



BÁRBARA ALVES DOS SANTOS CISCON

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE AMPLO
ESPECTRO EM GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* EM
RESPOSTA À *Hemileia vastatrix***

**LAVRAS-MG
2019**

BÁRBARA ALVES DOS SANTOS CISCON

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE AMPLO ESPECTRO EM
GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* EM RESPOSTA À *Hemileia vastatrix***

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

RESUMO

Uma das principais doenças da cultura cafeeira é a ferrugem alaranjada, causado pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Diante disso, diversos programas de melhoramento tem explorado a resistência de plantas a patógenos no intuito de controlar esta doença e oferecer ao produtor a possibilidade de reduzir o uso de defensivos nas lavouras cafeeiras. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) estão localizados na membrana plasmática das células vegetais e participam da primeira linha de defesa vegetal. Os PRRs reconhecem os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e os DAMPs (padrões moleculares associados a danos) desencadeando uma série de respostas a fim de conter a infecção pelo patógeno. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar expressão de genes candidatos a PRRs em genótipos contrastantes de *C. arabica* quanto a resistência a *H. vastatrix*. Para a análise da expressão gênica dos PRRs, mudas de cafeeiros das cultivares Catuaí Vermelho IAC 144, Mundo Novo IAC 367-4, Aranãs RV e Iapar-59 serão inoculadas com *H. vastatrix*. As folhas das plantas inoculadas foram coletadas 0, 24 e 48 horas após a inoculação. A expressão do gene candidato *CaCERK1*, observou-se aumentou significativamente 6 horas após a inoculação, principalmente nas cultivares Catuaí Vermelho e Aranãs. A expressão dos candidatos *CaLYK4* e *CaLYK5* aumentaram progressivamente nos tempos avaliados, enquanto que a expressão do candidato *CaRLP* não foi influenciada pela inoculação com o patógeno.

Palavras-chave: Ferrugem do cafeeiro; PRR; PTI; CERK1, qPCR.

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	05
2 OBJETIVO	06
3 REFERENCIAL TEÓRICO	06
3.1 A cultura cafeeira no Brasil.....	06
3.2 Patossistema <i>Hemileia vastatrix</i> -cafeeiro.....	08
3.3 Sistema de defesa contra fitopatógenos.....	10
3.4 Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs).....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Genótipos de <i>C. arabica</i>	16
4.2 Experimentos para a análise da expressão gênica dos PRRs em resposta a <i>H. vastatrix</i>	16
4.2.1 Delineamento estatístico.....	17
4.3 Identificação dos PRRs específicos para fungos no genoma de <i>C.</i> <i>arabica</i>	17
4.4 Desenho dos <i>primers</i>	18
4.5 Extração e quantificação do RNA.....	19
4.6 Síntese do cDNA e qPCR.....	19
5 RESULTADOS	20
5.1 Obtenção das mudas.....	20
5.2 Experimentos para análise da expressão gênica dos PRRs em resposta a <i>H. vastatrix</i>	20
5.2.1 Inoculação com <i>H. vastatrix</i>	20
5.3 Identificação dos PRRs específicos para fungos no genoma de <i>C.</i> <i>arabica</i>	22
5.4 Desenho e validação dos <i>primers</i>	29
5.5 Estudo da expressão gênica em resposta a <i>H. vastatrix</i>	32
6 DISCUSSÃO	35
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como maior produtor de café, sendo também um dos maiores consumidores, perdendo apenas para os Estados Unidos (EMBRAPA, 2018). Estima-se que em 2018, a produção brasileira fique em torno de 59 milhões de sacas beneficiadas e que a receita bruta de *Coffea arabica*, o café mais produzido, fique em torno de R\$ 18,71 bilhões (CONAB, 2018). Esta cultura é uma das principais commodities do país, apresentando grande importância para a região sudeste, especialmente para o estado de Minas Gerais. Apesar disso, a produção e os custos para a mesma têm sido afetados devido a demandas para controle de várias pragas e doenças. Uma das principais doenças da cultura cafeeira é a ferrugem alaranjada, causado pelo fungo *Hemileia vastatrix*, que pode levar à queda de 50% no rendimento, principalmente em *Coffea arabica* (ZAMBOLIM, 2016).

Uma maneira de contornar esse problema é melhorando a capacidade da própria planta no reconhecimento de fitopatógenos. Neste sentido, muitos genes de resistência vêm sendo amplamente utilizados em programas de melhoramento. No entanto, apesar de vários exemplos de sucesso, esse tipo de resistência raramente confere reconhecimento de amplo espectro e, além disso, muitas vezes é superado rapidamente pelos fitopatógenos, em consequência da pressão evolutiva sofrida em sistemas agrícolas.

Um mecanismo de defesa de amplo espectro, efetivo contra uma variedade de patógenos, insetos e também plantas parasitas (HEGENAUER et al., 2016; RANF, 2017) é desencadeado por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Estes receptores estão localizados na membrana plasmática das células vegetais e participam da primeira linha de defesa vegetal (JONES; DANGL, 2006). Os PRRs reconhecem os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e os DAMPs (padrões moleculares associados a danos). Ao detectarem PAMPs, os PRRs ativam uma série de eventos do sistema de defesa levando à imunidade desencadeada por PAMPs (PTI) (COUTO; ZIPFEL, 2016).

Embora as batalhas moleculares entre as plantas hospedeiras e os fitopatógenos tenham sido extensivamente estudadas, muitos aspectos ainda precisam ser investigados a fim de se obter uma compreensão holística dos mecanismos intrínsecos, o que é de suma importância no combate às doenças (KLEMPNER et al., 2014). O estudo da imunidade basal tem sido foco de diversas pesquisas com o propósito de conhecer e identificar os mecanismos que governam essa linha de defesa, possibilitando o uso da mesma como mais

uma ferramenta na busca para resistência de plantas (BOUTROT; ZIPFEL, 2017). A identificação e caracterização dos PRR entre as espécies vegetais, permitem, ainda, a reengenharia do reconhecimento de PAMPs, o que pode ser um aspecto importante para o melhoramento genético vegetal (BENT; MACKEY, 2007; BOUTROT; ZIPFEL, 2017; LEE; WHITAKER; HUTTON, 2016).

O aumento da resistência basal pode reduzir o impacto dos fitopatógenos, permitindo potencialmente uma resistência mais duradoura e sustentável no campo. No melhoramento genético do cafeeiro, estratégias focadas nos genes de resistência têm sido amplamente utilizadas, contudo, até então não se fez uso da resistência condicionada por PRRs. Uma das limitações para o uso dos PRRs no melhoramento do cafeeiro é a ausência de informações sobre: 1) o repertório de PRRs em *C. arabica*, 2) a variabilidade genética dos receptores em genótipos contrastantes, e 3) a modulação da expressão gênica dos receptores em resposta a diferentes patógenos. Desta forma, o presente projeto tem como objetivo investigar estes três aspectos na interação ferrugem-cafeeiro e, de posse dos resultados, criar subsídios para a utilização dos PRRs nos programas de melhoramento desta cultura.

2. OBJETIVO

Analisar a expressão gênica destes PRRs do tipo em genótipos contrastantes de *C. arabica* em resposta à inoculação com *H. vastatrix*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. A cultura cafeeira no Brasil

O café pertence à família Rubiaceae, ordem Rubiales e gênero *Coffea*. Este gênero é constituído por mais de 100 espécies botânicas (DAVIS et al., 2006), entretanto as mais cultivadas são *Coffea canephora* (café conilon) e *Coffea arabica* (café arábica). O café conilon é diploide ($2n = 2x = 22$ cromossomos) (DENOEUDE et al., 2014), enquanto que o café arábica é tetraploide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) (TRAN et al., 2018) sendo resultado do cruzamento entre *Coffea canephora* e *Coffea eugenoides* (LASHERMES et al., 1999).

Dentre os mais de 50 países produtores de café, destacam-se Brasil, Vietnã, Colômbia e Indonésia, sendo que o Brasil é o maior produtor. A produção mundial do café totalizou cerca de 158,56 milhões de sacas de 60kg no período de outubro de 2017 a julho de 2018; e as exportações mundiais totalizaram 112,52 milhões no período de outubro de 2017 a agosto de 2018 (ICO, 2018; USDA, 2018). Para 2018/19 o consumo global de café está previsto em 163,2 milhões de sacas e produção mundial em 171,2 milhões, 11,4 milhões acima do ano anterior, principalmente devido à produção recorde do Brasil (USDA, 2018).

No Brasil, essa cultura é uma das principais commodities, sendo que o café arábica é o mais produzido por apresentar melhor qualidade de bebida, representando cerca de 70% da produção total (CABRAL et al., 2016). Em 2017 o consumo interno foi estimado em 21,5 milhões de sacas, colocando o Brasil como segundo maior consumidor de café no mundo, sendo precedido apenas pelos Estados Unidos, que consomem em torno de 25,8 milhões (EMBRAPA, 2018). Em 2018, ano de bienalidade positiva, a estimativa é que a produção brasileira fique em torno de 59 milhões de sacas beneficiadas, apresentando um crescimento de 33,2%. Além disso, a área de produção é de 1.880,9 mil hectares, sendo que ainda existe um cenário de expansão, com 294,4 mil hectares em formação. Para o café arábica, a produção é estimada em 45,9 milhões de sacas (crescimento de 34,1%) e para o conilon 13,9 milhões de sacas (crescimento de 30,3%) (CONAB, 2018).

Dentre os estados brasileiros produtores de café, encontram-se Bahia, Espírito Santos, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Minas Gerais é o principal deles, cuja produção equivale a mais de 50% da produção nacional. As principais regiões produtoras do estado são o Sul de Minas (Sul e Centro-Oeste), o Cerrado Mineiro (Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste), a Zona da Mata Mineira (Zona da Mata, Rio Doce e Central) e o Norte de Minas (Norte, Jequitinhonha e Mucuri), todas elas com taxas de crescimento em 2018. Para Minas Gerais, a produção total de sacas de arábica é estimada em 30,4 milhões e de conilon em 335,8 mil (CONAB, 2018).

Entende-se, portanto, que a cultura cafeeira apresenta destaque no agronegócio brasileiro, principalmente no estado de Minas Gerais. Apesar disso, diversos problemas são enfrentados durante a etapa de produção do café, como por exemplo doenças que acarretam prejuízos significativos. Entre os exemplos de doenças frequentemente associadas à cultura

cafeeira encontram-se a cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), antracnose (*Colletotrichum coffeanum*) e a ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*). Portanto, para que a produção de café continue avançando no Brasil, é de grande importância o manejo adequado da cultura, utilizando estratégias para o controle dos principais problemas fitossanitários encontrados atualmente.

3.2. Patossistema *Hemileia vastatrix*-cafeeiro

A ferrugem alaranjada é a doença mais devastadora encontrada no cafeeiro, em todas as regiões do mundo onde o café é cultivado, (CABRAL et al., 2016; MCCOOK; VANDERMEER, 2015). No Brasil, a doença tem causado danos desde a década de 70, quando foi detectada na Bahia (CHAVES et al. 1970 cita por ZAMBOLIM et al., 2016 p. 1) e se disseminou para todas as regiões produtoras do país (AVELINO et al., 2015; ZAMBOLIM, 2016). Em regiões que apresentam condições favoráveis a este patógeno, a queda da produtividade pode chegar a 50%, dependendo do nível de resistência do genótipo do hospedeiro (ZAMBOLIM, 2016). Para contornar tais danos, o controle químico tem sido utilizado como medida mais eficiente, entretanto, o uso de cultivares tolerantes ou resistentes é uma alternativa viável para diminuir custos e possíveis danos ambientais (CABRAL et al., 2016; PERIYANNAN et al., 2017; TALHINHAS et al., 2017).

O agente causal da ferrugem alaranjada é *Hemileia vastatrix*, um fungo biotrófico, pertencente ao filo Basidiomycota e à família Pucciniaceae (RAMIRO et al., 2009; TALHINHAS et al., 2017). Já foram identificadas aproximadamente 45 raças diferentes deste patógeno em todo mundo (CABRAL et al., 2009; RODRIGUES; BETTENCOURT; RIJO, 1975; SILVA et al., 2006). No Brasil 15 raças foram identificadas em *C. arabica*, espécie de café mais afetada, sendo que a raça II é a mais prevalente (CABRAL et al., 2009; CAPUCHO et al., 2012). Na folha infectada, a ferrugem é inicialmente caracterizada por pequenas manchas cloróticas, translúcidas de cor amarelo pálido, na face abaxial do limbo foliar, que em pouco tempo se expandem (FIGURA 1b). Nesta região formam-se os urediniosporos ou uredósporos, um caraterístico “pó” de cor laranja-amarelado (AVELINO et al., 2015; RAMIRO et al., 2009; ZAMBOLIM, 2016) (FIGURA 1a e 1c), que por sua vez, podem ser disseminados por meio de respingo de gotas de chuva de uma folha para outra ou pelo vento, sendo levado por longas distâncias (BOWDEN; GREGORY;

JOHNSON, 1971; ZAMBOLIM, 2016). Já na face adaxial da folha, no local correspondente à região infectada, formam-se manchas descoloridas de tons amarelados (GODOY; FILHO BERGAMIM, 1997).

O fenótipo resultante da doença é a desfolha, em consequência de lesões foliares que afetam a fotossíntese, secagem dos ramos ou morte prematura dos ramos com frutos, antes da colheita, o que consequentemente leva a redução da produtividade (SILVA et al., 2006; TALHINHAS et al., 2017). Um estudo realizado por Silva et al. (2002) demonstrou, em experimentos com inoculação artificial, que 24 horas após a inoculação já é possível detectar a penetração da hifa produzida pelo apressório, tanto em genótipos resistentes quanto em suscetíveis. Além disso, a presença de haustórios se dá a partir de 48 horas após a inoculação, sugerindo assim, que a troca de sinais entre os dois organismos já esteja ocorrendo neste período. A morte celular, característica da resposta de hipersensibilidade (HR), foi observada em genótipo resistente aos dois dias após a inoculação (SILVA et al., 2002).

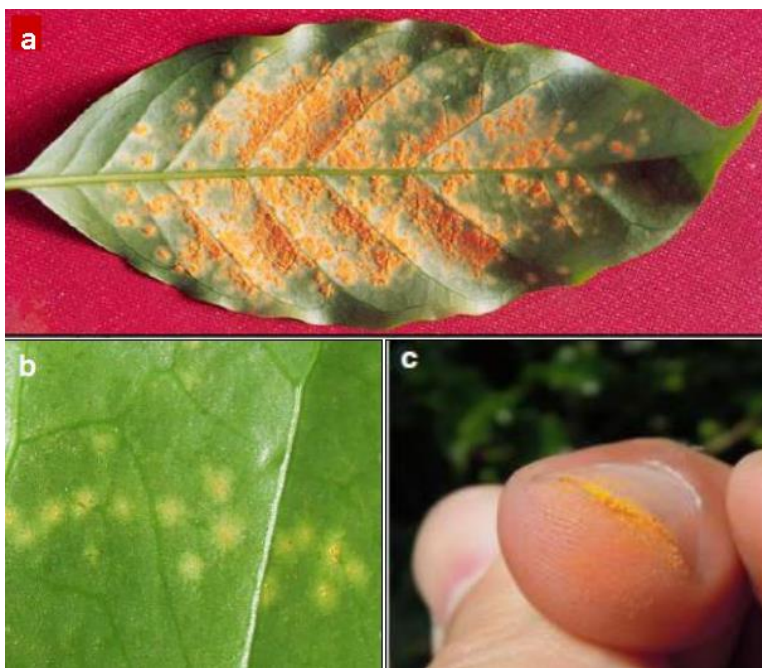


FIGURA 1 - Sintomas e sinais de ferrugem na folha de café. Fonte: Talhinhos et al. (2017), Avelino et al.(2015). A) urediniósporos na superfície inferior da folha; B) manchas cloróticas; C) caráterístico “pó” de cor laranja-amarelado.

A resistência do cafeeiro à ferrugem é controlada por genes de maior e de menor efeito, ou seja, uma resistência vertical e horizontal (SHIGUEOKA et al., 2014). A resistência completa e de maior efeito segue um modelo "gene a gene" e é condicionada, de

forma independente ou conjunta, por genes S_H (S_{H1} a S_{H9}) (RODRIGUES; BETTENCOURT; RIJO, 1975; SILVA et al., 2006). O genes S_{H1} , 2, 4 e 5 foram identificados em *C. arabica*, S_{H3} em *C. liberica* e S_{H6} , 7, 8 e 9 em *C. canephora* (NORONHA-WAGNER; BETTENCOURT, 1967; PRAKASH et al., 2004; SILVA et al., 2006), sendo que estes genes ainda não foram descritos em nível molecular (ZAMBOLIM, 2016). No patógeno, os genes de avirulência correspondentes aos S_{HS} , são v1 a v9 respectivamente (BETTENCOURT; RODRIGUES, 1988 citado por SILVA et al., 2006 p. 120). Quando a resistência conferida por alguns genes S_H é superada, os cafeeiros podem apresentar resistência parcial ao patógeno. Esta resistência parcial que também pode ser denominada horizontal ou incompleta é conferida por outros genes, que ainda são desconhecidos (FAZUOLI et al., 2007; SERA et al., 2010).

Cultivares resistentes à ferrugem foram desenvolvidos pelo Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, a partir do Híbrido de Timor. Este é um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora* que possui resistência proveniente de *C. canephora*, e o mesmo número de cromossomos de *C. arabica*. Estas características do híbrido permitiu a introgressão da resistência em cultivares elites de *C. arabica* utilizados em vários países produtores (AVELINO et al., 2015; TALHINHAS et al., 2017). No Brasil, várias cultivares foram desenvolvidas empregando fontes de resistência das coleções de germoplasma de Portugal, desde o início do programa de melhoramento no instituto agrônomico de Campinas (IAC) em 1954 (BETTENCOURT; CARVALHO, 1967). Entretanto, apesar dos avanços que permitiram a obtenção destes cultivares, 95% das variedades plantadas são suscetíveis à ferrugem devido ao surgimento de variantes do patógeno (CABRAL et al., 2016).

3.3. Sistema de defesa contra fitopatógenos

A interação entre plantas e patógenos pode ser entendida como uma “guerra molecular” e co-evolutiva, em que cada oponente utiliza suas armas biológicas conforme necessário, levando assim a uma infecção bem-sucedida pelo patógeno ou resistência efetiva no hospedeiro (KLEMPNER et al., 2014). A percepção dos fitopatógenos pelas plantas é didaticamente dividida em duas camadas de reconhecimento e sinalização. A primeira delas baseia-se no reconhecimento de moléculas microbianas conservadas,

denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ativando a imunidade disparada por PAMP (PTI- PAMP Triggered Immunity). Já a segunda, reconhece os efeitos da virulência dos patógenos (efetores), por meio de proteínas de resistência (proteínas R), geralmente intracelular, levando à imunidade desencadeada por efetores (ETI- Effector Triggered Immunity) (BOYD et al., 2013; JONES; DANGL, 2006). Sabe-se que esta divisão é meramente didática, pois, na verdade, ocorre de maneira dinâmica formando um continuum entre ETI e PTI.

A PTI contribui para a imunidade inata da planta e também constitui um fator importante da resistência não-hospedeira (LACOMBE et al., 2010; LEE; WHITAKER; HUTTON, 2016). O reconhecimento dos PAMPs é efetuado por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) localizados na membrana plasmática e levam a uma resistência de amplo espectro, pois reconhecem grupos de organismos, não diferenciando espécies (RANF, 2017). Como o reconhecimento dessas moléculas conservadas não está estritamente relacionado a microrganismos patogênicos, alguns fitopatologistas tem preferido utilizar a nomenclatura padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs), desencadeando assim a denominada imunidade desencadeada por MAMP (MTI) (BOLLER; FELIX, 2009; MACHO; ZIPFEL, 2014). No entanto, aqui será tratado como PAMPs.

Os patógenos adaptados podem inibir essa primeira linha de defesa por meio da secreção de efetores específicos. Em resposta a esta supressão, as proteínas R, codificadas pelos genes de resistência, reconhecem direta ou indiretamente estes efetores, desencadeando assim a ETI (KOURELIS; HOORN; VAN DER, 2018). Os genes R, em sua maioria, pertencem à família NBS-LRR (NBS- sítio de ligação de nucleotídeo, LRR- repetição ricas em leucina) (BENTHAM et al., 2017; DANGL; JONES, 2001), sendo que o domínio LRR é mais variável e está relacionado ao reconhecimento do patógeno, enquanto que o domínio NBS participa da tradução do sinal (BENTHAM et al., 2017; DEYOUNG; INNES, 2006).

Apesar de identificarem diferentes ligantes, o reconhecimento de PAMPs (elicitors) e efetores leva a vias de sinalização semelhantes (TSUDA; KATAGIRI, 2010). Esta sinalização envolve primeiramente, mudanças nos níveis de cálcio no citoplasma (JEWORUTZKI et al., 2010; NOMURA et al., 2012), produção de espécies reativas de

oxigênio (ROS), que funcionam tanto como moléculas antimicrobianas quanto mensageiras (RANF et al., 2011; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003) e cascata de sinalização envolvendo proteínas quinases, MAPKs (mitogen-activated protein kinases) e CDPKs (calcium-dependent protein kinases) (DALIO et al., 2014; MACHO; ZIPFEL, 2014; RESENDE et al., 2007).

Hormônios como o ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) participam da amplificação dos primeiros sinais, ativando vias de sinalização que induzem a transcrição de genes de defesa. Estes genes estão relacionados à formação de estruturas como papilas, polimerização de lignina e de glicoproteínas extracelulares ricas em hidroxiprolina (HRGPs), para o fortalecimento da parede celular contra a degradação enzimática provocada por fitopatógenos, e também fitoalexinas. (BIGEARD, COLCOMBET; HIRT, 2015; GRANT; LAMB, 2006). Além de Ca²⁺ e ROS, outras moléculas estão envolvidas na sinalização. O óxido nítrico (NO) e seus derivados, coletivamente referidos como espécies reativas de nitrogênio, além de lipídios mostraram estar envolvidos em diferentes etapas de transdução do sinal (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015; DALIO et al., 2014).

Comparando-se essas duas linhas de defesa, muitos estudos apontam que as respostas na ETI ocorrem mais rapidamente são mais prolongadas e mais fortes do que aquelas provenientes da PTI (JONES; DANGL, 2006; THOMMA; NÜRNBERGER; JOOSTEN, 2011; TSUDA; KATAGIRI, 2010), uma vez que a primeira está associada a uma resposta de hipersensibilidade (HR), que envolve morte celular programada e também a uma resposta sistêmica adquirida (SAR). No entanto, existem relatos de que os PAMPs ativam respostas robustas (MISHINA; ZEIER, 2007; NAITO et al., 2008; THOMMA; NURNBERGER; JOOSTEN, 2011) e que plantas que apresentam mutações na sinalização PTI mostram maior suscetibilidade a patógenos (YANG, DENG; RAMONELL, 2012; ZIPFEL et al., 2004).

O fato de que o patógeno necessita suprimir a PTI para continuar seu ataque, evidencia a importância dessa primeira linha de defesa, mostrando também que PTI e ETI formam um continuum (THOMMA, NÜRNBERGER; JOOSTEN, 2011), que é necessário para uma resposta de defesa eficiente. Portanto, estudos que buscam a resistência a doenças com foco no aumento da capacidade do próprio sistema imunológico, agregando PTI e ETI

constituem a melhor estratégia para obtenção de cultivares resistentes (LACOMBE et al., 2010; ZIPFEL et al., 2006).

3.4. Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que desencadeiam a PTI, são proteínas de membranas que apresentam, geralmente, três domínios. Um domínio extracelular que está envolvido na percepção do ligante (elicitores), o domínio transmembrana que permite o ancoramento da proteína na membrana plasmática e o domínio quinase intracelular, envolvido na sinalização da resposta de defesa (BÖHM et al., 2014). O domínio extracelular pode apresentar repetições ricas em leucina (LRRs) ou motivo de lisina (Lys) (BECK et al., 2012) e o domínio intracelular pode ou não estar presente e por isso essas proteínas são classificados em receptores do tipo quinase (Receptor-like Kinase - RLK, ou Receptor Kinase -RK) ou proteínas similares a receptores (Receptor-like Proteins -RLP) (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012; YANG, DENG e RAMONELL, 2012). Em geral, tais PRRs associam-se a outros RLKs e atuam como parte de complexos imunes multiproteicos na superfície celular (SUN et al., 2013; TANG, WANG; ZHOU, 2017).

Os PAMPs, por sua vez, foram em sua maioria, definidos como moléculas provenientes de microorganismos, ou epítipo interno desta molécula, que são altamente conservados e que apresentam, portanto, função essencial na sobrevivência, ou fitness destes microorganismos (ALBERT, 2013; NAITO et al., 2008; NÜRNBERGER; BRUNNER, 2002). Um exemplo bem descrito na literatura é a flagelina, uma proteína estrutural presente no flagelo de bactérias que se locomovem com o auxílio do mesmo, sendo, portanto, uma região bastante conservada neste grande grupo (GÓMEZ-GÓMEZ; BOLLER, 2000). Outros exemplos de PAMPs bacterianos descritos são o EF-Tu (fator Tu de alongamento) (FURUKAWA et al., 2014; KUNZE et al., 2004), lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (PETROCELLI et al., 2012; ZEIDLER et al., 2004) e peptidoglicano de bactérias Gram-positivas (GUST et al., 2007).

Para fungos, moléculas como a quitina (LIU, et al., 2012a), quitosana (AMBORABÉ et al., 2008), β glucanas (FLIEGMANN et al., 2004), xilanase indutora de

etileno (EIX) (PIZARRO et al., 2018; RON et al., 2000), e o ergosterol (GRANADO, FELIX; BOLLER, 1995; KLEMPNER et al., 2014) são considerados PAMPs. Além dos exemplos supracitados, outras moléculas podem ser consideradas como PAMPs, entretanto, apesar da identificação dessas moléculas, não foram identificados PRRs correspondentes para todas elas.

Além dos PAMPs, os PRRs também podem reconhecer padrões moleculares associados a insetos herbívoros (molecular patterns associated with herbivores - HAMPs) (YAMAGUCHI e HUFFAKER, 2011) ou padrões moleculares associados a danos (damage-associated molecular patterns - DAMPs) (ZIPFEL, 2009). Nestes casos, os elicitores são moléculas liberadas pelas próprias células do hospedeiro (MA et al., 2012) ou peptídeos endógenos recém sintetizados, que são liberados pelas plantas após ataques de pragas ou microrganismos (BOLLER; FELIX, 2009; HAMANN, 2012; SERRANO et al., 2014). Acredita-se que como os PAMPs são essenciais para a viabilidade ou estilo de vida dos microrganismos é menos provável que os mesmos evitem a imunidade do hospedeiro por meio da mutação ou deleção nessas regiões, se comparado a efetores (LACOMBE et al., 2010).

Os PRRs melhor caracterizados na literatura são os receptores quinase que apresentam domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR-RKs). Estes receptores estão envolvidos no reconhecimento de estruturas bacterianas, a exemplo do FLS2 (Flagellin sensing 2), que detecta um epítipo conservado de 22 aminoácidos, o flg22, existente na região N-terminal da proteína flagelina (BOUTROT; ZIPFEL, 2017; GÓMEZ-GÓMEZ; BOLLER, 2000). Além de ser um dos PAMPs mais estudados, a flagelina apresenta uma faixa de reconhecimento amplo entre as plantas, sendo reconhecida tanto por espécies monocotiledôneas como dicotiledôneas. Este receptor foi identificado em espécies como *A. thaliana* (FLS2) (GÓMEZ-GÓMEZ; BOLLER, 2000; MOTT; GUTTMAN; DESVEAUX, 2017), tabaco (NbFLS2) (HAN; RATHJEN, 2007), arroz (OsFLS2) (TAKAI et al., 2008), videira (VvFLS2) (TRDÁ et al., 2014) e tomate (FLS3) (HIND et al., 2016). Em tomate, no entanto, o epítipo reconhecido é o flgII-28 (HIND et al., 2016).

Outro exemplo de LRR-RKs bem caracterizado é o EFR (receptor de fator de alongação-tu), que detecta o epítipo elf18, correspondendo aos 18 resíduos conservados na região N-terminal da proteína do fator de alongamento-TU (EF-Tu) (ZIPFEL et al., 2006).

Enquanto que a maioria das plantas responde à flagelina, a sensibilidade de EF-Tu parece restrita a Brassicaceae (BOUTROT; ZIPFEL, 2017; LACOMBE et al., 2010).

Para fungos, receptores bem descritos são aqueles que reconhecem a quitina, um dos principais constituintes das parede celular destes organismos, como o LYP4 e 6 (LIU, et al., 2012b) CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) (MIYA et al., 2007) e o CEBiP (chitin elicitor binding protein) (KAKU et al., 2006). O CERK1 é um receptor tipo RLK, contendo quinase intracelular, enquanto o CEBIP, LYP4 e 6 são do tipo RLP, sem domínio quinase. Todos apresentam domínios extracelulares com resíduos de Lisina (Lys) (BÖHM et al., 2014; SHIMIZU et al., 2010). Além de reconhecer quitina, o CERK1 e o LYP4 e LYP6 também atuam no reconhecimento do peptidoglicano bacteriano (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012).

O CERK1 foi primeiramente identificado em *Arabidopsis thaliana* (AtCERK1) (MIYA et al., 2007) e posteriormente em outras espécies como arroz (OsCERK1) (SHIMIZU et al., 2010) e maçã (MdCERK1) (ZHOU et al., 2018). No arroz, o OsCERK1 precisa interagir com o CEBIP para responder à quitina (SHIMIZU et al., 2010). Já em *A. thaliana*, o AtCERK1 foi inicialmente descrito como o principal receptor a se ligar à quitina, embora a afinidade de ligação foi relatada como baixa, indicando que outro receptor poderia estar presente (CAO et al., 2014; TANG, WANG; ZHOU, 2017). Cao et al. (2014) propuseram o AtLYK5 como o principal receptor de quitina em *Arabidopsis*. Este interage com AtCERK1 de maneira dependente de quitina para a fosforilação da AtCERK1 formando um complexo para induzir a imunidade da planta.

Alterações genéticas em PRRs que reconhecem tanto PAMPs fúngicos quanto bacterianos reduzem a capacidade da planta em perceber e se defender adequadamente contra fitopatógenos. Nocautes em genes como OsCERK1 (MIYA et al., 2007; SHIMIZU et al., 2010) e mutações em AtLYK5 (CAO et al., 2014) levam à perda da capacidade de responder à quitina e iniciar respostas de defesa. Nota-se, portanto, que mutantes de plantas nos quais o reconhecimento de PAMP é afetado são mais suscetíveis a patógenos adaptados, o que reflete defeitos na resistência basal. Além disso, permitem algum grau de progressão da doença por patógenos não adaptados refletindo defeitos na resistência não-hospedeira (LACOMBE et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Genótipos de *C. arabica*

Os genótipos que utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1. Os materiais fazem parte do programa de melhoramento do cafeeiro do INCT do Café e foram selecionados considerando o nível de resistência, a disponibilidade de material para o desenvolvimento do estudo e o interesse nesses materiais do programa de melhoramento do INCT do Café e da EPAMIG.

Tabela 1. Genótipos utilizados nesse estudo, origem e respectivos fenótipos quanto à resistência à ferrugem alaranjada (*H. vastatrix*).

Genótipo	Origem	Fenótipo de resposta à ferrugem
Aranãs RV	Icatu Vermelho IAC 3851-2 e Catimor UFV 1602-215	Resistente
IAPAR-59	Villa Sarchi CIFC 971/10 e Híbrido de Timor CIFC 832/2	Resistente
Catuaí Vermelho IAC 144	Caturra Amarelo IAC 476-11 e Mundo Novo IAC 374-19	Suscetível
Mundo Novo IAC 367-4	Sumatra e Bourbon Vermelho	Suscetível

4.2. Experimentos para a análise da expressão gênica dos PRRs em resposta a *H. vastatrix*

Para a análise da expressão gênica dos PRRs selecionados em resposta ao patógeno, mudas dos quatro genótipos estudados (Catuaí Vermelho IAC 144, Mundo Novo IAC 367-4, Aranãs RV e Iapar-59) contendo 3-4 pares de folhas foram inoculadas com *H. vastatrix* em câmara de crescimento (Fitotron) com ambiente controlado e propício para o desenvolvimento da doença. As plantas inoculadas foram mantidas no escuro em uma câmara úmida como descrito anteriormente por (MONTEIRO et al., 2016), com algumas modificações. Os tempos de coletas foram: 6 e 24 horas após a inoculação. Esses tempos

foram selecionados com base em resultados obtidos previamente por (SILVA et al., 2002), que mostraram a predominância do estágio de penetração da hifa produzida pelo apressório às 24 horas após a inoculação artificial. Plantas não inoculadas (tempo 0h) também foram mantidas no mesmo ambiente, tendo suas folhas coletas concomitantemente às plantas inoculadas.

O inóculo utilizado, foi coletado no campo experimental do INCT do Café. As pústulas das folhas coletadas foram raspadas com auxílio de uma capsula de remédio que serviu também, como recipiente para armazenamento, juntamente com um micro tubo que a envolveu. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer a -80 °C. Para preparação do inóculo os esporos armazenados passaram por um choque térmico de 40°C durante 10 min. A viabilidade dos esporos foi verificada por meio da observação da germinação dos mesmos em lâmina escavada. Para inocular as folhas, foi utilizada uma suspensão na concentração de 1×10^6 urediniósporos/mL. Todas as folhas coletas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio identificados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após a coleta, os sacos contendo as folhas foram armazenados em ultrafreezer a -80°C.

4.2.1. Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos completos casualizados (DBCC) com cada parcela experimental constituída por três plantas. Os tratamentos foram dispostos em esquema 3 x 4, sendo os fatores: 3 tempos de avaliação (0, 06 e 24 horas após inoculação) e 4 genótipos (Catuaí Vermelho IAC 144, Mundo Novo IAC 367-4, Aranãs RV e Iapar-59). Após a coleta dos dados, as médias de expressão gênica para cada gene serão submetidos à análise de variância e os níveis dos fatores serão comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.3. Identificação dos PRRs específicos para fungos no genoma de *C. arabica*

Para a identificação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), das subfamílias receptores de quinase (RKs) e proteínas similares a receptor (RLP), foi utilizado o genoma de *C. arabica* cultivar Bourbon Vermelho sequenciado pela Universidade da Califórnia (UC Davis Coffee Genome Project) e parcialmente disponível

no banco de dados do Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov). A busca pelos receptores no genoma de *C. arabica* baseou-se no princípio de similaridade de sequência e conservação de domínios da proteína por meio da comparação com PRRs previamente descritos na literatura para reconhecimento PAMPS fúngicos em outras espécies vegetais.

As sequências de peptídeos dos PRRs identificados na literatura foram utilizadas como referência para buscar sequências similares dentre as proteínas preditas do genoma de interesse, utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para isso realizou-se o BLASTp (Align Sequences Protein BLAST) no Phytozome para cada sequência de referência. As sequências de *C. arabica* que apresentaram domínios estruturais característicos de PRR, retornadas pelo BLASTp, foram selecionadas com base nos seguintes quesitos: i) $e\text{-value} \leq 10^{-5}$; ii) domínio extracelular correspondente a sequência de referência utilizada, seja ele domínio de lisina (Lys) ou repetição rica em leucina (LRR) e; iii) domínio transmembrana. Esses parâmetros foram analisados utilizando-se as ferramentas online SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) e TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Todas as sequências candidatas que atenderam totalmente aos requisitos mencionados foram coletadas no Phytozome, incluindo sequência genômica, codante (CDS) e peptídica.

Após a seleção de sequências de *C. arabica*, baseadas nos critérios supracitados, as mesmas foram novamente comparadas as sequências de referência, por meio de uma análise filogenética. Essa análise permitiu a identificação das sequências peptídicas com maior semelhança filogenética, e por consequência, agruparam-se no clado mais próximo às sequências de referência, permitindo assim selecionar as sequências molde para o desenho dos *primers* utilizados no estudo de expressão gênica. As análises filogenéticas foram realizadas pelo software MEGA, versão 7.0.26, utilizando o método de Maximum Likelihood com bootstrap de 1000 repetições.

4.4. Desenho dos *primers*

As sequências de *C. arabica* selecionadas foram utilizadas como base para o desenho de *primers*. Os *primers* para os estudos de expressão gênica foram desenhados utilizando-se o software Primer Quest e a qualidade dos mesmos foi analisada por meio do software Oligo Analyzer, ambos disponibilizados online pela IDT (Integrated DNA

Technologies, EUA). Após o desenho dos mesmos, estes foram blastados (BLASTn - Standard Nucleotide BLAST) contra o banco de dados NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a fim de atestar sua especificidade por meio da identificação de complementariedade com sequências de DNA de outros organismos.

Os *primers* foram sintetizados pela empresa Thermo Fisher Scientific. Todos os *primers* foram testados para amplificação específica usando o DNA genômico e verificação em gel de agarose 1% e posteriormente serão utilizados para análise de expressão gênica.

4.5. Extração e quantificação do RNA

As amostras foram maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo até formarem um pó fino. Elas foram mantidas em congelamento durante todo o processo de maceração com o uso de nitrogênio líquido. O material macerado foi armazenado em microtubos de 1,5mL em freezer a -80°C até a realização da extração do RNA.

Para a extração do RNA utilizou-se o Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen/Thermo Fisher) e seguidas as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA obtido foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega), seguindo as instruções do fabricante, para remoção de qualquer DNA residual na amostra. A qualidade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e quantificado no instrumento NanoDrop.

4.6. Síntese do cDNA e qPCR

Para a síntese do cDNA foi utilizado 1 µg do RNA total (tratado com DNase I) e o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Thermo Fisher (Thermo Fisher). Após a síntese, o cDNA foi diluído 5x e armazenado a -20°C.

Para a qRT-PCR utilizou-se o instrumento QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o sistema de detecção com SYBR Green. As condições da reação foram: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min; 40 ciclos de: 95°C por 15 s, 60°C por 1 min; e um passo final de 95°C por 15 s. O volume da reação foi de 10 µL com os seguintes componentes: 1.0 µL de cDNA, 0.4 µL de cada um dos *primers* (forward e reverse) na concentração de 10 µM, 5.0 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Thermo Fisher), 3.2 µL de água ultrapura (livre de nucleases). Para cada amostra foram utilizadas três repetições técnicas nas reações. Os dados foram submetidos a análise da

expressão relativa pelo método da quantificação relativa (Pfaffl, 2001). Foram utilizados como referência (genes com expressão constitutiva) os genes 24S e fator de alongação 1 α (EF- α).

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção das mudas

As sementes foram coletadas em áreas isoladas produtoras de um único genótipo de café ou em bordaduras do painel de cultivares do INCT do Café, a fim de garantir a pureza dos genótipos evitando-se a coleta de sementes segregantes.

Sementes dos genótipos Catuaí Vermelho IAC 144, Mundo Novo IAC 367-4, Aranãs RV e Iapar-59 foram obtidas em colheita única, levando-se em conta o período de maturidade frutos. Após a colheita, os frutos foram encaminhados para o Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, no Departamento de Fitopatologia-UFLA, onde foram processados e dispostos à sombra para secagem. O processamento dos frutos consistiu na lavagem, separação e descarte de frutos verdes e passas/secos. Os frutos no estágio cereja foram descascados mecanicamente, submetidos à degomagem por 24h e lavados em água corrente. Após a secagem, as sementes tiveram o pergaminho removido manualmente e foram semeadas em bandeja contendo areia. Dadas as condições climáticas no mês de Junho, as bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 30°C, no escuro, a fim de oferecer condições ótimas para germinação das sementes.

Ao atingirem o estágio “orelha de onça”, as plântulas foram transplantadas para sacos plásticos para mudas (10x20cm) e acondicionadas em casa de vegetação até atingirem 3-4 pares de folhas totalmente expandidas.

5.2. Experimentos para a análise da expressão gênica dos PRRs em resposta a *H. vastatrix* e ao tratamento com indutores de resistência

5.2.1. Inoculação com *H. vastatrix*

A viabilidade do inóculo obtido foi verificada por meio da observação da germinação dos mesmos em lâmina escavada. Após a preparação da suspensão para inoculação (1×10^6 urediniosporos/mL) (FIGURA 2a), três gotas da suspensão obtida foram transferidas para lâmina escavada (FIGURA 2b, a qual foi incubada a 25°C por 24h.

Após a incubação, os esporos foram visualizados em microscópio óptico, sendo possível visualização do tubo germinativo (FIGURA 2c).

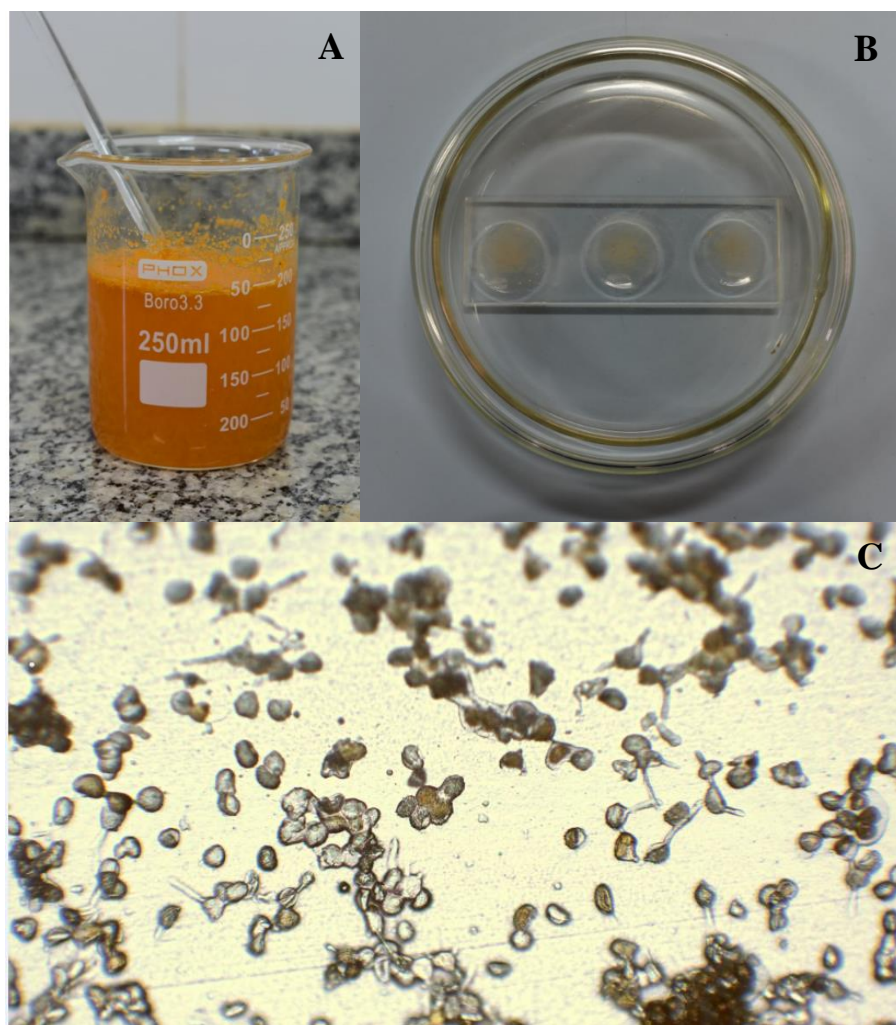


FIGURA 2 – Preparação do inóculo de *H. vastatrix*. a) Suspensão de esporos; b) suspensão em lâmina escavada c) germinação dos esporos observada em microscópio óptico.

Após a inoculação e coleta das folhas para extração do RNA, as plantas foram mantidas em Fitotron a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, com umidade relativa de 90% durante sete dias a fim de garantir o sucesso da inoculação. Após este período as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde foram mantidas até a visualização dos primeiros sintomas e sinais do patógeno, confirmando que a inoculação foi bem sucedida (FIGURA 3).

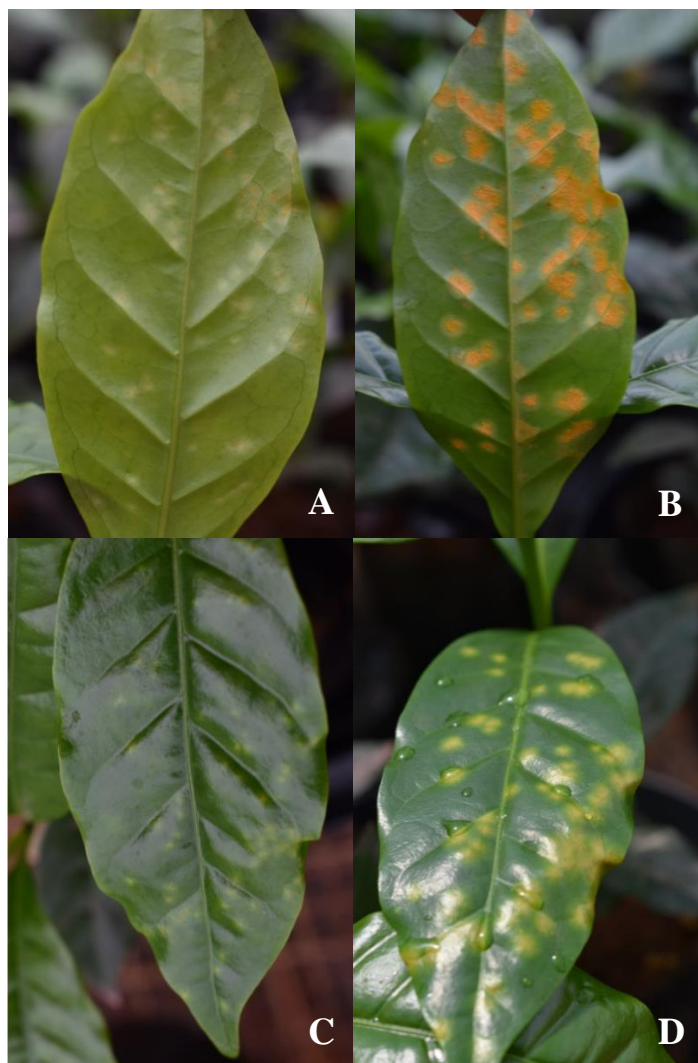


FIGURA 3 – Sintomas e sinais de *H. vastatrix* em mudas de *C. arabica* cultivar Mundo Novo IAC 367-4 a) Face abaxial 20 dias após a inoculação; b) Face abaxial 35 dias após a inoculação c) Face adaxial 20 dias após a inoculação; d) Face adaxial 35 dias após a inoculação

5.3. Identificação dos PRRs específicos para fungos no genoma de *C. arabica*

Foram selecionados 10 genes de referência previamente caracterizados e descritos na literatura como receptores de PAMPs fúngicos (Tabela 2). A sequência peptídica de cada um destes genes foi analisada utilizando-se as ferramentas online SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) e TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) a fim de verificar e caracterizar os domínios nelas contidos.

Tabela 2. Descrição dos genes de referência utilizados

Gene	Receptor	Domínio	Locus	Espécie	Ligante	Referência
CEBiP	RLP	LysM	LOC4331523	<i>O. sativa</i>	quitina	Kaku et al., 2006
CERK1	RLK	LysM	At3g21630	<i>A. thaliana</i>	quitina/PGN	Miya et al., 2007
LIK1	RLK	LRR	At3g14840	<i>A. thaliana</i>	quitina/PGN	Le et al., 2014
LYK4	RLK	LysM	At2g23770	<i>A. thaliana</i>	quitina	Wan et al., 2012
LYK5	RLK	LysM	At2g33580	<i>A. thaliana</i>	quitina	Cao et al., 2014
LYP1	RLP	LysM	At2g17120	<i>A. thaliana</i>	quitina	Shinya et al., 2012
LYP2	RLP	LysM	Os11g34570	<i>O. sativa</i>	-	Liu et al., 2012b
LYP3	RLP	LysM	Os09g37600	<i>O. sativa</i>	-	Liu et al., 2012b
LYP4	RLP	LysM	LOC4347230	<i>O. sativa</i>	quitina	Liu et al., 2012b
LYP6	RLP	LysM	Os06g10660	<i>O. sativa</i>	quitina/PGN	Liu et al., 2012b

PGN: peptideogligano

-: não informado

Em seguida, realizou-se o BLASTp das sequência peptídicas dos genes de referência com o genoma de *C. arabica* disponível no no banco de dados do Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov). Foram selecionados como sequências candidatas os *scaffolds* que apresentaram e-value $\leq 10^{-5}$ e estrutura peptídica semelhante à do peptídeo de referência (presença de domínios Lys, LRR, kinase, transmembrana).

No intuito de reduzir o grande número de sequências candidatas resultantes, foi realizado um alinhamento das sequências peptídicas candidatas com a respectiva referência, seguido de análise filogenética pelo método de Maximum Likelihood. A partir das árvores filogenéticas obtidas (FIGURAS 4 a 13), foram selecionados as melhores sequências do genoma de *C. arabica* candidatas a PRRs.

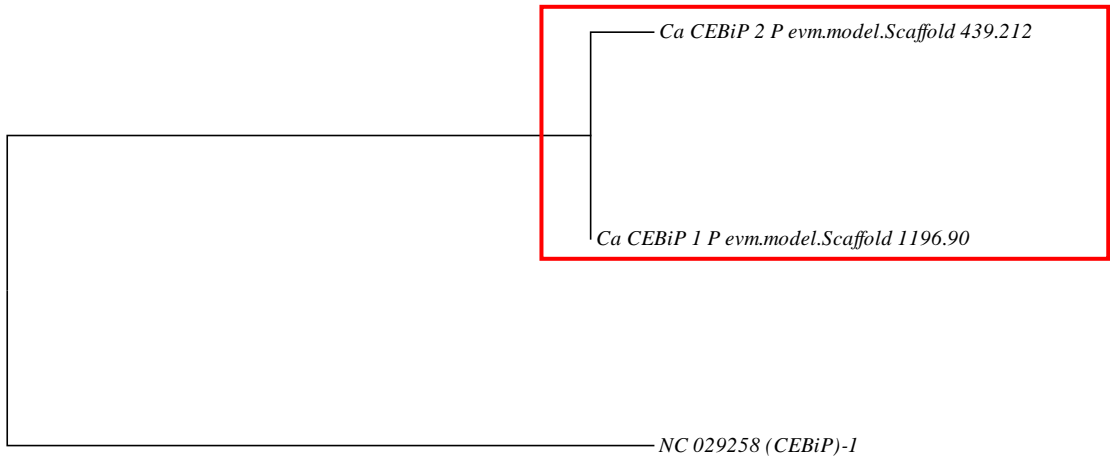


FIGURA 4 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene CEBiP. Os scaffolds do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

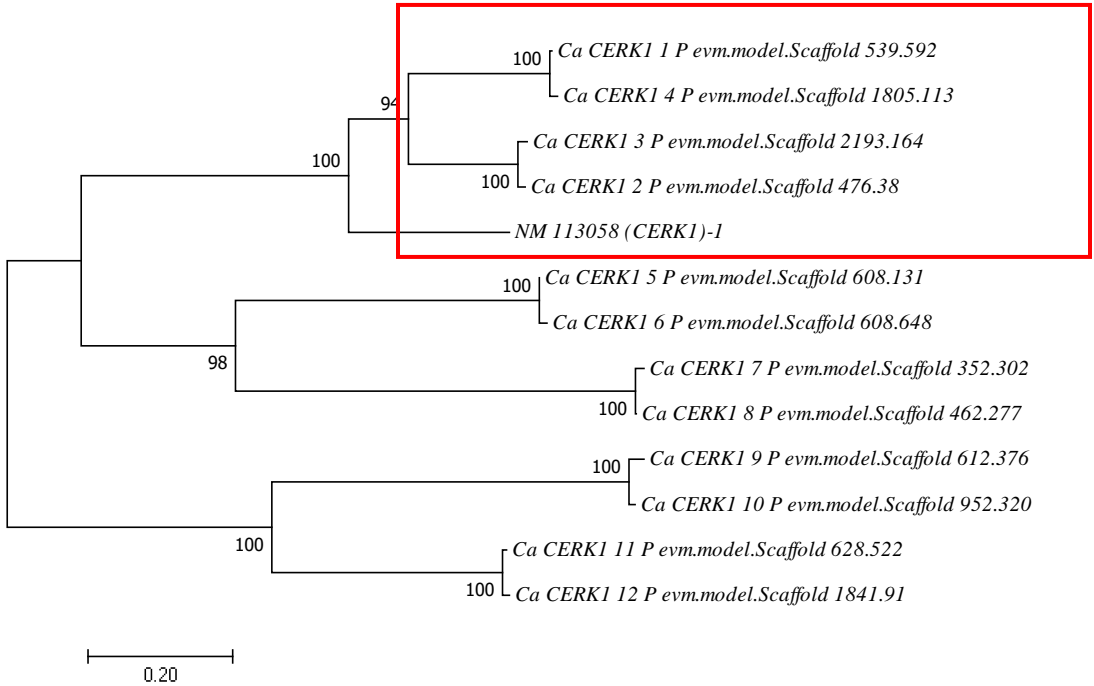


FIGURA 5 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LYP6. Os scaffolds do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

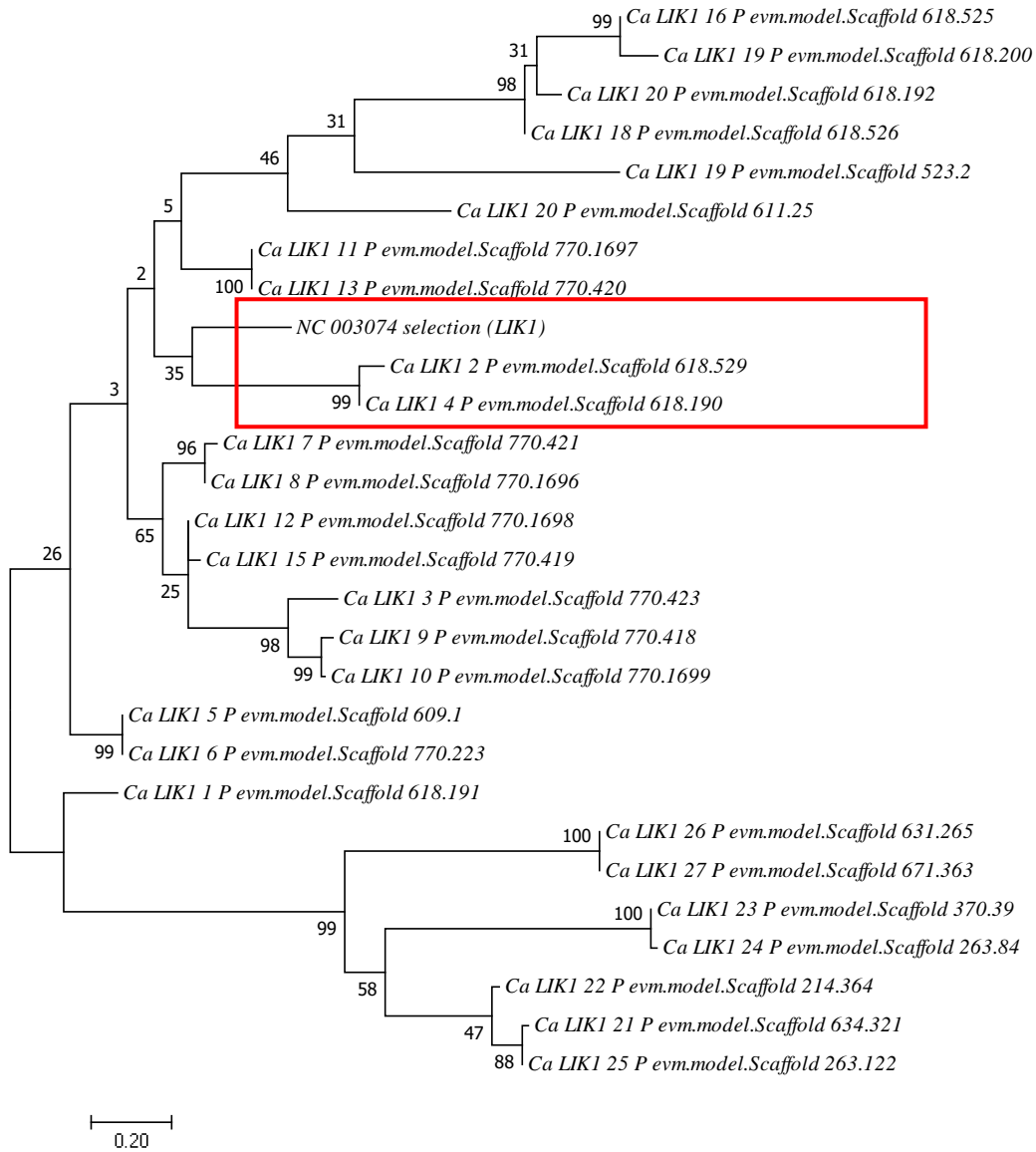


FIGURA 6 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LIK1. Os scaffolds do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

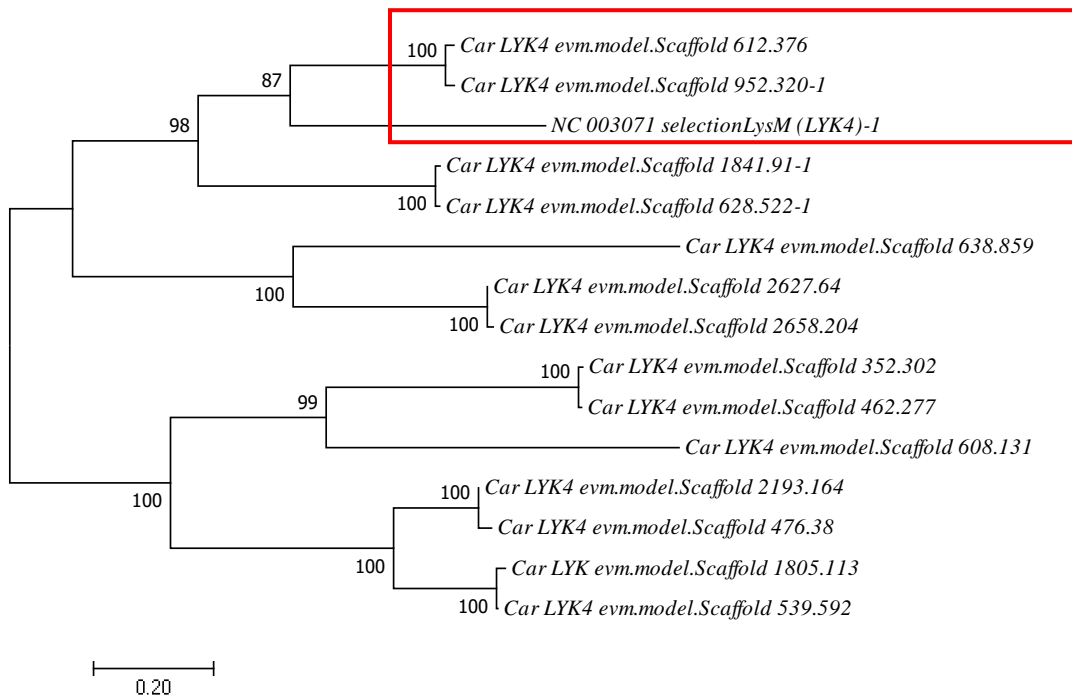


FIGURA 7 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LYK4. Os scaffolds do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

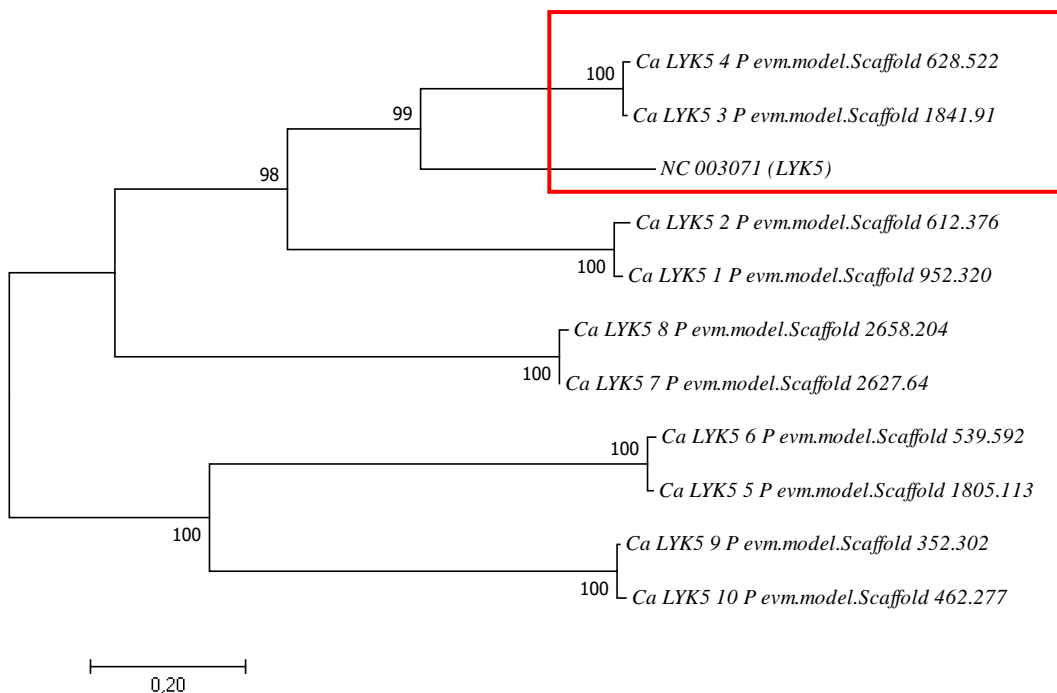


FIGURA 8 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LYK5. Os scaffolds do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

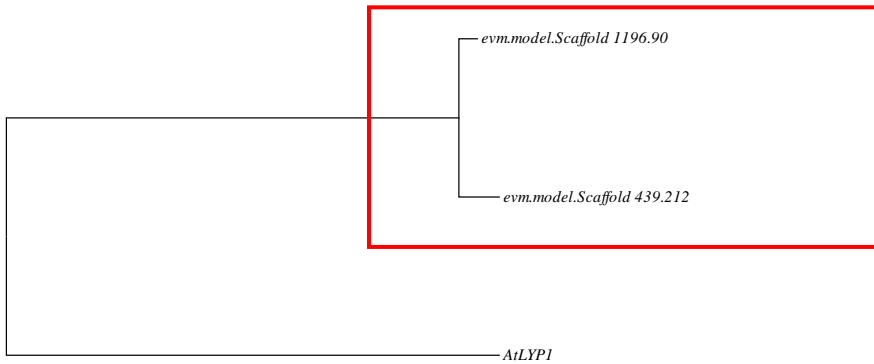


FIGURA 9 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LYP1. Os *scaffolds* do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

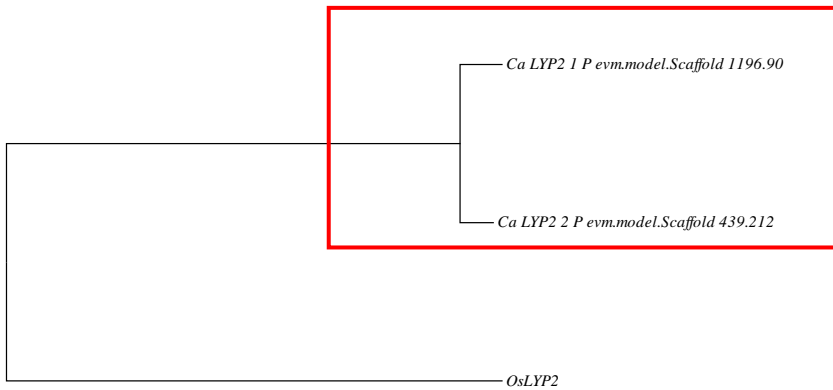


FIGURA 10 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LYP2. Os *scaffolds* do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

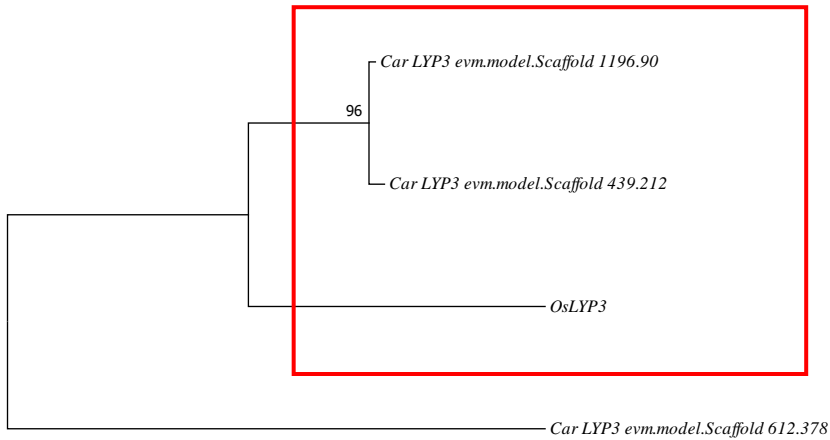


FIGURA 11 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LYP3. Os *scaffolds* do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

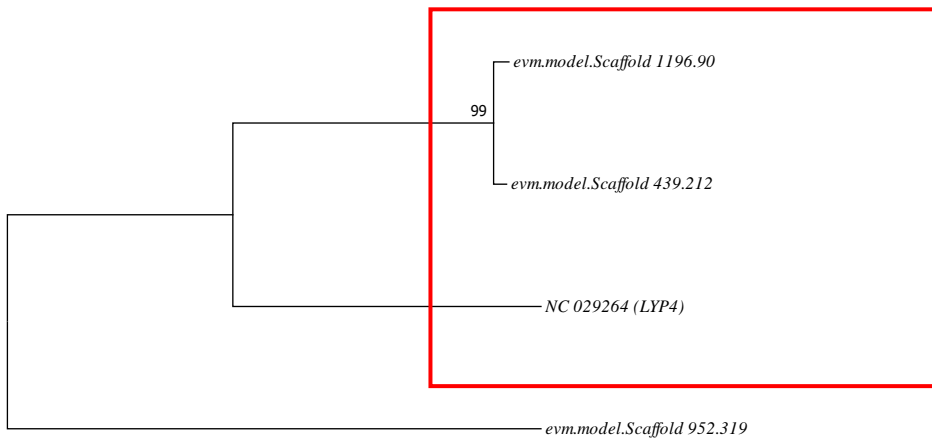


FIGURA 12 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LYP4. Os *scaffolds* do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

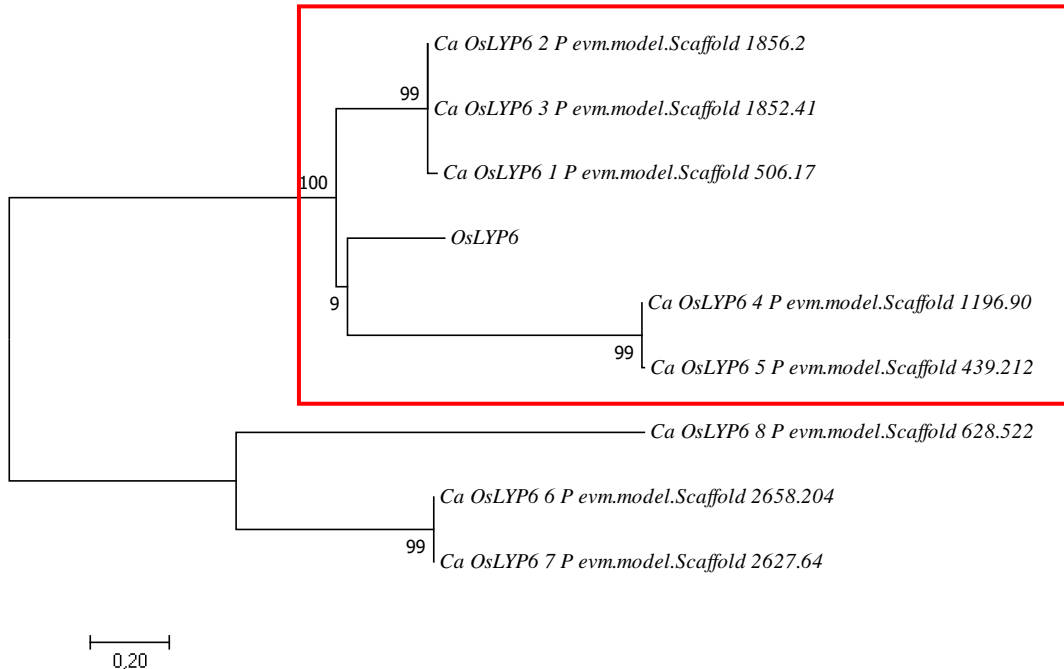


FIGURA 13 – Árvore filogenética para sequência peptídica do gene LYP6. Os *scaffolds* do genoma de *C. arabica* selecionados como sequências candidatas estão marcados em vermelho.

5.4. Desenho e validação dos *primers*

Para cada uma das sequências de *C. arabica* selecionadas como sequências candidatas, foram desenhados *primers* específicos para detecção por qPCR (Tabela 3). As sequências dos *primers* foram obtidas por meio do software Primer Quest (Integrated DNA Technologies, EUA) considerando-se as condições de 200nM de *primers*, 0,4mM de dNTPs e 6mM de MgCl₂.

Para os genes de referência CEBiP, LYP1, LYP2, LYP4, LYP6 e LYP6 os resultados obtidos demonstram *scaffolds* candidatos comuns (#1196.90 e #439.212). Portanto, para o desenho dos *primers*, estas sequências de referência foram agrupadas e denominadas em diante como RLPs. Foram desenvolvidos *primers* para ambos os *scaffolds*.

Tabela 3. *Primers* para detecção das sequências candidatas a PRRs em *C. arabica*.

Gene de Referência	Sequência alvo (Scaffold #)	Primers
CERK1	1805.113	F1: ACATGCCTCCAGAGTATGCCAGT R1: TGCCCAGCTGAGCCATCTTTCTGA F2: TATCCTCCCGAGAATGTTCCCGCC R2: TCCAGTGCTCCAGGTCCATGCA
	2193.164	F1: GCGGTTGGGGATACTTTGCAG R1: ACAACAGACCACTCCCGGAAG
	539.592	F1: CGAGACATTAAGCCAGCTAAC R1: GCATGTAACCGAAAGTACCC F2: CTTACCACGGTTGAGATGTTAC R2: CTCATTGGCTAGGGAAGAAATAG F3: AGTGTAGAAGTGGCTGTGACCTTGC R3: CGCTGTGGATGCTGTCTTGATTTGG F7: CAGCGGTACGAGAATCAACATTCC R7: TCCAGTTCCCATTGTGTCAGATTAGC
	476.38	F1: AGCTGGCATTGCTGTGGGAGTAG R1: GGCTGGAGCAGCTAACTGGAAC TG
LIK1	618.529	F1: AGCGAGCTACCTGTCGACCAAAC R1: ACCGAGCAGAACCACCATCAACTC
	618.190	F2: TGGATTTACCGGAAGCTGCCAAC R2: TCCTTGAGTTGGCCCAGCAATGTC
LYK4	612.376	F2: AAAGGCCACAAACAGATGCGACAG R2: AGGTGGGATGGATCAGCTGCTAAG
	952.320	F1: CGTGACCCAAAGTTGCCAAGC R1: ACAGGAGCAGTTGACGGGAAC
LYK5	1841.91	F1: TTGCAGCATGCCACAGTTCTTTC R1: ATCACTCAGGCCACCTTCTCTGTC
	628.522	F1: CGTAAACTGGAGCACAGCGATGG R1: AGGAATTCTGCCACATCCGAAAC
RLPs	439.212	F1: ACCACCGCCGATGTTCTGTTGC R1: GAGGAACATCGAGAATAGCGCCGG
	1196.90	F2: ACTTGTGACGCCCTGGTTGATTAC R2: TTGGTGCAGATACAGGCGAAAGG F3: TACCACATAGCGGCTGAGGTCTTC R3: TTCTGGCCCGCATAAATCAGGTTG
LYP6*	1856.2	F1: ATGCAGTTGTGGACCGGGGACT R1: GCAACGAGGCTGAAGGGAAGAGGA F6: TCCCTCTTCCACGTCGACCCATT R6: CCGTCGACGCAAGAGCAAGTGATG
	506.17	F1: ACTCCACCACGCTGACTGATC R1: AGTCCCCGATCCACA ACTGC
	1852.41	F1: TCCAAGTACTCTACCACGCTGAC R1: TCCGATGCGTACTTTGGGAAAC

*: não compartilhados com os demais RLPs.

Os *primers* obtidos foram testados por RCR convencional para amplificação do DNA genômico das cultivares em estudo. O DNA das plantas obtidas neste estudo foi extraído utilizando-se o método do CTAB e submetido a PCR com concentrações de *primers*, dNTPs, MgCl₂ e ciclo de amplificação semelhantes ao descrito para qPCR.

No teste preliminar, dentre os 21 pares de *primers* testados, 16 foram capazes de amplificar o DNA de todas as cultivares em estudo (Tabela 4).

Tabela 4. Validação dos *primers* empregando-se a técnica de PCR convencional

Gene Referência	Primer	Iapar-59	Aranãs RV	Catuaí Verm. IAC 144	Mundo Novo IAC 367-4
CERK1	1805.113F1/1805.113R1	-	-	-	-
CERK1	1805.113F2/1805.113R2	-	-	-	-
CERK1	539.592F2/539.592R2	+	+	+	+
CERK1	476.38F1/476.38R1	+	+	+	+
LIK1	618.529F1/618.529R1	-	-	-	-
LIK1	618.190F2/618.190R2	+	+	+	+
LYK4	612.376F2/612.376R2	+	+	+	+
LYK5	1841.91F1/1841.91R1	+	+	+	+
LYK5	628.522F1/628.522R1	+	+	+	+
RLPs	439.212F1/439.212R1	+	+	+	+
RLPs	1196.90F2/1196.90R2	+	+	+	+
LYP6	1856.2F1/1856.2R1	+	+	+	+
LYP6	1852.41F1/1852.41R1	-	-	-	-
CERK1	539.592F3/539.592R3	+	+	+	+
CERK1	539.592F7/539.592R7	+	+	+	+
RLPs	1196.90F3/1196.90R3	+	+	+	+
LYP6	1856.2F6/1856.2R6	+	+	+	+
CERK1	2193.164F1/2193.164R1	+	+	+	+
CERK1	539.592F1/539.592R1	+	+	+	+
LYK4	925.320F1/925.320R1	+	+	+	+
LYP6	506.17F1/506.17R1	-	-	-	-

+: positivo

-: negativo

De posse dos resultados da análise preliminar, os *primers* foram submetidos ao teste de eficiência e obtenção da curva padrão, a fim de se determinar a melhor diluição do cDNA a ser utilizada na qPCR. Foram selecionados para o estudo de expressão gênica, quatro pares de *primers* representativos dos grupos de PRRs das sequências candidatas (Tabela 5). Os requisitos estabelecidos para seleção dos melhores *primers* foram: 1) valores

de eficiência entre 80 e 110%; 2) coeficiente de determinação (R^2) próximo de 1,0 (100%) e 3) curva de melt com pico único.

Tabela 5. *Primers* selecionados para estudo da expressão gênica (genes de interesse e referências constitutivas).

Gene	Primer	Eficiência	R^2
CERK1 (candidato)	539.592F1/539.592R1	104,432	0,993
RLP (candidato)	439.212F1/439.212R1	107,958	0,993
LYK4 (candidato)	612.376F2/612.376R2	82,182	0,993
LYK5 (candidato)	1841.91F1/1841.91R1	108,512	0,989
24S (referência)	24SF/24SR	90,976	0,993
EF-1 α (referência)	EF-1 α F/EF-1 α R	91,317	0,994

5.5. Estudo da expressão gênica em resposta a *H. vastatrix*

A análise da expressão dos PRRs candidatos em estudos revelou, de modo geral, forte influência do tempo decorrido após a inoculação. Além disso, os resultados revelaram diferenças no comportamento das cultivares em estudo no que diz respeito aos níveis de expressão de alguns dos genes estudados. Todo o experimento foi realizado duas vezes com a finalidade de assegurar a repetibilidade dos resultados obtidos. Como não houveram diferenças estatísticas entre as duas repetições do experimento, os dados apresentados correspondem à média de ambas.

Para o gene candidato a CERK1 de *C. arabica* (*CaCERK1*), observou-se forte aumento nos níveis de expressão 6 horas após a inoculação (Figura 14). Além disso, este aumento tona-se especialmente evidente nas cultivares Catuaí Vermelho e Aranãs, seguido de um decréscimo da expressão passadas 24h da inoculação. Na cultivar IAPAR, a expressão do *CaCERK1* candidato mostrou-se menos responsiva à inoculação que nas demais cultivares estudadas.

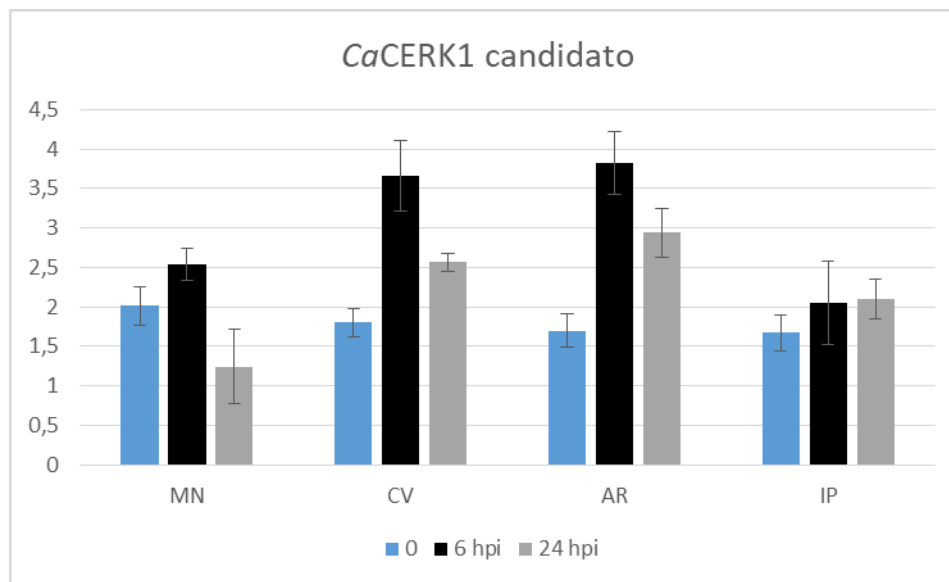


FIGURA 15 – Expressão gênica do *CaCERK1* candidato em resposta à inoculação com *H. vastatrix*. MN: Mundo Novo IAC 367-4; CV: Catuaí Vermelho IAC 144; AR: Aranãs RV; IP: Iapar-59.

Diferentemente do comportamento observado para o candidato *CaCERK1*, o perfil de expressão do PRR candidato *CaRLP* (*Receptor-like protein*) não apresentou variações significativas em função da inoculação com *H. vastatrix* (Figura 16).

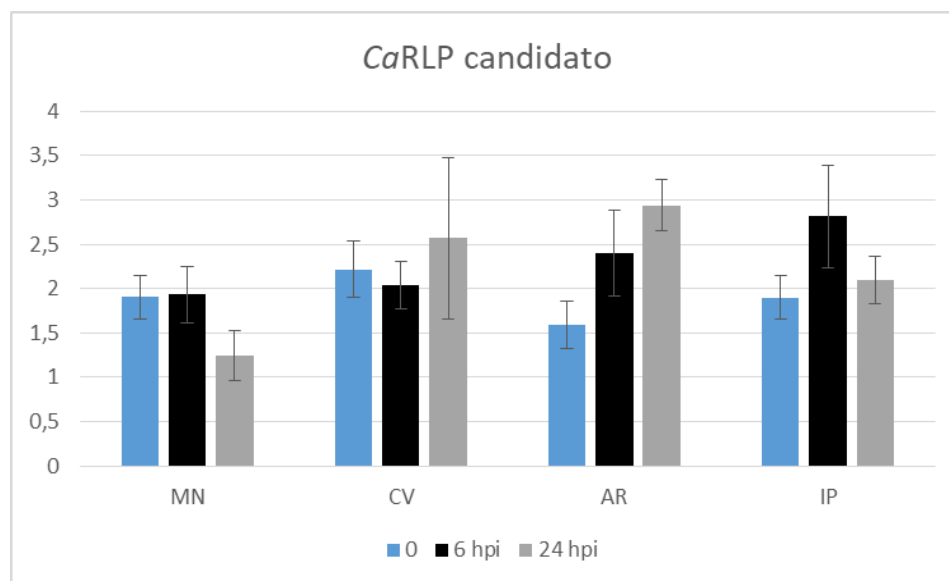


FIGURA 16 – Expressão gênica do *CaRLP* candidato em resposta à inoculação com *H. vastatrix*. MN: Mundo Novo IAC 367-4; CV: Catuaí Vermelho IAC 144; AR: Aranãs RV; IP: Iapar-59.

Os candidatos *CaLYK4* e *CaLYK5*, assim como o *CERK1* são receptores do tipo RLK com motivo de lisina no domínio extracelular. Ambos também demonstraram aumento nos níveis de expressão em função da inoculação com *H. vastatrix*. Porém, diferente do candidato *CaCERK1*, os níveis de expressão dos candidatos *CaLYK4* e *CaLYK5* aumentaram progressivamente após a inoculação (Figuras 17 e 18)

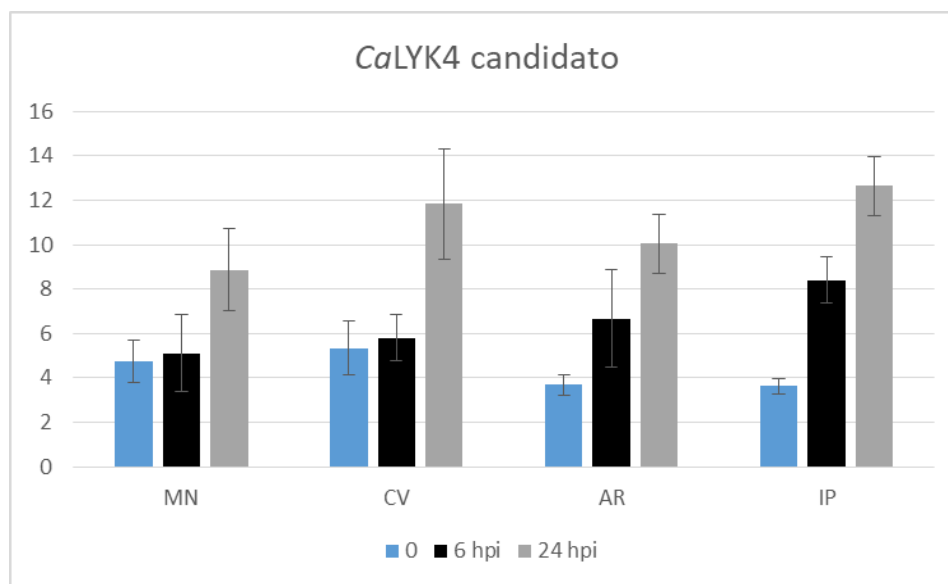


FIGURA 17 – Expressão gênica do *CaLYK4* candidato em resposta à inoculação com *H. vastatrix*. MN: Mundo Novo IAC 367-4; CV: Catuaí Vermelho IAC 144; AR: Aranãs RV; IP: Iapar-59.

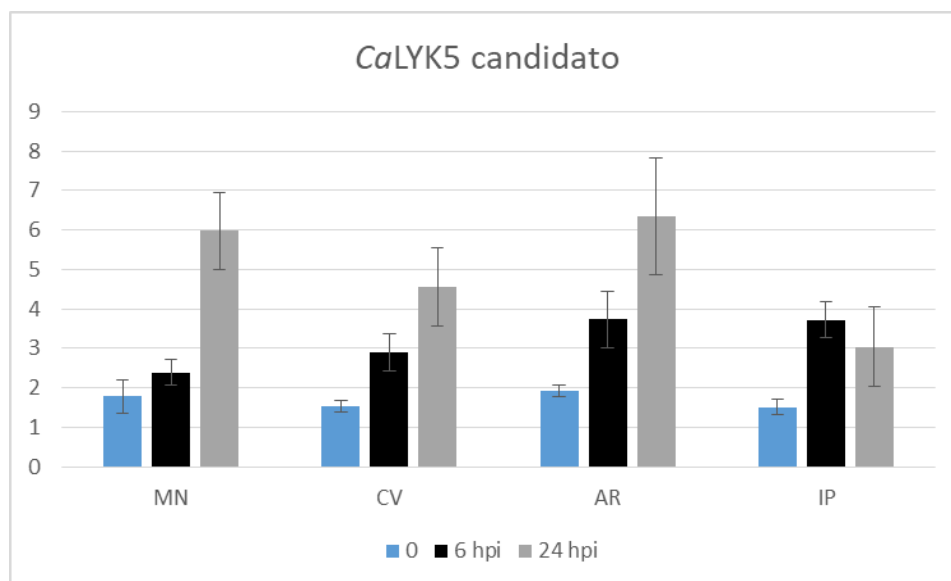


FIGURA 18 – Expressão gênica do *CaLYK5* candidato em resposta à inoculação com *H. vastatrix*. MN: Mundo Novo IAC 367-4; CV: Catuaí Vermelho IAC 144; AR: Aranãs RV; IP: Iapar-59.

Especialmente para o candidato *CaLYK4*, nota-se que houve um aumento significativo nos níveis de expressão deste gene nas primeiras 6h após a inoculação nas cultivares Aranãs RV e Iapar-59 (Figura 17), as quais são resistente à ferrugem do cafeeiro. Enquanto que nas cultivares suscetíveis Mundo Novo IAC 367-4 e Catuaí Vermelho IAC 144, tal aumento é observado somente após 24h da inoculação com o patógeno.

6. DISCUSSÃO

Dentre os quatro genes selecionados no presente estudo, somente o gene candidato *CaCERK1* apresentou padrões de expressão capazes de demonstrar diferenças entre as cultivares avaliadas quanto à resposta ao patógeno em estudo. As cultivares Catuaí Vermelho IAC 144 e Aranãs RV apresentaram os maiores níveis de expressão 6 horas após a inoculação, quando comparadas às cultivares Mundo Novo IAC 367-4 e Aranãs RV.

No entanto, nota-se grande discrepância entre os níveis de expressão observados entre as cultivares suscetíveis Mundo Novo IAC 367-4 e Catuaí Vermelho IAC 144, bem como entre as cultivares resistente Aranãs RV e Iapar-59, o que não era esperado. No primeiro caso, ainda que ambas as cultivares sejam consideradas suscetíveis à ferrugem, é sabido que alguns pesquisadores tem observado maior suscetibilidade na cultivar Mundo

Novo IAC 367-4, quando comparada à cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Contudo, não existem estudos que justifiquem tais diferenças baseadas em evidências bioquímicas ou moleculares. Em relação às cultivares resistentes, estudos recentes tem observado o fenômeno conhecido como “quebra de resistência” na cultivar Aranãs RV (dados não publicados). Apesar desta cultivar ser conhecida por apresentar resistência completa (HR) ao patógeno causador da ferrugem alaranjada, já foi observada a ocorrência de sintomas leves da doença em plantas da cultivar Aranãs RV. No entanto, o nível de resistência apresentado é bastante significativo, o que pode sugerir bons níveis de resistência horizontal, ou seja, atuação dos mecanismos de defesa relacionados à imunidade disparada por PAMPs. Nesse caso, espera-se que a expressão de receptores *CERK1-like* seja fortemente induzida, como observado no presente estudo.

O gene *CERK1* já foi descrito em várias espécies e é relatado na literatura como o principal PRR envolvido no reconhecimento de quitina (MIYA et al., 2007; SHIMIZU et al., 2010; CAO et al., 2014; TANG, WANG, ZHOU, 2017; ZHOU et al., 2018). Os resultados apresentados sugerem que a expressão do candidato *CaCERK1* estudado é induzido pela presença do fungo, mais especificamente pelo reconhecimento da quitina presente na parede celular do patógeno. No entanto, é importante ressaltar que estudos mais aprofundados são necessários para caracterizar definitivamente este gene em estudo como *CaCERK1*. Para isso, é fundamental estabelecer o sítio de ligação do produto do gene em questão com a molécula de quitina, bem como a verificação da indução da expressão pela presença deste polissacarídeo isoladamente.

Os genes *LYK4* e *LYK5* já tiveram sua importância relatada para a imunidade inata em *Arabidopsis thaliana*, sendo que o produto do último é considerado o principal receptor de quitina nesta espécie, formando um complexo com o produto do gene *CERK1* (WAN et al., 2012; CAO et al., 2014). No presente trabalho, ambos os genes candidatos *CaLYK4* e *CaLYK5* apresentaram um aumento progressivo nos níveis de expressão ao longo dos tempos avaliados, comportamento este que foi similar nas quatro cultivares em estudo.

Portanto, os resultados sugerem que, possivelmente, a expressão dos receptores *CaLYK4* e *CaLYK5* é continuamente induzida pela presença do patógeno/quitina, de forma semelhante nas cultivares analisadas. Por outro lado, a expressão do gene *CERK1* é variável entre as cultivares em estudo, o que pode estar relacionado a possíveis interações

com o produto dos genes *CaLYK4* e *CaLYK5*, resultando em última instância, em diferentes níveis de resistência de *C. arabica* a *H. vastatrix*

O gene candidato *CaRLP* não apresentou padrão de expressão com variações significativas em resposta à inoculação com *H. vastatrix*. Este resultado não é conclusivo, uma vez que a expressão constitutiva deste gene não implica, necessariamente, que este não esteja envolvido nos processos de reconhecimento e sinalização de patógenos fúngicos relacionados à imunidade inata de plantas à patógenos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O recente sequenciamento do genoma de *C. arabica* representa um enorme avanço no estudo das bases moleculares da interação do cafeeiro e seus patógenos, principalmente, *H. vastatrix*. Dada a importância da ferrugem para a cafeicultura, é urgente o estudo e caracterização de genes envolvidos nos mecanismos de resistência de plantas a patógenos. Com a publicação das sequências genômicas de *C. arabica*, o presente trabalho sofreu grandes mudanças no seu escopo desde a submissão da proposta inicial, facilitando enormemente a identificação de sequências homólogas à de PRRs já descritos em outras espécies vegetais.

PRRs candidatos foram identificados com sucesso, e para três dos quatro genes selecionados, observou-se aumento nos níveis de expressão em função inoculação com o *H. vastatrix*. Os resultados obtidos representam um passo importante na caracterização definitiva e validação dos genes estudados como PRRs de *C. arabica*. Além disso, os 21 pares primers desenvolvidos neste trabalho permitem o estudo detalhado destes e de outros possíveis PRRs (além dos quatro selecionados para estudo da expressão gênica) em relação à outros patógenos fúngicos, uma vez que estes genes constituem um mecanismo de defesa de amplo espectro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, M. Peptides as triggers of plant defence. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 17, p. 5269–5279, 2013.

AMBORABÉ, B. E.; BONMORT, J.; FLEURAT-LESSARD, P.; ROBLIN, G. Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 9, p. 2317–2324, 2008.

AVELINO, J.; CRISTANCHO, M.; GEORGIU, S.; IMBACH, P.; AGUILAR, L.; BORNEMANN, G.; LÄDERACH, P.; ANZUETO, F.; HRUSKA, A. J.; MORALES, C. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, v. 7, n. 2, p. 303–321, 2015.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F.; SEVERINO, F. E.; MALUF, M. P.; MAIA, I. G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology*, v. 10, p. 1, 2009.

BECK, M.; HEARD, W.; MBENGUE, M.; ROBATZEK, S. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 15, n. 4, p. 367–374, ago. 2012.

BENT, A. F.; MACKAY, D. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology*, v. 45, n. 1, p. 399–436, 2007.

BENTHAM, A.; BURDETT, H.; ANDERSON, P. A.; WILLIAMS, S. J.; KOBE, B. Animal NLRs provide structural insights into plant NLR function. *Annals of Botany*, v. 119, n. 5, p. 689–702, 2017.

BETTENCOURT, A. J.; CARVALHO, A. Melhoramento visando a resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia*, v. 27, n. 1, p. 35–68, 1967.

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, v. 8, n. 4, p. 521–539, 2015.

BOHM, H.; ALBERT, I.; FAN, L.; REINHARD, A.; NURNBERGER, T. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 20, p. 47–54, 2014.

BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, v. 60, n. 1, p. 379–406, 2009.

BOUTROT, F.; ZIPFEL, C. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 55, n. 1, p. annurev-phyto-080614-120106, 2017.

- BOWDEN, J.; GREGORY, P. H.; JOHNSON, C. G. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature*, v. 229, n. 5285, p. 500–501, 1971.
- BOYD, L. A.; RIDOUT, C.; O’SULLIVAN, D. M.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Plant-pathogen interactions: Disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, v. 29, n. 4, p. 233–240, 2013.
- CABRAL, P. G. C.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; OLIVEIRA, S. A. S.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, L. Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*, v. 65, n. 2, p. 196–204, 2016.
- CABRAL, P. G. C.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; T. P. LELIS; CAPUCHO, A. S.; T. CAIXETA, E. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Pathology Society*, v. 4, n. 1, p. 129–130, 2009.
- CAO, Y.; LIANG, Y.; TANAKA, K.; NGUYEN, C. T.; JEDRZEJCZAK, R. P.; JOACHIMIAK, A.; STACEY, G. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife*, v. 3, p. 1–19, 2014.
- CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, E. M.; FREITAS, R. L.; HADDAD, F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, L. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, v. 7, n. 1, p. 189–191, 2012.
- CLOONAN, N. et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature Methods* 5, 613–619, 2008.
- CONAB. 2º Levantamento da Safra de Café de 2018 - maio 2018. Acompanhamento da safra brasileira de café, v. 5, n. 1, p. 70, 2018.
- COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, p. 537–552, 2016.
- CRUZ, F.; KALAOUN, S.; NOBILE, P.; COLOMBO, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L. M. G.; ROMANO, E.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; VASLIN, M.; ALVES-FERREIRA, M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding*, v. 23, n. 4, p. 607–616, 2009.
- DALIO, R. J. D.; MAGALHÃES, D. M.; ATÍLIO, L. B.; RODRIGUES, C. M.; BRETON, M. C.; PICHÍ, S.; PASCHOLATI, S.; MACHADO, M. A. Efeitos nas Interações planta-patógeno. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 22, p. 25–68, 2014.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, v. 411, n. June, p. 826–833, 2001.

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

DENOEUDE, F., CARRETERO-PAULET, L., DEREPPER, A., DROC, G., GUYOT, R., PIETRELLA, M., AURY, J. M. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. v. 345, n. 6201, 2014.

DEYOUNG, B. J.; INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology*, v. 7, n. 12, p. 1243–1249, dez. 2006.

DINIZ, I.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H. G.; VÁRZEA, V.; MEDEIRA, C.; MAIA, I.; PETITOT, A. S.; NICOLE, M.; FERNANDEZ, D.; CÉU SILVA, M. DO. 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*, v. 133, n. 1, p. 141–157, 2012.

EMBRAPA. Brasil consome 21,5 milhões de sacas de café em 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31768082/brasil-consome-215-milhoes-de-sacas-de-cafe-em-2017>>. Acesso em: 5 out. 2018.

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

FLIEGMANN, J.; MITHÖFER, A.; WANNER, G.; EBEL, J. An Ancient Enzyme Domain Hidden in the Putative β -Glucan Elicitor Receptor of Soybean May Play an Active Part in the Perception of Pathogen-associated Molecular Patterns during Broad Host Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 2, p. 1132–1140, 2004.

FURUKAWA, T.; INAGAKI, H.; TAKAI, R.; HIRAI, H.; CHE, F.-S. Two Distinct EF-Tu Epitopes Induce Immune Responses in Rice and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 27, n. 2, p. 113–124, 2014.

GODOY, C. V.; FILHO BERGAMIM, A. Doenças do Cafeeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. R. J. A. M. (Ed.). Manual de fitopatologia. 3. ed. São Paulo - SP: Ceres, 1997. p. 180–183.

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, v. 5, n. 6, p. 1003–1011, 2000.

GRANADO, J.; FELIX, G.; BOLLER, T. Perception of Fungal Sterols in Plants. *Plant Physiology*, v. 107, n. 1995, p. 485–490, 1995.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, n. 4, p. 414–420, ago. 2006.

GUST, A. A.; BISWAS, R.; LENZ, H. D.; RAUHUT, T.; RANF, S.; KEMMERLING, B.; GÖTZ, F.; GLAWISCHNIG, E.; LEE, J.; FELIX, G.; NÜRNBERGER, T. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 44, p. 32338–32348, 2007.

HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, n. April, p. 1–5, 2012.

HAN, D. R.; RATHJEN, J. P. Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal*, v. 49, n. 4, p. 607–618, 2007.

HEGENAUER, V.; FÜRST, U.; KAISER, B.; SMOKER, M.; ZIPFEL, C. Detection of the plant parasite *Cuscuta reflexa* by a tomato cell surface receptor. v. 353, n. 6298, 2016.

HIND, S. R. et al. Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nature Plants*, v. 2, n. 9, p. 1–8, 2016.

ICO. Relatório sobre o mercado de café. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 5 out. 2018.

JEWORUTZKI, E.; ROELFSEMA, M. R. G.; ANSCHÜTZ, U.; KROL, E.; ELZENGA, J. T. M.; FELIX, G.; BOLLER, T.; HEDRICH, R.; BECKER, D. Early signaling through the arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant Journal*, v. 62, n. 3, p. 367–378, 2010.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

KAKU, H.; NISHIZAWA, Y.; ISHII-MINAMI, N.; AKIMOTO-TOMIYAMA, C.; DOHMAE, N.; TAKIO, K.; MINAMI, E.; SHIBUYA, N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. p. 1–6, 2006.

KLEMPNER, R. L.; SHERWOOD, J. S.; TUGIZIMANA, F.; DUBERY, I. A.; PIATER, L. A. Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP). *Molecular Plant Pathology*, v. 15, n. 7, p. 747–761, 2014.

KOURELIS, J.; HOORN, R. A. L. VAN DER. Defended to the Nines: 25 years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *The Plant Cell*, p. tpc.00579.2017, 2018.

KUNZE, G.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NIEHAUS, K.; BOLLER, T.; FELIX, G. The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in *Arabidopsis* Plants. *the Plant Cell Online*, v. 16, n. 12, p. 3496–3507, 2004.

LACOMBE, S. et al. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 365–369, 2010.

- LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics*, v. 261, p. 259–266., 1999.
- LE, M. H.; CAO, Y.; ZHANG, X. C.; STACEY, G. Lik1, a cerk1-interacting kinase, regulates plant immune responses in arabidopsis. *PLoS ONE*. 9:e102245, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0102245.
- LEE, S.; WHITAKER, V. M.; HUTTON, S. F. Potential applications of non-host resistance for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1–6, 2016.
- LIU, B.; LI, J. F.; AO, Y.; QU, J.; LI, Z.; SU, J. Lysin Motif-Containing Proteins LYP4 and LYP6 Play Dual Roles in Peptidoglycan and Chitin Perception in Rice Innate Immunity. *The Plant Cell*, v. 24, n. 8, p. 3406–3419, 2012b.
- LIU, T. et al. Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science*, v. 336, n. 6085, p. 1160–1164, 2012a.
- MA, Y.; WALKER, R. K.; ZHAO, Y.; BERKOWITZ, G. A. Linking ligand perception by PEPRMA, Y.; WALKER, R. K.; ZHAO, Y.; BERKOWITZ, G. A. Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 48, p. 19852–19857, 2012.
- MACHO, A. P.; ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, v. 54, n. 2, p. 263–272, 2014.
- MCCOOK, S.; VANDERMEER, J. The Big Rust and the Red Queen: Long-Term Perspectives on Coffee Rust Research. *Phytopathology*, v. 105, n. 9, p. 1164–1173, 2015.
- MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 50, n. 3, p. 500–513, 2007.
- MIYA, A.; ALBERT, P.; SHINYA, T.; DESAKI, Y.; ICHIMURA, K.; SHIRASU, K.; NARUSAKA, Y.; KAWAKAMI, N.; KAKU, H.; SHIBUYA, N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 49, p. 19613–19618, 2007.
- MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 15, n. 4, p. 349–357, 2012.
- MONTEIRO, A. C. A.; RESENDE, M. L. V. DE; VALENTE, T. C. T.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; PEREIRA, V. F.; COSTA, J. R. DA; SILVA, J. A. G. DA. Manganese phosphite in coffee defense against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. *Journal of Phytopathology*, v. 164, p. 1043–1053, 2016.

MOTT, G. A.; GUTTMAN, D. S.; DESVEAUX, D. The study of pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 39, n. 3, p. 275–281, 2017.

NAGALAKSHMI, U. et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320, 1344–1349, 2008.

NAITO, K.; TAGUCHI, F.; SUZUKI, T.; INAGAKI, Y.; TOYODA, K.; SHIRAIISHI, T.; ICHINOSE, Y. Amino Acid Sequence of Bacterial Microbe-Associated Molecular Pattern flg22 Is Required for Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 21, n. 9, p. 1165–1174, 2008.

NOMURA, H. et al. Chloroplast-mediated activation of plant immune signaling in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, v. 3, p. 926–2012, 2012.

NOOKAEW, I.; PAPINI, M.; PORNPUTTAPONG, N.; SCALCINATI, G.; FAGERBERG, L.; UHLEN, M.; NIELSEN, J. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: A case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 40, 10084–10097, 2012.

NORONHA-WAGNER, M.; BETTENCOURT, A. J. Genetic study of the resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. *Canadian Journal of Botany*, v. 45, p. 2021–2031, 1967.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: Emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, n. 4, p. 318–324, 2002.

PERIYANNAN, S.; MILNE, R. J.; FIGUEROA, M.; LAGUDAH, E. S.; DODDS, P. N. An overview of genetic rust resistance: From broad to specific mechanisms. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 7, p. 1–6, 2017.

PETROCELLI, S.; TONDO, M. L.; DAURELIO, L. D.; ORELLANO, E. G. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, 2012.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45, 2001.

PIZARRO, L.; LEIBMAN-MARKUS, M.; SCHUSTER, S.; BAR, M.; MELTZ, T.; AVNI, A. Tomato Prenylated RAB Acceptor Protein 1 Modulates Trafficking and Degradation of the Pattern Recognition Receptor LeEIX2, Affecting the Innate Immune Response. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. March, p. 1–15, 2018.

PRAKASH, N. S.; MARQUES, D. V.; VARZEA, V. M. P.; SILVA, M. C.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 109, n. 6, p. 1311–1317, 2004.

RAMIRO, D. A.; ESCOUTE, J.; PETITOT, A. S.; NICOLE, M.; MALUF, M. P.; FERNANDEZ, D. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*, v. 58, n. 5, p. 944–955, 2009.

RANF, S. Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 38, p. 68–77, 2017.

RANF, S.; ESCHEN-LIPPOLD, L.; PECHER, P.; LEE, J.; SCHEEL, D. Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant Journal*, v. 68, n. 1, p. 100–113, 2011.

RESENDE, M. L. V.; BARRETTI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L.; SILVA, D. D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. O.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, M. A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. *Rapp*, v. 14, n. May 2017, p. 129–198, 2007.

RESENDE, M.; SALGADO, S.; CHAVES, Z. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 2, p. 123–130, 2003.

RODRIGUES, C. J.; BETTENCOURT, A. J.; RIJO, L. Races of the Pathogen and Resistance to Coffee Rust. *Annual Review of Phytopathology*, v. 13, n. 1, p. 49–70, 1975.

RON, M.; KANTETY, R.; MARTIN, G. B.; AVIDAN, N.; ESHED, Y.; ZAMIR, D.; AVNI, A. High-resolution linkage analysis and physical characterization of the EIX-responding locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 100, n. 2, p. 184–189, 2000.

SERA, G. H.; TUMORU, S.; BATISTA, I. C. D. F.; ITO, D. S. Resistance to leaf rust in coffee cultivars. *Coffee Science*, v. 4, n. 1, p. 59–66, 2010.

SERRANO, M.; COLUCCIA, F.; TORRES, M.; L'HARIDON, F.; MÉTRAUX, J.-P. The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, n. June, p. 1–8, 2014.

SHIGUEOKA, L. H.; SERA, G. H.; SERA, T.; BATISTA FONSECA, C. DE; JUNIOR, V. M.; ANDREAZI, E.; CARVALHO, F. G.; GARDIANO, C. G.; CARDUCCI, F. C. Selection of Arabic coffee progenies with rust resistance. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 14, p. 88–93, 2014.

SHIMIZU, T.; NAKANO, T.; TAKAMIZAWA, D.; DESAKI, Y.; ISHII-MINAMI, N.; NISHIZAWA, Y.; MINAMI, E.; OKADA, K.; YAMANE, H.; KAKU, H.; SHIBUYA, N. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant Journal*, v. 64, n. 2, p. 204–214, 2010.

SHINYA, T.; MOTOYAMA, N.; IKEDA, A.; WADA, M.; KAMIYA, K.; HAYAFUNE, M.; et al. Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in *Arabidopsis* and

rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. *Plant Cell Physiol*, 53:1696, 2012.

SILVA, M. C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES, C. J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 60, n. 4, p. 169–183, 2002.

SILVA, M. D. C.; VÁRZEA, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; AZINHEIRA, H. G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A. S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: Leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, n. 1, p. 119–147, 2006.

SUN, Y.; LI, L.; MACHO, A. P.; HAN, Z.; HU, Z.; ZIPFEL, C.; ZHOU, J. M.; CHAI, J. Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science*, v. 342, n. 6158, p. 624–628, 2013.

TAKAI, R.; ISOGAI, A.; TAKAYAMA, S.; CHE, F.-S. Analysis of Flagellin Perception Mediated by flg22 Receptor OsFLS2 in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 21, n. 12, p. 1635–1642, 2008.

TALHINHAS, P. et al. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, v. 18, n. 8, p. 1039–1051, 2017.

TANG, D.; WANG, G.; ZHOU, J.-M. Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *The Plant Cell*, v. 29, n. 4, p. 618–637, 2017.

THOMMA, B. P. H. J.; NÜRNBERGER, T.; JOOSTEN, M. H. A. J. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell*, v. 23, n. 1, p. 4–15, 2011.

TRAN, H. T. M.; RAMARAJ, T.; FURTADO, A.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. Use of a draft genome of coffee (*Coffea arabica*) to identify SNPs associated with caffeine content. *Plant Biotechnology Journal*, v. 9, p. 1756–1766, 2018.

TRDÁ, L.; FERNANDEZ, O.; BOUTROT, F.; HÉLOIR, M. C.; KELLONIEMI, J.; DAIRE, X.; ADRIAN, M.; CLÉMENT, C.; ZIPFEL, C.; DOREY, S.; POINSSOT, B. The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. *New Phytologist*, v. 201, n. 4, p. 1371–1384, 2014.

TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, n. 4, p. 459–465, 1 ago. 2010.

USDA. Coffee : World Markets and Trade. 2018.

WAN, J.; TANAKA, K.; ZHANG, X.-C.; SON, G. H.; BRECHENMACHER, L.; NGUYEN, T. H. N.; STACEY, G. Lyk4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for

chitin signaling and plant innate immunity in arabidopsis. *Plant Physiology*. 160(1):396–406, 2012.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 10, 57–6, 2009

YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, n. 4, p. 351–357, 2011.

YANG, X.; DENG, F.; RAMONELL, K. M. Receptor-like kinases and receptor-like proteins: Keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. *Frontiers in Biology*, v. 7, n. 2, p. 155–166, 2012.

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

ZEIDLER, D.; ZHRINGER, U.; GERBER, I.; DUBERY, I.; HARTUNG, T.; BORS, W.; HUTZLER, P.; DURNER, J. From The Cover: Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 44, p. 15811–15816, 2004.

ZHOU, Z.; TIAN, Y.; CONG, P.; ZHU, Y. Plant Science Functional characterization of an apple (*Malus x domestica*) LysM domain receptor encoding gene for its role in defense response. *Plant Science*, v. 269, n. October 2017, p. 56–65, 2018.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 12, n. 4, p. 414–420, 2009.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J. D. G.; BOLLER, T.; FELIX, G. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell*, v. 125, n. 4, p. 749–760, 2006.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NAVARRO, L.; OAKELEY, E. J.; JONES, J. D. G.; FELIX, G.; BOLLER, T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, v. 428, n. April, p. 15–18, 2004