX	4,5	-
6	128/2	III, X, XII, XVI, XVII, XIX, XXIII, XXVII, XXXVIII, XL	1	-
7	134/4-S 12	X, XVI, XIX, XXIII, XXVII, XXXVIII	1,4	-
8	H419/20	XXIX, XXXI, XXXVII, XXXIX	5,6,9	+
9	635/3	X, XVI, XXIII, XXXVIII	1,4	-
10	87/1	III, X, XII, XVI, XVII, XXIII, XXXVIII, XL	1,5	-
11	1006/10- HP 532	XII,XVI,XVII, XXIII, XXXVIII, XL	1,2,5	-
12	7963/117	XXXIII	5,7 or 5,7,9	-
13	H420/2	XXIX, XXX, XXXVI, XXXVIII, XLI, XLII	5,8	-
14	4106-HdT	-	5,6,7,8, 9,?	+
15	644/18	XIII	5, ?	-
16	H147/1	XIV, XVI	2,3,4,5	-
17	32/1	I, VIII, XII, XIV, XVI, XVII, XXIII, XXIV, XXV, XXVIII, XXXI, XXXIV, XXXV, XXXVI, XXXVII, XXXVIII, XXXIX, XL, XLI, XLII	2,5	-
18	H152/3	XIV, XVI, XXIII, XXIV, XXVII, XXXV, XXXVI, XXXVIII, XXXIX	2,4,5	-
19	33/1-	VII, VIII, XII, XIV, XVI	3,5	+
20	849/1	-	?	-
21	635/2	-	4	-
22	263/1	-	?	+
23	681/7	-	?	-
24	1621/13	-	?	+
25	829/1	-	?	-
26	832/1	-	6,7,8, 9,?	+
27	832/2	-	6,7,8,9, ?	+
28	19/1	All	5	-

<b>29</b>	2148-57	All	5	-
<b>30</b>	376/4	All	5	-

\*Differential clones obtained by CIFC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Portugal). \*\*S<sub>H</sub>1-9 genes as inferred by CIFC (Noronha-Wagner, M., Bettencourt 1967; Bettencourt, A.J., Noronha-Wagner 1971; Bettencourt, A.J., Noronha-Wagner, M & Lopes 1980; Bettencourt, A.J., Rodrigues 1988). Unknown race (-), coffee genotypes used as negative control (c), presence/absence of gene band (+/-) and unknown S<sub>H</sub> gene (s) (?).

#### 4. DISCUSSION

Knowledge of genes resistant to *Hemileia vastatrix* in coffee was gained based on several genetic studies and inferences according to the gene-for-gene theory (Flor 1971, Noronha-Wagner, M. Bettencourt 1967; Bettencourt, A.J. Noronha-Wagner 1971; Bettencourt, A.J. Noronha-Wagner, M e Lopes 1980; Bettencourt, A.J. Rodrigues 1988), and lacking molecular characterization of such genes. From all the identified resistance genes, only S<sub>H</sub>3 (Prakash et al. 2004; Mahé et al. 2007; Ribas et al. 2011) and (CC-NBS-LRR) (Barka 2017) were characterized at the molecular level. In our study, a novel S<sub>H</sub> gene candidate was cloned, characterized (gene HdT\_LRR\_RLK2), and analyzed in differential coffee clones (Table 2).

The cloned genes, similar to the another cloned coffee resistance gene, CC-NBS-LRR (Barka 2017), probably share some domains with the S<sub>H</sub>6 gene, because all the clones containing S<sub>H</sub>6 were amplified by HdT\_LRR\_RLK2 marker. However, the cloned gene is not S<sub>H</sub>6 given that its marker was also identified in CIFC 33/1 (S<sub>H</sub>3, S<sub>H</sub>5). The marker amplification was not detected in other genotypes that have S<sub>H</sub>3 and S<sub>H</sub>5 genes as in CIFC H153/2 (S<sub>H</sub>1, S<sub>H</sub>3, S<sub>H</sub>5); CIFC 110/5-S4 (S<sub>H</sub>4, S<sub>H</sub>5); CIFC 87/1 (S<sub>H</sub>1, S<sub>H</sub>5); CIFC 87/1-Geisha (S<sub>H</sub>1, S<sub>H</sub> 5); CIFC 1006/10 (S<sub>H</sub>1, S<sub>H</sub>2, S<sub>H</sub>5); CIFC 7963/117 (S<sub>H</sub>5, S<sub>H</sub>7); CIFC H420/2 (S<sub>H</sub>5, S<sub>H</sub>8); CIFC H147/1 (S<sub>H</sub>2, S<sub>H</sub>3, S<sub>H</sub>4, S<sub>H</sub>5); CIFC 32/1 (S<sub>H</sub>2, S<sub>H</sub>5) and CIFC H152/3 (S<sub>H</sub>2, S<sub>H</sub>4, S<sub>H</sub>5). The comparative study based on the amplification of (CC-NBS-LRR) by (Barka 2017) and HdT\_LRR\_RLK2 genes reveal that these two cloned genes are different. Also, they vary based on the sequence and the differential presence/absence in coffee clones. CIFC 128/2 and CIFC 644/18 had the (CC-NBS-LRR) marker, but not the HdT\_LRR\_RLK2 maker. In contrast, CIFC 33/1 had the HdT\_LRR\_RLK2 maker but not the (CC-NBS-LRR) marker. All these results allow us to conclude that the cloned gene is indeed novel.

The HdT\_LRR\_RLK1 gene was expressed at 24 h.a.i in the susceptible genotype, while the HdT\_LRR\_RLK2 gene was expressed at 24 h.a.i in the resistant genotype. At 24 h.a.i, *H. vastatrix* infection of coffee leaf involves the formation of the appressoria, after which the fungus penetrates through the stomata, forming a penetration hypha that grows and enters the substomatal chamber (Freitas et al. 2014; Talhinhos et al. 2017). Freitas et al.(2014) used the same pathosystem, Híbrido de Timor CIFC 832/1 (resistant) and Caturra CIFC 19/1

(susceptible), and they found that at 24 h.a.i, in both the susceptible and resistant leaves, the urediniospores had high germination (75%), differentiation of the appressoria in the stomata (50%) and hypha at the penetration stage (70%). Based on cytological observations they concluded that the resistance of HdT 832/1 to race XXXIII of *H. vastatrix* is pre-haustorial. Diniz et al. (2012) reported that the rapid resistance response preventing the formation of haustoria may be the basis for the extended durability of the resistance by HDT832 to *H. vastatrix* races. In our study, we showed that HdT\_LRR\_RLK2 expression peaked in the resistant coffee lines at 24 h.a.i, suggesting that it can be a putative resistance gene of coffee plant to *H. vastatrix*.

The gene HdT\_LRR\_RLK2 has domains typical of plant receptor-like kinases (RLKs). RLKs are the major components of PRR complexes that comprise a superfamily of transmembrane proteins, many of which function in pathogen detection as PRRs (Tang et al. 2017). Plants have evolved various defense mechanisms to combat diseases. The plant's innate immune system mainly consists of two interconnected branches termed PAMP-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) (Jones et al. 2006; Cui et al. 2015; Boutrot et al. 2017).

The genes LRR\_RLK contributes to basal immunity to adapted pathogens and also for non-host resistance to non-adapted pathogens through the induction of both local and systemic immune responses with broad-spectrum and potentially durable disease resistance (Freddy and Cyril 2017; Ranf 2018; Hu et al. 2018). The RLKs, in addition to the NLR-triggered immunity, may also be associated with the plant hypersensitive response (HR), a programmed cell-death (Ricci et al. 1989; Taguchi et al. 2003). Therefore, these genes besides conferring partial disease resistance; also confers complete resistance in a manner similar to the classical gene-for-gene relationship of disease resistance (Chen et al. 2006; Catanzariti et al. 2015).

Based on the candidate resistant gene identified, a functional molecular marker was developed that can be efficiently used for marker-assisted selection of resistant seedlings in coffee breeding programs. Together with other resistance genes, the HdT\_LRR\_RLK2 marker can be used for pyramiding genes in new coffee cultivars with the goal of accomplishing durable resistance to *H. vastatrix* infection.

## 5. REFERENCES

Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV et al (2017). Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Molecular Breeding*, 37:6.

Alvarenga SM, Caixeta ET, Hufnagel B, Thiebaut F, Zambolim-Maciel E, Zambolim L, Sakiyama NS (2011). Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(8), 890 – 898.

Antolín-Llovera M, Ried MK, Binder A, Parniske M (2012). Receptor Kinase Signaling Pathways in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review Phytopathology*, 50:451–473.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Computers in Biology and Medicine*, 19:455–477.

Barka GD, Caixeta ET, de Almeida RF et al (2017). Differential expression of molecular rust resistance components have distinctive profiles in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. *European Journal of Plant Pathology*, 149:543–561.

Barka (2017). Identification, molecular characterization and differential expression studies of genes activated during *Coffea arabica* L.-*Hemileia vastatrix* interactions Berk. & Broome. Universidade Federal de Viçosa. Tese.

Bettencourt AJ, Noronha-Wagner, M e Lopes J (1980). Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix*. et Br. *Broteria Genética*, XIII 1:53–58.

Bettencourt AJ, Noronha-Wagner M (1971). Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk & Br. *Agronomy Lusitana*, 31:285–292.

Bettencourt AJ, Rodrigues CJJ (1988). Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. *Coffee Agronomy*, 4:199–234.

Boller T, He SY (2009). Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*, (80) 324:742–744.

Boutrot F, Zipfel C (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 55:257–286.

Cação SMB, Silva NV, Domingues DS et al (2013). Construction and characterization of a BAC library from the *Coffea arabica* genotype Timor Hybrid CIFC 832/2. *Genetica* 141, 217–226.

Capucho A, Caixeta E, Maciel-Zambolim, E, Zambolim L (2009). Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44:276 – 282.

Capucho AS, Zambolim EM, Freitas RL et al (2012). Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australas Plant Dis Notes*, 7:189–191.

Catanzariti A-M, Lim GTT, Jones DA (2015). The tomato I-3 gene: a novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. *New Phytology*, 207:106–118.

Chen X, Shang J, Chen D et al (2006). A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant Journal*, 46:794–804.

Cressey D (2013). Coffee rust regains foothold: researchers marshal technology in bid to thwart fungal outbreak in Central America. *Nature*, 493:587.

Cui H, Tsuda K, Parker JE (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol.* 66:487–511.

Del Grossi L, Sera T, Sera GH et al (2013). Rust resistance in Arabic Coffee cultivars in northern Paraná. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56:27–33.



Diniz LEC, Sakiyama NS, Lashermes P, Caixeta ET, Oliveira ACB, Maciel—Zambolim E, Loureiro M.E, Pereira AA, Zambolim L (2005). Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progênies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5. 387-393.

Diniz I, Talhinhos P, Azinheira HG et al (2012). Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. *European Journal of Plant Pathology*, 133:141–157.

Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11:539–548.

Flor H (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol. Annual Review Phytopathology*, 9:275–296.

Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R... and Sonnhammer, E. L. (2013). Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research*, 42(D1), D222-D230.

Freitas RL, Zambolim E, Silva MC et al (2014). Cytological evaluation of the infection process of *Hemileia vastatrix* (race XXXIII) in resistant and susceptible coffee. *Proc 25th Int Conference coffee Science*, 42–46.

Freddy B, Cyril Z (2017). Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu Review Phytopathology*, 55:1–11.

Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC et al (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease ( *Colletotrichum kahawae* ) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology*, 57:1117–1124.

Hu P, Liu J, Xu J et al (2018) A malectin-like/leucine-rich repeat receptor protein kinase gene, RLK-V , regulates powdery mildew resistance in wheat. *Molecular Plant Pathology*, 19:2561–2574.

Jones JD, Dangl JL (2006). The plant immune system. *Nature*. 444:323–329.

Li B, Jiang S, Yu X et al (2015). Phosphorylation of Trihelix Transcriptional Repressor ASR3 by MAP kinase 4 Negatively Regulates Arabidopsis Immunity. *Plant Cell*, 27:839–856.

Lin C, Mueller LA, Carthy JM, et al (2005). Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:114–130.

Macho AP, Zipfel C (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell*, 54:263–272.

Mahé L, Combes M-C, Várzea VMP, et al (2007). Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Molecular Breeding*, 21:105–113.

Noronha-Wagner, M., Bettencourt AJ (1967). Genetics study of resistance of coffeea spp. to leaf rust. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal Botany*, 45:2021–2031.

Pestana KN, Capucho AS, Caixeta ET et al (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree Genetic Genomes*, 11.

Prakash NS, Marques D V, Varzea VMP et al (2004). Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1311–7.

Ranf S (2018). Pattern Recognition Receptors—Versatile Genetic Tools for Engineering Broad-Spectrum Disease Resistance in Crops, *Agronomy* 8:134.

Ribas AF, Cenci A, Combes M-C et al (2011). Organization and molecular evolution of a disease-resistance gene cluster in coffee trees. *BMC Genomics*, 12:240.

Ricci P, Bonnet P, Huet J-C et al (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic

fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal Biochemical*, 183:555–563.

Romero G, Vásquez LM, Lashermes P, Herrera JC (2014). Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). *Plant Breeding*, 133:121–129.

Sanabria NM, Huang J-C, Dubery IA (2010). Self/non-self perception in plants in innate immunity and defense. *Self Nonsself*, 1:40–54.

Shigueoka LH, Sera GH, Sera T, et al (2014). Seleção de progênies de café arábica com resistência à ferrugem alaranjada. *Crop Breeding Applied Biotechnology*, 14:88–93.

Silva M do C, Várzea V, Guerra-Guimarães L, et al (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 18:119–147.

Stanke M, Steinkamp R, Waack S, Morgenstern B (2004). AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 32:W309–W312.

Taguchi F, Shimizu R, Nakajima R, et al (2003). Differential effects of flagellins from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, tomato and glycinea on plant defense response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41:165–174.

Talhinhas P, Batista D, Diniz I, et al (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molular Plant Pathology*, 18:1039–1051.

Tang D, Wang G, Zhou J-M (2017). Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *Plant Cell*, 29:618–637.

Tor M, Lotze MT, Holton N (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany*, 60:3645–3654.

Valencia A, Morales AY, del Pilar Moncada MI, Cortina HA and Herrera JC (2017). Introgression of the SH3 gene resistant to rust (*Hemileia vastatrix*) in improved lines of CASTILLO® variety (*Coffea arabica* L.). *Journal Plant Breeding and Crop Science*, 9:130–

138.

Várzea VMP, Marques DV (2005) Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. *Coffea* durable resistance. In: Durable resistance to coffee leaf rust, 53–74.

Yu X, Feng B, He P, Shan L (2017) From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review Phytopathology*, 55:109–137.

Zambolim L (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41:1–8.

## **CAPÍTULO 2**

**Seleção de cafeeiros resistentes a *Hemileia vastatrix* e CBD por marcadores SCAR, CAPS, SSR, CARF005, HdT\_LRR\_RLK2, CBD-Sat207 e CBD-Sat235**

**RESUMO**

As perdas de rendimento como resultado de estresses bióticos pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. é um desafio na cafeicultura mundial. O desenvolvimento de cultivares resistentes é considerado uma abordagem eficiente e sustentável para mitigar a redução do rendimento do cafeeiro. Uma potencial estratégia é uso de marcadores associados a locos/QTLs de resistência ou mesmo marcadores funcionais na seleção assistida em programas de melhoramento. Com isso convertermos marcadores AFLPs flanqueando dois locos de resistência do cafeeiro à raça I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* em marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) e CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Site*) e avaliamos a eficiência do uso desses marcadores e de um microsatélite previamente identificado, na Seleção Assistida por Marcadores (SAM). Para isso, uma combinação de *primers* AFLPs foi amplificada e seus fragmentos clonados e sequenciados e o marcador SCAR transformado em CAPS. Esses dois marcadores foram validados no genitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03; no genitor suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) e em 247 indivíduos da população F<sub>2</sub> de mapeamento. Para a realização da SAM esses marcadores e dois previamente identificados foram genotipados em indivíduos das populações F<sub>3</sub> e de retrocruzamentos suscetíveis e avaliadas a eficiência em relação à fenotipagem com a raça II. Os marcadores SCAR, CAPS e SSR mostraram eficiência próxima e superior a 90%. Um indivíduo de cada população de melhoramento foi selecionado com base em seu genótipo para avanço de geração F<sub>3;4</sub> e RCS<sub>3</sub>. Nas populações F<sub>3;4</sub> e RCS<sub>3</sub> para seleção de indivíduos para geração F<sub>4;5</sub> e RCS<sub>4</sub> foram usados esses marcadores, além do marcador funcional originado de outro gene clonado (CC-NBS-LRR) e o marcador para o gene putativo (HdT\_LRR\_RLK2) alocados em outras regiões do mapa genético. Nesse trabalho, também foram usados os marcadores *CBD-Sat207* e *CBD-Sat235* associados ao gene *Ck1* de resistência a *Coffee Berry Disease* (CBD). Essa doença se encontra presente somente no continente africano, no entanto, o uso dos marcadores permite realizar melhoramento preventivo para essa importante doença. A utilização desses marcadores permitiu selecionar indivíduos F<sub>3;4</sub> com genótipo AABBC\_D\_EE e no RCS<sub>3</sub>, genótipo AaBbC\_D\_Ee, sendo que o loco A, B, C e D correspondem aos quatro locos de resistência a *H. vastatrix* e E ao loco de resistência a CBD. Logo, neste estudo, descrevemos o desenvolvimento de linhas de cafeeiros elite com genes que conferem resistência múltipla a

diferentes raças de *H. vastatrix* e a CBD, por meio do uso da SAM. A SAM possibilita um avanço nos programas de melhoramento com a seleção precoce de indivíduos e também uma posterior clonagem posicional de genes ligados à resistência a essa doença.

## 1. INTRODUÇÃO

A seleção assistida por marcadores e a piramidação gênica são estratégias nos programas de melhoramento muito importantes para conferir amplo espectro e resistência durável contra doenças que causam perda de rendimento no café. Uma dessas doenças que causam grandes retrocessos na produção de café em especial em *Coffea arabica* é a ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*

O uso de fungicidas é o método mais empregado para o controle da doença, porém, sua aplicação deve ser feita de forma racional para não inviabilizar a cultura e não agredir o meio ambiente (Zambolim, 2016). Assim, o uso de cultivares resistentes tem se mostrado o método mais indicado para o controle da doença.

Na busca por cultivares resistentes, já foram identificadas algumas fontes de resistência para a ferrugem. Nelas foram caracterizados, até o momento, pelo menos nove genes dominantes presentes em cafeeiros de diferentes espécies (Noronha-Wagner M, Bettencourt AJ. 1967; Bettencourt AJ e Noronha-Wagner. 1971, Bettencourt AJ e Noronha-Wagner, M e Lopes.1980; Bettencourt, AJ, Rodrigues. 1988). Os genes S<sub>H</sub>1, S<sub>H</sub>2, S<sub>H</sub>4 e S<sub>H</sub>5 foram encontrados em *C. arabica*, os S<sub>H</sub>6, S<sub>H</sub>7, S<sub>H</sub>8 e S<sub>H</sub>9 em *C. canephora* e S<sub>H</sub>3 em *C. liberica*. Além desses genes, outros podem ser caracterizados. Barka (2017) identificaram o gene (CC-NBS-LRR). E no capítulo 1 deste trabalho também é relatado um novo gene de resistência a *H. vastatrix* (*receptor like kinase*) chamado HdT\_LRR\_RLK2. A resistência conferida por esses genes ainda não foi suplantada no Brasil, visto que são genes S<sub>H</sub> presentes no acesso 832/2 de Híbrido de Timor (HdT).

Nos programas de melhoramento, uma das estratégias é a introgressão de genes de resistência em cafeeiros que possuam outras características de interesse agrônômico. A transferência de alelos de resistência para o cafeeiro pode ser facilitada pelo uso de marcadores moleculares que estejam localizados próximos aos genes de resistência. O mapeamento genético é uma ferramenta eficaz para a realização de estudos avançados de genética, permitindo o entendimento da herança, a identificação e o isolamento de genes ou locos de interesse muito úteis para a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de interesse econômico e que podem ser usados na Seleção Assistida por Marcadores (SAM) (Yuan et al. 2015; Moncada et al. 2016; Gardiner et al. 2017; Sapkota et al. 2019).

No trabalho desenvolvido por Pestana et al. (2015) foi apresentado um mapa genético de ligação para *C. arabica*, composto por 111 marcadores (RAPD, AFLP, SSR), distribuídos em 12 grupos de ligação, cobrindo 976,8 cM do genoma. Neste mapa, foram identificadas duas regiões nos grupos de ligações 2 e 10 que correspondem a dois locos associados à resistência do cafeeiro ao patótipo 001 e às raças I e II de *H. vastatrix*. Portanto, a identificação desses dois locos por meio de marcadores moleculares permitirá a introgressão de alelos desses locos em cultivares de interesse nos programas de melhoramento, que visam à obtenção de cafeeiro com resistência durável a *H. vastatrix*. No entanto, os marcadores associados e que flanqueiam essas regiões responsáveis pela resistência, no mapa de ligação, são do tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*), com exceção de um único marcador microssatélite. Marcadores AFLP, por serem dominantes, laboriosos e de difícil avaliação, não são adequados para uso em grandes populações como na SAM em populações de melhoramento genético (Lopes et al. 2002). Para superar este problema, é desejável converter os marcadores AFLP em marcadores loco-específico baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tais como CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Site*) e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) (Diola et al. 2011; Moncada et al. 2016; Zhang et al. 2017).

Existem poucos marcadores moleculares disponíveis para seleção de plantas resistentes à ferrugem do cafeeiro. O uso desses marcadores durante o avanço de geração em programas de melhoramento é de grande importância para maior eficiência no processo de seleção e descarte de plantas que não possuem os genes de resistência ou são heterozigotas para determinado loco. Portanto, o objetivo deste trabalho foi converter mais dois marcadores AFLP em SCAR e CAPS presentes no GL5 do mapa genético construído por Pestana et al. (2015) e avaliar sua eficiência em conjunto com os marcadores CaRHv8 e SSR16 presentes no GL2 (Almeida, 2015) em populações F<sub>3</sub> e RCS<sub>2</sub> oriundas dos cruzamentos dos parentais usados no mapa genético. Posteriormente avaliar esses marcadores em conjunto com dois marcadores associados à CBD (Gichuru et al. 2008) e dois marcadores RGAs (CARF005 e HdT\_LRR\_RLK2) em populações F<sub>3:4</sub> e RCS<sub>3</sub>.

Logo, o desenvolvimento de marcadores SCAR e CAPS a partir de AFLP ligados aos locos de resistência à ferrugem do cafeeiro e seu uso juntamente com um marcador SSR e outros marcadores ligados a resistência tanto a ferrugem quanto a outras doenças do cafeeiro são de suma importância na SAM.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal e extração de DNA

O Híbrido de Timor UFV 443-03 foi utilizado como genitor masculino e resistente no cruzamento controlado com a cultivar suscetível Catuaí Amarelo IAC 64. Uma planta de geração F<sub>1</sub>, registrada como H511-1, foi submetida à autofecundação para obter a geração F<sub>2</sub> segregante (Pestana et al. 2015). Para avaliar a eficiência dos marcadores na SAM, duas plantas F<sub>2</sub> resistentes à ferrugem do cafeeiro (plantas 15 e 35) foram autofecundadas sob condições controladas, gerando duas populações F<sub>3</sub>. Duas populações do segundo retrocruzamento suscetível também foram obtidas cruzando-se as plantas resistentes de RCS1 (plantas 47 e 108) com a cultivar suscetível Catuaí Amarelo IAC 64. Assim, as seguintes populações foram obtidas: F<sub>3</sub>-C15 (da planta 15), com 25 indivíduos; F<sub>3</sub>-C35 (da planta 35), com 36 indivíduos; RCS<sub>2</sub>-C47 (da planta 47), com 93 indivíduos; e RCS<sub>2</sub>-C108 (da planta 108), com 54 indivíduos. Os cruzamentos foram realizados no Campo de Seleção de Híbridos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil (Almeida, 2015). Nesse trabalho, uma planta da população F<sub>3</sub>-C15 foi autofecundada e originou uma população F<sub>3;4</sub> constituída por 48 indivíduos e uma planta RCS<sub>2</sub>-C108 foi retrocruzada com o Catuaí Amarelo IAC 64 e originou uma população RCS<sub>3</sub> constituída por 25 indivíduos, essas plantas foram selecionadas com base nas avaliações fenotípicas e genótípicas para o avanço de geração.

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens, totalmente desenvolvidas, das populações parentais e dos indivíduos das populações de melhoramento, seguindo a metodologia descrita por Diniz et al. (2005). A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose (1%) e quantificada em espectrofotômetro Thermo Scientific Nano Drop 2000. Amostras de DNA foram padronizadas a 25 ng / µL e armazenadas a -20°C até a análise.

### 2.2. Desenvolvimento de marcadores SCAR e CAPS

Amostras de DNA do Híbrido de Timor UFV 443-03 e Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) foram amplificadas com quatro combinações de primers AFLP que geraram bandas ligadas a locos de resistência a *H. vastatrix* (Pestana et al. 2015). As combinações de AFLP utilizadas foram E-CTG / MAAT1, E-CTT / MTGC3 (LG2) (Almeida, 2015) e E-CGT / MATC2, E-CCC / MAGA1 (LG5). Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% corado com prata.

Bandas polimórficas mapeadas próximas aos locos de interesse foram cortadas dos géis de poliacrilamida usando o protocolo descrito por (Caetano-Anollés et al. 1996). O produto amplificado foi clonado no vector pGEMT-easy (Promega). A transformação de

células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi conduzida como descrito por (Sambrook et al. 1989).

O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído com o kit de sistema de purificação de DNA Wizard® Plus SV Minipreps (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi sequenciado utilizando o Analisador Genético ABI 3130xl (Applied Biosystems) no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (Biocafé), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (Bioagro) da UFV. As sequências de baixa qualidade foram removidas e as sequências de consenso foram obtidas usando o software Sequencer 4.10.1 (Gene Codes Corporation-USA). As sequências dos vetores e adaptadores utilizados na clonagem foram identificados no software VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>) e então editadas manualmente (Microsoft Word), restando apenas no DNA sequências correspondentes a café. A partir desta sequência, os primers forward e reverse foram projetados, utilizando o software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

### **2.3. Marcadores de validação e mapeamento**

A validação inicial do marcador SCAR e CAPS foi realizada por sua localização no mapa de ligação. Assim, os marcadores foram analisados em população de mapeamento, que correspondeu a 247 indivíduos F<sub>2</sub> do cruzamento entre o progenitor resistente Híbrido de Timor UFV 443-03 e o genitor suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57). A PCR foi otimizada para reação contendo 50 ng de DNA genômico, 0,1  $\mu$ M de cada iniciador, 0,15 mM de cada dNTP (Promega), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 U de DNA polimerase Taq (Invitrogen), e 1X de PCR, alcançando um volume final de 20  $\mu$ L. O DNA foi amplificado em termocicladores (PTC-200 - MJ Research e Veriti - Applied Biosystems), programado com desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por 32 ciclos de amplificação de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 65°C durante 30 s; extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. O produto foi visualizado em gel de agarose a 1,5%. O CaRHv10 foi clivado com a enzima de restrição RsaI (Thermos Life), seguindo a recomendação do fabricante, gerando o marcador CAPS denominado CaRHv10\_CAP.

Os marcadores CBD-Sat207 e CBD-Sat235 (Gichuru et al. 2008), que estão ligados a genes de resistência à *Coffee Berry Disease* (CBD) e marcadores RGAs (CARF005 e HdT\_LRR\_RLK2), também foram genotipados na população de mapeamento F<sub>2</sub>.

Após a genotipagem do SCAR, CAPS, CARF005, HdT\_LRR\_RLK2, CBD-Sat207 e CBD-Sat235 na população F<sub>2</sub>, os dados foram codificados e analisados no software GENES

(Cruz, 2013). Os grupos de ligação foram formados e ordenados usando uma pontuação LOD mínima de 3,0 e um valor máximo de recombinação de 30%. As frequências estimadas de recombinação foram convertidas em distância genética (centiMorgans - cM). Para o mapeamento de QTL, as análises estatísticas foram realizadas conforme descrito por Lander & Botstein (1989) no software GENES (Cruz, 2013). O método do intervalo simples foi utilizado com a análise de regressão. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) correspondeu ao pico de significância do QTL, utilizando um escore LOD maior que 3,0.

#### **2.4. Análises da Eficácia dos marcadores SCAR, CAPS e SSR na SAM**

Com a finalidade de testar a eficiência de seleção (ES) dos marcadores SCAR e CAPS desenvolvidos e do SSR na SAM, foi comparada a eficiência da genotipagem com a fenotipagem (resistência/suscetibilidade) nos cafeeiros com base na fórmula:

$$ES = - \left\{ \left[ \frac{(\sum \text{plantas Resistentes sem a marca}) + (\sum \text{plantas Suscetíveis com a marca})}{\text{n}^\circ \text{ total de plantas}} \right] \times 100 \right\} + 100.$$

Foram analisadas plantas da população  $F_3$  e dos  $RCS_2$ , provenientes do cruzamento da fonte de resistência Híbrido de Timor UFV443-03 e da cultivar suscetível Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV2148-57). Além disso, foi realizada análise de qui-quadrado para se verificar a segregação fenotípica.

#### **2.5. Seleção de plantas $F_3$ e $RCS_2$ para avanço de geração com base em marcadores moleculares**

Comprovada a eficiência dos marcadores SCAR, CAPS e SSR para uso na seleção assistida, plantas  $F_3$  que apresentaram genótipo AAB<sub>-</sub> e plantas de  $RCS_2$  com o genótipo AaBb e resistência a raça II de *H. vastatrix*, foram utilizadas para obter as populações  $F_{3;4}$  e  $RCS_3$ . Além das marcas para esses marcadores, essas plantas também apresentaram a marca para CBD (Gichuru et al. 2008) e para o gene (CC-NBS-LRR) Barka (2017) por meio da utilização do marcador CARF005 (Alvarenga et al. 2011), e o HdT\_LRR\_RLK2 (*receptor like kinase*), desenvolvido nesse trabalho.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Desenvolvimento e mapeamento de marcadores moleculares**

Desenvolver cultivares de café com resistência duradoura à ferrugem é o maior desafio dos programas de melhoramento. Entretanto, esses cultivares são fundamentais para a cafeicultura mundial. Marcadores moleculares ligados a QTL que conferem resistência a doenças foram identificados nos últimos anos. Por exemplo, o estudo de Pestana et al. (2015) identificaram marcadores AFLPs vinculados a QTL de resistência às raças I, II e patotipo 001.

No entanto, poucos estudos abordaram a seleção assistida de marcadores moleculares na identificação de cafeeiros resistentes à ferrugem (Prakash et al., 2011; Alkimim et al., 2017). Os marcadores AFLP, por serem dominantes, trabalhosos e difíceis de avaliar, não são adequados para seleção assistida (Lopes et al. 2002).

No presente trabalho, quatro fragmentos correspondendo aos marcadores AFLP mais próximos flanqueando os dois locos de resistência (Pestana et al. 2015) foram clonados e sequenciados. Os iniciadores SCAR e CAPS foram desenhados com base nas sequências de DNA (Tabela 1).

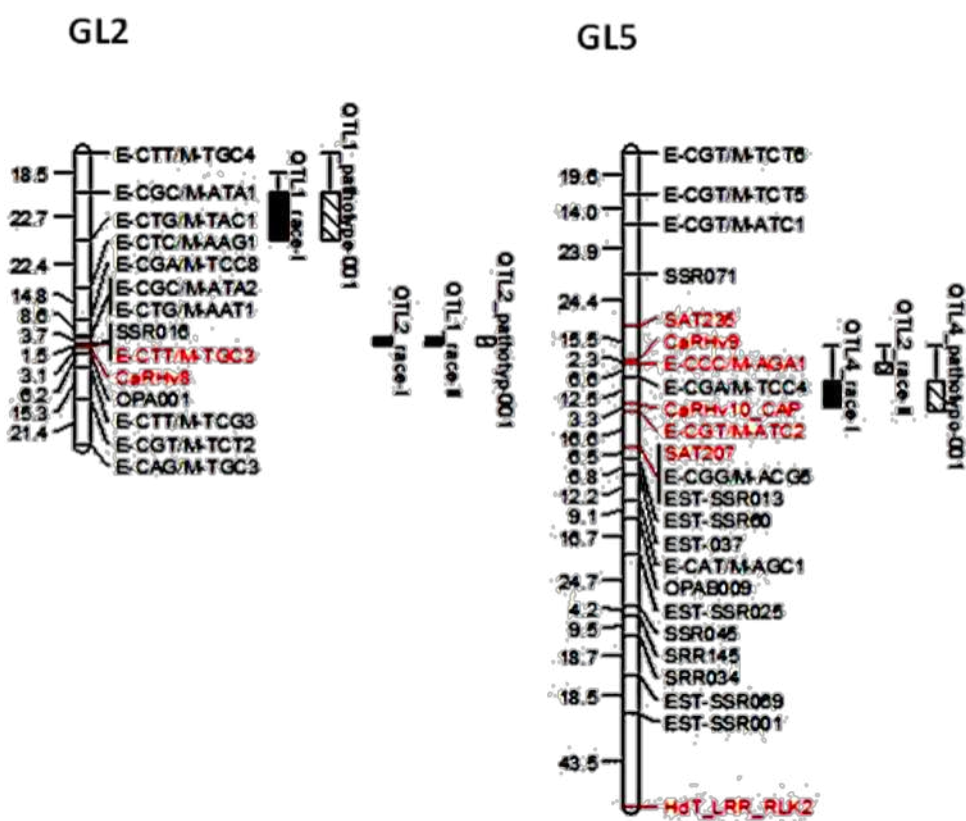
**Tabela 1.** Primers AFLPS e seus respectivos SCAR e CAPS ligados a locos de resistência a *H.vastatrix*.

	Marcador AFLP			
	E-CTG/MAAT1	E-CTT/MTGC3	E-CCC/MAGA1	E-CGT/MATC2
<b>GL<sup>a</sup></b>	2	2	5	5
<b>Ligação<sup>b</sup></b>	Acoplado	Repulsão	Acoplado	Acoplado
<b>TamanhoAFLP (pb)<sup>c</sup></b>	670	600	220	545
<b>SCAR</b>	CaRHv7 <sup>1</sup>	CaRHv8 <sup>1</sup>	CaRHv9	CaRHv10_CAP
<b>TamanhoSCAR (pb)</b>	108	272	161	340
<b>Tipo de marcador</b>	SCAR	SCAR	SCAR	CAPS
<b>Forward primer</b>	GAACGATTGAGGATGCCAAG	ACCTTCTAGTGTACCGAGGA	TGATGAAGAAGAGCGCATAGC	GACACATCGTGAACGTGGAG
<b>Reverse primer</b>	TGTCAAAGTGGTACGGAGGA	TCTTAGCGCCATGAATAGCCA	GTCTAAGACCAGAATCAGATGG	CAGCTGAACAACCGAACTCA
<b>Tm (°C)</b>	65	65	65	65

<sup>a</sup>GL–Grupo de ligação do mapa genetic de ligação (Pestana et al. 2015)<sup>b</sup>Ligação do marcador ao loco de resstência, acoplado = ligado ao alelo de resistência; repulsão = ligado ao alelo suscetível; <sup>c</sup>Tamanho do fragemento amplificado pelo marcador AFLP; <sup>d</sup>Tamanho do fragment amplificado pelo marcador SCAR e CAPS.

<sup>1</sup>Marcadores desenvolvidos por Almeida (2015).

Os marcadores CaRHv7 e CaRHv8 foram previamente desenvolvidos por Almeida (2015) e os marcadores CaRHv9 e CaRHv10 transformados em CAPS nesse trabalho e incorporados ao mapa de ligação de café previamente construído por Pestana et al (2015). O mapeamento desses marcadores e dois outros marcadores moleculares ligados ao gene de resistência a CBD uniram dois grupos de ligação, GL10 e GL5, do mapa. O mapa original (Pestana et al. 2015) consistia de 12 GL e com nossos marcadores adicionais, o novo mapa era composto por 11 GL, o número básico de cromossomos *Coffea* ( $x = 11$ ). Além desses marcadores foi feito o mapeamento dos marcadores CARF005 e HdT\_LRR\_RLK2, sendo que o CARF005 não se alocou em nenhum GL do mapa genético de ligação, enquanto que o marcador HdT\_LRR\_RLK2 foi alocado no GL5. (Figura 1).



**Figura 1.** GL2 e GL5 do mapa genético. GL2 = Grupo de ligação 2 do mapa de ligação para *C. arabica* contendo o marcador CaRHv8 (vermelho). GL5 = Grupo de ligação 5 do mapa de ligação para *C. arabica* contendo os marcadores CaRHv9 e CaRHv10\_CAP, CBD-Sat207, CBD-Sat235 e HdT\_LRR\_RLK2 (vermelho). Os nomes dos marcadores moleculares são indicados à direita da barra e as distâncias em cM são mostradas à esquerda da barra.

O marcador CaRHv8 foi mapeado a 3 cM em GL2, mantendo a mesma ordem de ligação do AFLP E-CTT / M-TGC3, que originou. O CaRHv9 foi mapeado a 2,3 cM do AFLP E-CGT / M-ATC2 originado, enquanto o CaRHv10\_CAP foi mapeado a 3,3 cM do

AFLP ECGT / MATC2, em GL5. O marcador E-CGA/M-TCC4, previamente ligado ao QTL4, foi substituído pelo marcador CaRHv9, que está ligado a 1,01 cM a QTL4 (Tabela 2).

**Table 2.** Marcadores moleculares associados à QTL de resistência a ferrugem do cafeeiro, identificado por intervalo simples e análise de regressão (LOD > 3).

	GL <sup>a</sup>	Marcador/QTL <sup>b</sup>	Posição (cM)	LOD <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> (%) <sup>d</sup>
<b>Raça I</b>					
QTL1	2	ECGC/MATA1	22.7	5.156	13.3
QTL2	2	ECTG/MAAT1	3.01	4.941	15.5
QTL3	3	EST-SSR050	13.01	3.127	7.4
QTL4	5	CaRHv9	1.01	5.678	15,3
<b>Raça II</b>					
QTL1	2	ECTG/MAAT1	3.7	3.147	5,8
QTL2	5	CaRHv9	2.3	4.153	7,6
<b>Patótipo 001</b>					
QTL1	2	ECTG/MAAT1	2.01	9.704	15.8
QTL2	2	ECGC/MATA1	18.01	8.071	9
QTL3	3	EST-SSR050	12.01	4.229	5.6
QTL4	5	CaRHv9	1.01	9.202	10.1

<sup>a</sup> Grupo de Ligação

<sup>b</sup> Marcadores associados a QTLs de resistência as raças I, II e patótipo 001

<sup>c</sup> Base logaritmica 10

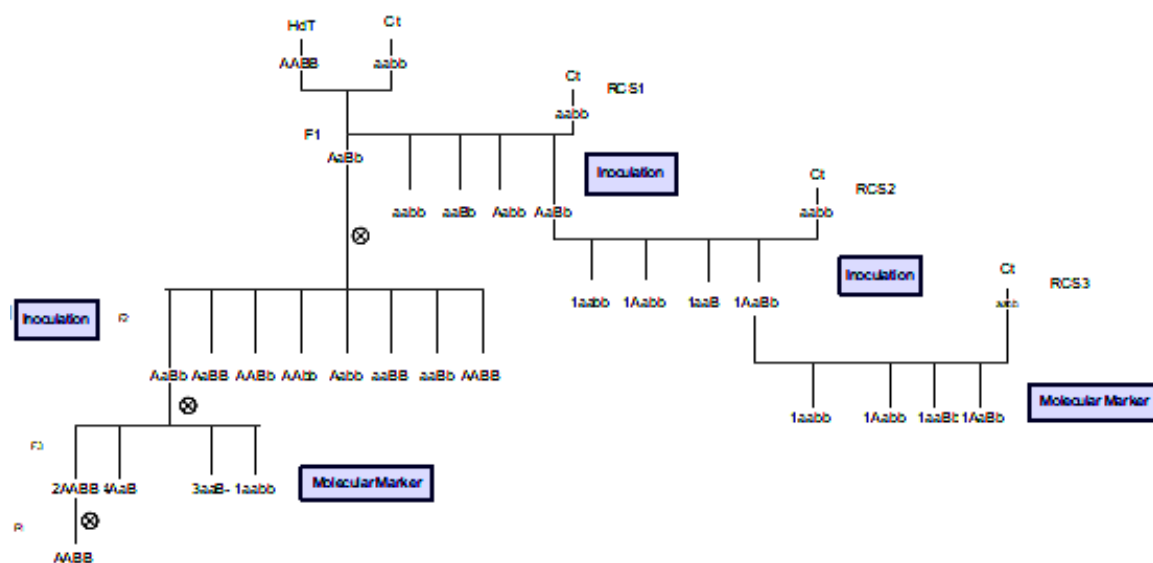
<sup>d</sup> Coeficiente de determinação, que corresponde à porcentagem de variação fenotípica explicada pelo QTL

Os marcadores CBD-Sat207 e CBD-Sat235 também foram localizados no locus de resistência à ferrugem do GL5. Eles se ligaram ao CaRHv9 e CaRHv10\_CAP, flanqueando o locus (Figura 1). Assim, esta região de resistência está localizada dentro de um segmento de 56,8 cM. Mesmo o CARF005 não ter se alocado a algum grupo de ligação e o HdT\_LRR\_RLK2 ter ficado distante do locus de resistência as raças I, II e patótipo 001, esses

marcadores podem ser utilizados para posterior seleção de cultivares com resistência a *Hemileia vastatrix*.

### 3.2. Eficiência dos marcadores SCAR, CAPS e SSR na SAM em populações F<sub>3</sub> e RCS<sub>2</sub>

Para testar a eficiência dos marcadores SCAR, CAPS e SSR, duas populações F<sub>3</sub> e duas de RCS<sub>2</sub> foram analisadas usando dados genotípicos e inoculação de raça II de *H. vastatrix* por Almeida (2015). Para obtenção dessas populações, plantas resistentes das gerações F<sub>2</sub> e de RCS<sub>1</sub> foram selecionadas com base em dados fenotípicos para o avanço de geração; portanto, seus genótipos não eram conhecidos. A resistência dos cafeeiros à raça II de *H. vastatrix* é conferida por dois locos dominantes independentes (Pestana et al. 2015). Para fazer as análises de segregação, todos os possíveis genótipos dos indivíduos resistentes na geração F<sub>2</sub> e na geração de RCS<sub>1</sub> foram considerados como uma planta selecionada para obter a população da geração seguinte. Possíveis indivíduos resistentes, com suas respectivas progênes (Figura 2).



**Figura 2.** Genótipos dos genitores Híbrido de Timor UFV 443-03 (HT) e Catuaí Amarelo IAC 64 - UFV 2148-57 (Ct) e suas progênes. Somente indivíduos resistentes F<sub>2</sub> foram representados correspondente às plantas resistentes selecionadas para formar a população F<sub>3</sub> e F<sub>3,4</sub> em estudo (à esquerda). Genótipos prováveis do retrocruzamento de indivíduos resistentes à F<sub>1</sub> com o genitor suscetível Ct = Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148-57) para formar a população de RCS<sub>2</sub> e RCS<sub>3</sub> em estudo (à direita).

Os marcadores CaRHv8, CaRHv9, CaRHv10\_CAP e SSR16 foram usados para selecionar indivíduos em quatro populações, RCS<sub>2</sub>- C47, RCS<sub>2</sub>- C108, F<sub>3</sub>-C15 e F<sub>3</sub>-C35 (Almeida, 2015) (Tabela 3), correspondentes à planta selecionada na geração anterior. Os



marcadores CaRHv8 e SSR16, pertencentes ao GL2, representam o loco A de resistência. O CaRHv8 se comporta como um marcador dominante e está ligado em repulsão; marca o alelo a. Portanto, indivíduos com aa e Aa são identificados na população. O SSR16, por ser codominante, identifica indivíduos AA, Aa e aa em populações reprodutivas. Os marcadores CaRHv9 e CaRHv10\_CAP, pertencentes ao GL5, representam o loco B da resistência, e se comportam como dominante e em fase de acoplamento.

A fenotipagem com a raça II de *H. vastatrix* revelou que todos os indivíduos da população F<sub>3</sub>-C15 eram resistentes, os marcadores mostraram eficiência de seleção de 100% em relação à fenotipagem. Na população F<sub>3</sub>-C35, a segregação foi 15R: 1S, com 9,18% de probabilidade e eficiência de seleção de 97,3%; na população RCS<sub>2</sub>-C108, a segregação foi 12R:4S, com 18,69% de probabilidade e eficiência de seleção de 93,6 %; na população RCS<sub>2</sub>-C47, a segregação foi 12R:4S, com 9,25% de probabilidade a nível de significância de 5%. Os marcadores mostraram alta eficiência de seleção nas populações de melhoramento (Tabela 3).

Tabela 3. Observação da segregação dos marcadores e a fenotipagem em populações F<sub>3</sub> e RCS<sub>2</sub>

Pop <sup>a</sup>	SSR16	CaRHv8	CaRHv9	CaRHv10_CAP	Gen <sup>b</sup>	Fen <sup>c</sup>	Segr	P (%)	ES <sup>d</sup>
	<b>Loco A (GL2)</b>		<b>Loco B (GL5)</b>						
	Aa	_a	bb	bb	Aabb	R			
<b>RCS<sub>2</sub></b>	Aa	_a	B_	B_	AaB_	R	12R:4S	9.25	89.0
<b>C47</b>	aa	_a	B_	B_	aaB_	R			
	aa	_a	bb	bb	Aabb	S			
	Aa	_a	bb	bb	Aabb	R			
	Aa	_a	B_	B_	AaB_	R			
<b>RCS<sub>2</sub></b>	aa	_a	B_	B_	aaB_	R	12R:4S	18.69	93.6
<b>C108</b>	aa	_a	bb	bb	Aabb	S			
	AA	AA	B_	B_	AAB_	R			
	AA	AA	bb	bb	AAbb	R			
<b>F<sub>3</sub></b>	Aa	_a	B_	B_	AaB_	R	16R		100
<b>C15</b>	Aa	_a	bb	bb	Aabb	R			
	aa	_a	B_	B_	aaB_	R			
	AA	AA	B_	B_	AAB_	R			
	AA	AA	bb	bb	AAbb	R			
<b>F<sub>3</sub></b>	Aa	_a	B_	B_	AaB_	R	15R:1S	9.18	97.3
<b>C35</b>	Aa	_a	bb	bb	Aabb	R			
	aa	_a	B_	B_	aaB_	R			
	aa	_a	bb	bb	Aabb	S			

<sup>a</sup>Populações de melhoramento do cafeeiro.

<sup>b</sup>Genótipos dos indivíduos pertencentes as populações de melhoramento.

<sup>c</sup>Fenótipos dos indivíduos pertencentes as populações de melhoramento.

<sup>d</sup>Eficiência de seleção dos marcadores em populações de melhoramento.

Inferimos os genótipos dos indivíduos 15, 35, 108 e 47, em relação aos dois locos, que originaram as populações F<sub>3</sub>-C15, F<sub>3</sub>-C35, RCS<sub>2</sub>-C108, e RCS<sub>2</sub>-C47, respectivamente. A segregação esperada foi comparada com os resultados de genotipagem e fenotipagem (Tabela 3). Tanto a genotipagem quanto a fenotipagem da população F<sub>3</sub>-C15 mostraram apenas indivíduos resistentes. Como a segregação ocorreu para os dois locos, concluiu-se que o tamanho da amostra não foi suficiente para obter todos os genótipos. Isso ocorreu, possivelmente por o tamanho amostral não ter sido suficiente para revelar todas as segregações esperadas. No entanto, sete indivíduos do AAB\_ foram selecionados para o avanço da geração.

Os resultados indicam que o indivíduo 35 selecionado em F<sub>2</sub> tem genótipo AaBb. Portanto, na geração F<sub>3</sub> foi possível realizar seleção direcionada por marcadores, plantas de genótipo AAB\_ foram selecionadas para a próxima geração. A Tabela 3 sugere que o genótipo dos indivíduos 47 e 108 dos RCS<sub>1</sub>, que originaram os RCS<sub>2</sub>, possuem o genótipo AaBb. Plantas AaBb das populações RCS<sub>2</sub>-C47 e RCS<sub>2</sub>-C108, respectivamente, foram selecionadas para o próximo retrocruzamento (Figura 2).

### **3.3. Plantas F<sub>3:4</sub> e RCS<sub>3</sub> com locos A,B, C e D de resistência a ferrugem e loco E de resistência a CBD**

Após a confirmação da alta eficiência dos marcadores para selecionar indivíduos resistentes nas populações F<sub>3</sub> e RCS<sub>2</sub>, foi autofecundada uma planta da população F<sub>3</sub>-C15 com genótipo AAB\_ para obtenção de 48 plantas constituindo a população F<sub>3:4</sub> e retrocruzada uma planta da população RCS<sub>2</sub>-108 com o genitor recorrente suscetível para obtenção da população de RCS<sub>3</sub> com 25 plantas.

Devido à rápida emergência e disseminação de novas raças virulentas de *H. vastatrix* (Mayne et al. 1932; Mayne et al. 1942; Várzea et al. 2005; Talhinhos et al. 2017), a resistência na maioria das cultivares lançadas como resistentes a essa doença foram suplantados dentro de alguns anos em diversas partes do mundo (McCook e Vandermeer, 2015; Avelino e Records, 2018). Portanto, é necessário identificar gene (s) *R* de amplo espectro com a finalidade de aumentar a durabilidade e evitar a “quebra da resistência”. E uso desses genes na piramidação gênica no auxílio nas abordagens convencionais de melhoramento genético, como seleção assistida por marcadores moleculares. Com isso plantas das populações F<sub>3:4</sub> e RCS<sub>3</sub> foram genotipadas com marcadores associados a diferentes locos de resistência tanto para ferrugem quanto para CBD. Os marcadores CaRHv8 e SSR16 (Loco A), marcadores CaRHv9 e CaRHv10\_CAP (Loco B) que conferem resistência as raças I, II e patótipo 001. O

os marcadores CARF005 (Loco C) e HdT\_LRR\_RLK2 (Loco D) de resistência a *H. vastatrix*. Os marcadores CBD-Sat207 e CBD-Sat235 (Loco E) de resistência a *Coffee Berry Disease* (CBD)

Ao analisar as 48 plantas da população F<sub>3:4</sub> com os marcadores para o Loco A, todas as plantas apresentaram genótipo AA; enquanto que para o loco B, todas apresentaram genótipo BB (Figura 3). Para o loco C, todas as plantas possuem genótipo CC enquanto que para o loco D, houve plantas com genótipos D<sub>-</sub> e dd, com segregação 15D<sub>-</sub>: 1dd, mostrando que a planta F<sub>3</sub> está em heterozigose para o loco D, ao avaliar o Loco E, de 48 plantas, em oito plantas pode-se observar recombinação para o marcador CBD-Sat207, as 40 plantas restantes possuem genótipo EE. Essa recombinação se deve ao fato de que o marcador CBD-Sat207 está localizado uma distância estimada de 17,2 cM do gene *Ck1*. (Gichuru et al. 2008). Isto demonstra a importância de se usar marcadores moleculares que flanqueiam os genes de resistência para evitar o erro de seleção. (Mandoulakani et al. 2015; Kolekar et al. 2016; Agarwal et al. 2018). Logo, para formar população F<sub>4:5</sub> deve-se escolher plantas com genótipo AABCCD\_EE.

Ao analisar as 25 plantas da população RCS<sub>3</sub> para o loco A, houve segregação esperada de 1Aa:1aa, uma planta apresentou genótipo AA, provavelmente oriunda de autofecundação. Para o loco B, só foi observado os genótipos B<sub>-</sub> ou bb, mas não obteve a segregação esperada de 1B<sub>-</sub>:1bb, provavelmente devido ao tamanho amostral (Figura 3). Para o loco C obteve segregação 3C<sub>-</sub>: 1cc. Para o loco D houve indivíduos 3D<sub>-</sub>:1dd. Para os locos C e D, há duas hipóteses: o tamanho amostral não foi suficiente para observar a segregação esperada 1:1, ou o loco C e D está em heterozigose no genitor recorrente. Para o loco E, houve uma recombinação entre os dois marcadores CBD-Sat207 e CBD-Sat235, sendo observado os genótipos Ee ou ee. Assim, deve-se selecionar plantas com genótipo AaBbC<sub>-</sub>D<sub>-</sub>Ee para se obter população RCS<sub>4</sub>.

O melhoramento e desenvolvimento de cultivares resistentes portando os principais genes de resistência (*R*) é uma estratégia mais eficaz e econômica para controlar a ferrugem do cafeeiro, mantendo um efeito neutro sobre o meio ambiente. A resistência qualitativa, que confere maior resistência específica ao gene contra algumas raças de patógenos é a mais fácil de incorporar em programas de melhoramento. No entanto, geralmente não é durável devido às rápidas mudanças na virulência do patógeno ou do biótipo da população (Santana et al. 2018; Silva et al. 2018). Portanto, se torna muito importante o acúmulo de genes importantes de resistência a doenças em plantas cultivadas para aumentar a durabilidade de resistência (Pilet-Nayel et al. 2017; Das et al. 2018; Horgan et al. 2018).

## 6. REFERÊNCIAS

Agarwal G, Clevenger J, Pandey MK, Wang H, Shasidhar Y, Chu Y, and Huang G (2018). High- density genetic map using whole- genome resequencing for fine mapping and candidate gene discovery for disease resistance in peanut. *Plant biotechnology journal*, 16(11), 1954-1967.

Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV, Pereira AA, de Oliveira ACB, Zambolim L and Sakiyama NS (2017). Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Molecular Breeding*, 37(1), 6.

Almeida DP (2015). Desenvolvimento e utilização de marcadores moleculares para seleção de cafeeiros resistentes a ferrugem. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação.

Alvarenga SM, Caixeta ET, Hufnagel B, Thiebaut F, Zambolim-Maciel E, Zambolim L, Sakiyama NS (2011). Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(8), 890 – 898.

Avelino J and Records A (2018). Coffee leaf rust: A persistent threat to the livelihoods of the people who produce your morning cup. Boston : APS, 1 p. International Congress of Plant Pathology, Boston, États-Unis, 29 July 2018/3 August 2018.

Barka GD (2017). Identification, molecular characterization and differential expression studies of genes activated during *Coffea arabica* L.-*Hemileia vastatrix* interactions Berk. & Broome. Universidade Federal de Viçosa. Tese.

Bettencourt AJ, Noronha-Wagner M (1971) Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk & Br. *Agronomia Lusitana*, 31:285–292.

Bettencourt AJ, Noronha-Wagner M e Lopes J (1980). Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Broteria Genética* XIII,v.1, n.LXXVI, 53-58.

Bettencourt AJ, Rodrigues CJ Jr (1988). Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. *Coffee Agronomy*, 4, 199–234.

Caetano-Anollés G, Trigiano RN (1996). Recovery of DNA Amplification Products from Silver-Stained polyacrylamide Gels. *Methods in Molecular Biology*. In White BA, PCR Cloning Protocols-From Molecular Cloning to Genetic Engineering, Humana Press, Totowa, 67, 111-127.

Cruz CD (2013). Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35(3), 271-276.

Das G, Rao GJ, Varier M, Prakash A, e Prasad D (2018). Improved Tapaswini having four BB resistance genes pyramided with six genes/QTLs, resistance/tolerance to biotic and abiotic stresses in rice. *Scientific reports*, 8(1), 2413.

Diola V, de Brito GG, Caixeta ET, Maciel-Zambolim E, Sakiyama NS, Loureiro ME (2011). High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. *Tree Genet Genomes*, 7: 1199–1208.

Diniz LEC, Sakiyama NS, Lashermes P, Caixeta ET, Oliveira ACB, Maciel—Zambolim E, Loureiro M.E, Pereira AA, Zambolim L (2005). Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progênies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5. 387-393.

Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC, Mutitu EW, Ngugi ECK, Bertrand B and Lashermes P (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology*, 57(6), 1117–1124.

Gardiner DM, Benfield AH, Stiller J, Stephen S, Aitken K, Liu C, & Kazan K (2018). A high- resolution genetic map of the cereal crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum* provides a near- complete genome assembly. *Molecular plant pathology*, 19(1), 217-226.

Horgan FG, Bernal CC, Vu Q, Almazan MLP, Ramal AF, Yasui H, e Fujita D (2018). Virulence adaptation in a rice leafhopper: Exposure to ineffective genes compromises pyramided resistance. *Crop Protection*, 113, 40-47.

Kolekar RM, Sujay V, Shirasawa K, Sukruth M, Khedikar YP, Gowda MVC and Bhat RS (2016). QTL mapping for late leaf spot and rust resistance using an improved genetic map and extensive phenotypic data on a recombinant inbred line population in peanut (*Arachis hypogaea L.*). *Euphytica*, 209(1), 147-156.

Lopes R, Lopes MTG, Figueira AVDO, Camargo LEA, Fungaro MHP, Carneiro M.S and Vieira MLC (2002). Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 5(29), 56-60.

Mayne WW (1936). 'Annual reports of the coffee scientific officer 1930-35', Mysore Coffee Experimental Station Bulletin, 13.

Mayne WW (1942). Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* B. et Br. *Nature*, 1932; 129 : 510.

Mandoulakani BA, Yaniv E, Kalendar R, Raats D, Bariana HS, Bihamta MR and Schulman AH (2015). Development of IRAP-and REMAP-derived SCAR markers for marker-assisted selection of the stripe rust resistance gene Yr15 derived from wild emmer wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(2), 211-219.

McCook S, e Vandermeer J (2015). The big rust and the red queen: long-term perspectives on coffee rust research. *Phytopathology*, 105(9), 1164-1173.

Moncada MDP, Tovar E, Montoya JC, González A, Spindel J and McCouch S (2016). A genetic linkage map of coffee (*Coffea arabica L.*) and QTL for yield, plant height, and bean size. *Tree genetics & genomes*, 12(1), 5.

Noronha-Wagner M and Bettencourt AJ (1967) Genetics study of resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal of Botany*, 45: 2021–2031.

Pestana KN, Capucho AS, Caixeta ET, de Almeida DP, Zambolim EM, Cruz CD, ... and Sakiyama NS (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree genetics & genomes*, 11(4), 72.

Prakash NS, Muniswamy B, Hanumantha BT, Sreenath HL, Kumar D, Suresh N, ... and Bhat SS (2011). Marker assisted selection and breeding for leaf rust resistance in coffee (*Coffea arabica* L.) - some recent leads. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2011; 71:2, 185-189.

Pilet-Nayel, ML, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan MC, Fournet S and Delourme R (2017). Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in plant science*, 8, 1838.

Sambrook J, Fritsch EF e Maniatis T (1989). *Molecular cloning*. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2, 14-9.

Santana MF, Zambolim EM, Caixeta ET e Zambolim L (2018). Population genetic structure of the coffee pathogen *Hemileia vastatrix* in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43(5), 473-476.

Sapkota S, Hao Y, Johnson J, Lopez B, Bland D, Chen Z, and Mergoum M (2019). Genetic mapping of a major gene for leaf rust resistance in soft red winter wheat cultivar AGS 2000. *Molecular Breeding*, 39(1), 8.

Silva DN, Várzea V, Paulo OS, and Batista D (2018). Population genomic footprints of host adaptation, introgression and recombination in coffee leaf rust. *Molecular plant pathology*, 19(7), 1742-1753.

Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A e Várzea V (2017). The Coffee Leaf Rust pathogen *Hemileia vastatrix*: One and a half centuries around the tropics. *Molecular plant pathology*, 2017; 18: 8, 1039-1051.

Yuan Y, Miao J, Tao Y (2015). Identification and fine mapping of qPH6, a novel major quantitative trait locus for plant height in rice. *Molecular Breeding*, 35,56.



Várzea VMP, Marques DV (2005). Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. *Coffea* durable resistance. In: Zambolim L, Zambolim E, Várzea VMP (eds) Durable resistance to coffee leaf rust. Suprema Gráfica, Viçosa, 53–74.

Zambolim L (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Trop Plant Pathology*, 41:1–8.

Zhang N, Bi YF, Chen JF, Qian CT, Zhang YB, and Yi HP (2017). Development of a muskmelon cultivar with improved resistance to gummy stem blight and desired agronomic traits using gene pyramiding. *Czech Journal Genetic Plant Breeding*, 53(1), 23-29.