

LUCAS FAGUNDES DA SILVA

**ANÁLISE DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM *Hemileia vastatrix* E *Coffea*
spp.**

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

Orientador: Laércio Zambolim

Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

S586a
2022

Silva, Lucas Fagundes da, 1990-
Análise de elementos transponíveis em *Hemileia vastatrix* e

Coffea spp. / Lucas Fagundes da Silva. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (89 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Laércio Zambolim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitopatologia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.753>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ferrugem do café - Aspectos genéticos. 2. Café -
Resistência à doenças e pragas - Aspectos genéticos.
3. Translocação (Genética). I. Zambolim, Laércio, 1947-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
III. Título.

CDD 22. ed. 632.492

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

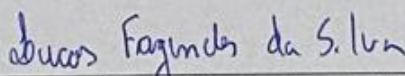
LUCAS FAGUNDES DA SILVA

**ANÁLISE DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM *HEMILEIA VASTATRIX* E
COFFEA SPP.**

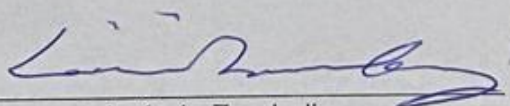
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de novembro de 2022.

Assentimento:



Lucas Fagundes da Silva
Autor



Laércio Zambolim
Orientador

Aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha mãe, pela vida, por me apoiar em todos os momentos, por acreditar que eu tinha a capacidade de estudar na UFV, pelos ensinamentos, pelo carinho e por ser a referência da minha vida. Te amo.

Ao meu pai, pela vida, pelos ensinamentos e orientações.

Aos meus irmãos Matheus e Jonathan, pelo companheirismo e amizade.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Consórcio Pesquisa Café pela concessão das bolsas de estudos e pelo fomento dos trabalhos científicos durante a minha formação na UFV.

Ao Professor Laércio Zambolim, pela orientação, paciência, oportunidades, confiança e por ser uma referência profissional na minha carreira.

À Professora Eveline Caixeta, pela coorientação e concessão do laboratório

Ao Professor Mateus Santana, pela orientação, paciência, confiança e pelas horas de dedicação ao meu processo de aprendizagem em bioinformática.

Aos colegas do Biocafé Denise, Dênia, Carol, Samila, Letícia, Bruna, Danubia e Lúcio pelo excelente convívio e companheirismo.

Aos Colegas Eduardo, Poliane, Rafael, Samuel e Ernesto pela amizade e conselhos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento dos trabalhos. Em Especial, ao Senhor Geraldo, Nivaldo Sérgio e Professor Fabrício pela amizade e todo o apoio durante essa jornada.

RESUMO

SILVA, Lucas Fagundes da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2022. **Análise de elementos transponíveis em *Hemileia vastatrix* e *Coffea* spp.**
Orientador: Laércio Zambolim. Coorientadora: Eveline Teixeira Caixeta

A ferrugem do cafeeiro é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome, um parasita obrigatório que infecta folhas de plantas do gênero botânico *Coffea*. Entre as espécies cultivadas deste gênero, *Coffea arabica* é a mais suscetível. A desfolha precoce pode levar à morte de ramos, seguido de perdas da produtividade no ano subsequente. Os danos podem alcançar índices de 50% quando as condições são favoráveis. Há um consenso que existe grande variabilidade genética na população de *H. vastatrix* e o surgimento de novas raças são um grande desafio para o manejo da doença. A raça II de *H. vastatrix* é a mais prevalente e a raça XXXIII suplantou a resistência de algumas cultivares comerciais de *C. canephora* no Brasil. No entanto, como o ciclo sexual ainda é parcialmente descrito, não são claros quais são mecanismos-chave de variabilidade genética ligados ao surgimento de raças em *H. vastatrix*. Nesse contexto, os elementos transponíveis (ETs) podem ser uma abordagem promissora, porém, pouco explorada nos estudos que visam a compreender a variabilidade genética em raças de *H. vastatrix*. Este trabalho teve como objetivo verificar o impacto de retrotransposons e elementos transponíveis de DNA nos genomas de *H. vastatrix*, *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*. Foram desenvolvidos scripts de bioinformáticas para identificação, caracterização e análise da divergência genética. No capítulo I, foram identificados ETs expressos nas interações de compatibilidade entre *H. vastatrix* e o cafeeiro. No capítulo II, as populações dos ETs foram estruturadas de acordo com as espécies de café analisadas. No capítulo III, genótipos de café arábica foram agrupadas em função do padrão de resistência às raças II e XXXIII de *H. vastatrix*. Este trabalho relata novos ETs e apresenta novas informações sobre seus impactos na coevolução entre o *H. vastatrix* e cafeeiro.

Palavras-chave: Transcriptoma. *Hemileia*. *Coffea*. Transposons.

ABSTRACT

SILVA, Lucas Fagundes da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, November, 2022. **Analysis of transposable elements in *Hemileia vastatrix* and *Coffea* spp.**
Adviser: Laércio Zambolim. Co-adviser: Eveline Teixeira Caixeta.

The Coffee leaf rust is caused by the fungus *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome, an obligate parasite that infects leaves of plants of the botanical genus *Coffea*. Among the cultivated species of this genus, *Coffea arabica* is the most susceptible. Early defoliation can lead to the death of branches, followed by productivity losses in the following year. Damage can reach rates of 50% when conditions are favorable. There is a consensus that there is great genetic variability in the population of *H. vastatrix* and the emergence of new races is a great challenge for the management of the disease. The race II of *H. vastatrix* is the most prevalent, and race XXXIII has overcome the resistance of some commercial varieties of *C. canephora* in Brazil. However, as the sexual cycle is still partially described, it is not clear what are the key mechanisms of genetic variability linked to the emergence of races in *H. vastatrix*. In this context, transposable elements (TEs) can be a promising approach. However, little explored in studies that aim to understand impacts transposable elements on genetic variability in *H. vastatrix*. This work aimed to verify the impact of retrotransposons and DNA transposons on the genomes of *H. vastatrix*, *C. arabica*, *C. canephora*, and *C. eugenioides*. Bioinformatics scripts were developed for identification, characterization and analysis of genetic divergence of TEs. In chapter I, TEs expressed in compatibility interactions between *H. vastatrix* and *Coffea* spp. were identified. In chapter II, populations of transposable elements were structured according to the analyzed coffee species. In chapter III, *Coffea arabica* genotypes were grouped according to the pattern of resistance to *H. vastatrix* races II and XXXIII. This work reports new ETs, and their impacts on the coevolution between *H. vastatrix* and *Coffea* spp..

Keywords: Mobile DNA. Transcriptome. Coffee Leaf Rust.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Ferrugem do cafeeiro	11
2.2. O sistema imune do cafeeiro e raças fisiológicas de <i>Hemileia vastatrix</i>	13
2.3. Elementos transponíveis em agentes etiológicos das ferrugens.....	16
2.4. Referências	19
3. CAPÍTULO I	26
3.1. Introdução	27
3.2. Material e métodos.....	28
3.2.1 Identificação e caracterização dos elementos transponíveis em <i>Hemileia vastatrix</i>	28
3.2.2 Descrição da diversidade genética entre os componentes dos elementos transponíveis.....	30
3.3. Resultados	30
3.3.1 Identificação e caracterização dos elementos transponíveis em <i>Hemileia vastatrix</i>	30
3.1.2 Os retrotransposons ltr_11 e o ltr_18 são os mais expressos durante a interação	32
3.1.3 A proteína gag e a integrase presentes nos elementos transponíveis GYPSY e COPIA possuem variabilidade genética.....	33
3.1.4 As transposases dos elementos transponíveis de DNA ricas em mutações	34
3.4. Discussão.....	35
3.5. Figuras e tabelas.....	39
4. CAPÍTULO II	54
4.1. Introdução	55
4.2. Material e métodos.....	56
4.2.1. Identificação e caracterização dos elementos transponíveis em <i>Coffea arabica</i> , <i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea eugenioides</i>	56
4.2.2. Descritores de variabilidade genética	57
4.2.3. Análise discriminante de componentes principais (DAPC).....	57
4.2.4. Divergência evolutiva	58
4.3. Resultados	58
4.3.1. A integrase é componente do elemento GYPSY mais polimórfico para <i>Coffea arabica</i> , <i>Coffea canephora</i> e <i>Coffea eugenioides</i>	58

4.3.2. Os elementos transponíveis CACTA são mais polimórficos em <i>Coffea arabica</i>	59
4.3.3. Identificação dos elementos transponíveis mais divergentes.....	60
4.4. Discussão.....	60
4.5 Figuras e gráficos.....	63
4.6. Referências	70
5. CAPÍTULO III	73
5.1. Introdução	74
5.2. Material e métodos.....	75
5.2.1 Produção de inóculo	75
5.2.2 Avaliação dos componentes de resistência	76
5.3. Resultados	77
5.4 Discussão.....	79
5.5. Figuras e tabelas.....	82
5.6. Referências	87

1. INTRODUÇÃO

O café está entre as *commodities* agrícolas mais importante do mundo, com um valor de mercado estimado em 70 bilhões de dólares. O cultivo do cafeeiro é a principal fonte de renda para mais de 100 milhões de pessoas em mais de 60 países (ICO, 2020). O consumo mundial de café é estimado em 165 milhões de sacas de 60kg e está crescendo paulatinamente nos principais mercados consumidores. Na Europa, o consumo em 2020 foi de 54 milhões de sacas e representa um aumento de 1,2% em relação ao ano anterior. Os países dos continentes Asiático e Oceania consumiram 36 milhões de sacas (aumento de 1,5%), seguidos da América do Norte (30 milhões de sacas e crescimento de 1,5%), América do Sul (25 milhões de sacas e aumento de 1,0%) e os países que integram o continente Africano consumiram 12 milhões de sacas (Observatório do Café, 2021).

As duas principais espécies de café cultivadas, *Coffea canephora* e *Coffea arabica*, correspondem por 40% e 60%, respectivamente, da produção mundial. A produção brasileira de café é estimada em 50 milhões de sacas, sendo 33 milhões de sacas de café arábica. Em relação ao café conilon, a produção estimada é de 17 milhões de sacas. Em 2022, a área total destinada à cafeicultura (arábica e conilon) é de 2.242 mil hectares no Brasil (Conab, 2022).

Apesar da importância da produção de café para segurança alimentar de vários países, fatores abióticos e bióticos limitam a produção em todo o mundo (Talhinhas *et al.* 2017). Dentre os fatores bióticos, as doenças estão entre os principais problemas capazes de inviabilizar a produção. A doença mais importante é a ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. A doença pode causar até 50% de perdas nas lavouras brasileiras quando as condições são favoráveis (Zambolim, 2016).

Dentre as estratégias de manejo integrado para doença, a adoção de cultivares resistentes é considerada medida de controle fundamental para reduzir o uso de fungicidas. Entretanto, a alta variabilidade genética presente na população de *H. vastatrix* é um desafio obtenção de cultivares resistentes em grande escala no mesmo espaço-tempo que as epidemias ocorrem (Avelino *et al.* 2015; Zambolim, 2016; Sousa *et al.* 2019). Entre 2012 e 2018, biotipos virulentos causaram uma grave epidemia nos países da América Latina e os impactos sociais foram expressivos (Avelino *et al.* 2015).

A variabilidade genética presente *H. vastatrix* é um fator preocupante e o surgimento de novas raças é uma ameaça constante à cafeicultura. Atualmente, mais de 50 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram identificados em clones diferenciais de café do CIFC (Centro de Investigação de Ferrugens do Cafeeiro - Portugal) em todo mundo, sendo a raça II de maior prevalência (Talhinhas *et al.* 2017; Zambolim e Caixeta, 2021). As raças de *H. vastatrix* são determinadas pelo padrão de infecção em clones de cafeeiros diferenciadores. Entretanto, a série diferenciadora é restrita e pode limitar a identificação de patótipos com amplo espectro de virulência. O CIFC relatou a existência de pelo menos 10 isolados do fungo não diferenciados. Na Universidade Federal de Viçosa foram encontrados 16 raças e 17 patótipos nas populações brasileiras (Zambolim e Caixeta, 2021).

A resistência durável contra a ferrugem do cafeeiro é uma busca constante nos programas de melhoramento. O pilar da resistência durável é o desenvolvimento de cultivares que contemplem boas características agronômicas e resistência aos biótipos agressivos e/ou virulentos prevalentes (Vale *et al.* 2001). No Brasil, as raças II e XXXIII são as mais importantes (Capucho *et al.* 2012; Cabral *et al.* 2016). A raça II é a de maior prevalência nas áreas de cultivo e a da raça XXXIII possui capacidade de infectar as principais cultivares de café conilon e café arábica. Nesse contexto, torna-se importante monitorar as cultivares disponíveis no mercado, pois o lançamento de uma nova cultivar pode demorar até 30 anos.

Neste sentido, compreender os mecanismos de variabilidade genética que expliquem a emergência de raças fisiológicas ou subpopulações em *H. vastatrix* ao nível molecular é essencial (Talhinhas *et al.* 2017). A descrição destes mecanismos pode otimizar a condução dos experimentos que visam obter cultivares com resistência durável e monitorar epidemias emergentes. Não são claros os mecanismos genéticos intrínsecos ao aparecimento de novas raças, bem como os mecanismos de defesa do cafeeiro relacionados ao ataque de fitopatógenos. Nesse contexto, os estudos com elementos transponíveis podem ser promissores para elucidar a estrutura populacional do fungo e do cafeeiro.

Os elementos transponíveis podem influenciar a evolução dos genomas e modificar as funções de genes associados à virulência. Isto porque os elementos transponíveis causam deleções, inversões, contração e expansão de sequências de DNA ao longo do genoma de fungos. Em fungos causadores de ferrugens, como *Austropuccinia psidii*, os elementos transponíveis podem corresponder a cerca de

90% do genoma (Tobias *et al.* 2021). Em plantas, elementos transponíveis são capazes de influenciar o desenvolvimento de plantas como milho, citros, arroz, ervilha e soja (Lisch, 2013; Bennetzen e Wang, 2014).

Os elementos transponíveis descritos neste trabalho podem contribuir em estudos futuros da coevolução do patossistema, bem como auxiliar na compreensão de eventos chaves relacionados ao processo infeccioso, virulência, resistência, suscetibilidade, imunidade e como *H. vastatrix* e cafeeiro se adaptaram em nichos ecológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ferrugem do cafeeiro

A ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome foi relatada pela primeira vez no território brasileiro em 1970 no sul da Bahia e rapidamente disseminou-se para todas as regiões produtoras de café do país (Chaves *et al.* 1970). A doença é encontrada em todas as regiões que produzem Café arábica (*Coffea arabica*) e Café conilon (*Coffea canephora*), sendo considerada a principal doença da cultura no Brasil e no mundo (Zambolim 2016; Talhinhos *et al.* 2017). Entre 2012 e 2018, países da América Central enfrentaram uma das mais graves epidemias da história da produção mundial de café e os prejuízos variam entre 30% e 90% nos países produtores. E mais grave ainda, houve perdas significativas no âmbito social. Estima-se que na safra 2012/2013 foram perdidos cerca de 374000 empregos sendo constatado uma forte pressão migratória rumo à América do Norte em diversos países da América Central (Avelino *et al.* 2015).

O período crítico para infecção ocorre quando as folhas estão jovens e expostas à alta umidade relativa. A doença costuma ser menos severa no Brasil em altitudes acima de 1.200 m, ambientes secos e temperaturas menores que 16 °C e maiores que 30 °C. Na América Central e Caribe, a doença é severa em cultivos em locais com altitudes acima de 1200 metros. A ferrugem do cafeeiro é uma doença tipicamente policíclica e a duração do período latente varia de 20 a 55 dias em condições de campo (Capucho *et al.* 2013a; Zambolim, 2016).

O fungo pertence à classe Basidiomycota, ordem Pucciniales e infecta somente plantas do gênero *Coffea*. São conhecidos três tipos de esporos produzidos pelo fitopatógeno: teliósporos, uredósporos e basidiósporos não infectivos, sendo que os uredósporos dicarióticos ($n + n'$) são considerados os mais importantes na epidemiologia da doença (Fernandes *et al.* 2009; Carvalho *et al.* 2011).

O ciclo de vida do fungo inicia pela germinação dos uredósporos na superfície abaxial das folhas com orvalho. Cada uredósporo, ao germinar, produz um tubo germinativo, e na sua extremidade, uma estrutura denominada apressório. Ao entrar em contato com células estomáticas, o apressório origina uma hifa de penetração e atravessa o ostíolo estomático. Em seguida, a hifa de penetração diferencia-se em micélio e inicia a colonização intercelular do mesófilo (McCain e Hennem, 1984). O fungo penetra nos espaços intercelulares e na parede celular das células vegetais. Em seguida, é formado uma estrutura denominada haustório, cuja função é a retirada de nutrientes do citoplasma das células da planta para o fungo através de um gradiente eletroquímico gerado pelo pareamento de membranas celulares entre o patógeno e o hospedeiro (Talhinhas *et al.* 2017).

Os sintomas iniciam-se com manchas cloróticas translúcidas na face abaxial. Após alguns dias surgem pústulas contendo uredósporos. A lesão também pode ser visualizada na face adaxial em correspondência à face abaxial, mas raramente formam-se esporos. Com o passar do tempo, surge uma área necrótica no centro das lesões. Em epidemias severas, a desfolha generalizada causada pela ferrugem no ano anterior pode ocasionar a seca precoce dos ramos e comprometer a safra seguinte, especialmente para o café arábica (Zambolim, 2016).

A doença pode ser manejada integrando vários métodos e medidas de controle. A aplicação de fungicidas sistêmicos DMIs (triazóis) e QoI (estrobilurina) é amplamente utilizada, mas não deve ser adotada sem critérios racionais para tomada de decisão sobre o número de aplicações e o momento de controlar a doença (Capucho *et al.* 2013b). O uso combinado de fungicidas multissítios à base de cobre com fungicidas sistêmicos possui vantagem adicional de fornecer cobre às plantas, além de reduzir o risco de seleção de populações do fungo resistentes aos fungicidas (Souza *et al.* 2011).

O controle genético é considerado o método ideal para o manejo de doenças e diversas variedades de café resistentes foram desenvolvidas no país. Estas variedades foram obtidas a partir do cruzamento com fontes de resistência de

coleções de germoplasma presentes no Brasil e em Portugal (Zambolim, 2016). Os programas de melhoramento preventivo do café para obtenção de cultivares resistentes à ferrugem iniciaram-se na década de 1950 por meio de uma parceria entre o CIFC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro) e o IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) (Rodrigues *et al.* 1975; Pereira *et al.* 2013; Zambolim, 2016).

Após a chegada da ferrugem no Brasil, o melhoramento genético foi expandido e instituições públicas fomentam as atividades de inovação pesquisa e desenvolvimento para obtenção de cultivares de café arábica resistente, em destaque: Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais; UFV (Universidade Federal de Viçosa): especialmente após instalação do Departamento de Fitopatologia motivada pelo chegada da ferrugem; UFLA (Universidade Federal de Lavras); Fundação Procafé: antigo Instituto Brasileiro de Café; IDR-Paraná (Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná) e Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Atualmente, essas instituições são apoiadas pelo Consórcio Pesquisa Café gerenciado por unidades descentralizadas da Embrapa Café (criada em 1999) (Sera *et al.* 2022).

Um Banco de Germoplasma de Café contendo acessos de diversas espécies do gênero *Coffea* é mantido pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Os acessos possuem diferentes níveis de resistência à ferrugem e são mantidas em áreas experimentais, campos de adaptação e casa-de-vegetação. Dentre as cultivares e o genótipos que são mantidos no banco de germoplasma, as populações derivadas do Híbrido de Timor Cachimor, Catimor, Cavimor, CIFC 832/1, CIFC 832/2 e Sarchimor são importantes fontes de resistência à ferrugem. Parte desses genótipos resistentes são utilizados em programas de melhoramento do cafeeiro e genes que conferem resistência são piramidados em cultivares comerciais por meio de seleção assistida por marcadores moleculares. (Almeida *et al.* 2021). Alguns são também portadores de resistência aos nematoides das espécies *Meloidogyne exigua* e *M. incógnita* (Rezende *et al.* 2017). Recentemente, foram encontrados genes de resistência ao fungo *Colletotrichum kahawae*, agente etiológico da antracnose dos frutos verdes (Silva *et al.* 2018).

2.2. O sistema imune do cafeeiro e raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix*

As plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa contra o ataque dos fitopatógenos. Dado que os fitopatógenos superam barreiras físicas e bioquímicas que bloqueiam a penetração, as proteínas receptoras de plantas iniciam vias de sinalização em cascata e modulam um complexo sistema de expressão gênica para restringir ou bloquear a colonização do tecido hospedeiro pelo fitopatógeno (Jones *et al.* 2006). O sistema imune vegetal é baseado na competência da planta hospedeira em reconhecer moléculas invasoras, realizar transdução de sinal e responder ao ataque do fitopatógeno com a ativação de vias metabólicas que envolvem muitos genes e seus produtos. Por outro lado, os fitopatógenos tentam suprimir mecanismos de expressão gênica e rotas metabólicas do sistema de defesa das plantas (Andersen *et al.* 2018).

Sob a perspectiva didática, é possível classificar moléculas de fitopatógenos que desencadeiam respostas de defesa em dois grandes grupos: i) PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*); ii) Proteínas efetoras (Jones *et al.* 2006; Thomma *et al.* 2011; Franceschetti *et al.* 2017). Os exemplos clássicos de PAMPs são moléculas constitutivas ou estruturais do fitopatógeno, tais como, flagelinas, peptidoglicano, lipopolissacarídeos, glucanos de oomicetos e quitina fúngica. As plantas possuem proteínas de resistência que reconhecem PAMPs e disparam a primeira linha de defesa, denominada de PTI (*PAMP-triggered immunity*). Esta categoria de defesa é controlada por genes geralmente mais conservada em plantas ao nível taxonômico de gênero botânico. As respostas de defesas mais comuns em PTI incluem deposição de calose, produção de compostos antimicrobianos, como espécies reativas de oxigênio, compostos fenólicos e acúmulo de proteínas de defesa (Hind *et al.* 2011; Chang *et al.* 2012; Aucique-Pérez *et al.* 2020).

O reconhecimento por parte da planta de proteínas efetoras dos fitopatógenos durante o parasitismo pode disparar a segunda linha de defesa conhecida como ETI (*effector-triggered immunity*). Esta linha de defesa é geralmente mais rápida, específica, prolongada e com efeitos mais robustos na expressão fenotípica da resistência contra fitopatógenos (Jones *et al.* 2006; Lo Presti *et al.* 2015). A ETI possui receptores intracelulares com domínios NB (*nucleotide-binding*) e LRR (*leucine-rich repeat*) que realizam o reconhecimento de efetores (proteínas Avr) do patógeno. O reconhecimento das moléculas efetoras nas células vegetais, pelas proteínas de resistência, está normalmente associado a reação de hipersensibilidade (HR) e resistência sistêmica adquirida (Henry *et al.* 2013).

Diversos trabalhos baseados em repostas de defesas desencadeadas por PTI e ETI estão sugerindo modelos biológicos promissores para explicar o surgimento de subpopulações em fungos que causam ferrugens (Andersen *et al.* 2018; Li, *et al.* 2019; Figueroa *et al.* 2020). Yin e colaboradores em 2019 demonstraram que a proteína efetora PgtSR1, codificadas por dois alelos de um gene (PgtSR1-a e PgtSR1-b), do fitopatógeno da ferrugem-do-caule-do-trigo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, suprime o silenciamento de RNA do hospedeiro. A proteína efetora PgtSR1 impede as respostas de defesas ao modular pequenos RNAs que afetam a resposta de hipersensibilidade. Ramachandran e colaboradores (2017) sugerem que a expressão heteróloga da proteína efetora Shr7 de *Puccinia striiformis* em *Pseudomonas fluorescens* pode suprimir múltiplas respostas de defesas ligadas a reação de hipersensibilidade em *N. benthamiana* e trigo.

Os estudos com o patossistema *Hemileia vastatrix* e *Coffea* spp. que associam proteínas de virulência em subpopulações são escassos. Há um consenso que existe uma grande variabilidade genética na população de *H. vastatrix* e periodicamente novas raças e novos patótipos são descritos na literatura (Zambolim e Caixeta, 2021). No entanto, ainda não são claros quais são mecanismos centrais que associam proteínas efetoras e a ontogenia das raças em *Hemileia vastatrix*. As mutações em genes que codificam proteínas de virulência são hipotetizadas como os eventos prováveis, porém a influência de outros eventos, como elementos transponíveis, hibridização somática, criptossexualidade, splicing alternativo, silenciamento de RNAs não podem ser descartados.

Atualmente, a variabilidade de *H. vastatrix* é determinada pelo seu padrão de infecção em uma série diferenciadora clonal de café (Zambolim e Caixeta 2021). Em termos práticos, isso é um consenso na comunidade científica, pois acredita-se que a interação entre o cafeeiro e *H. vastatrix* é análoga à teoria gene a gene postulada por Henry Flor. É sugerido a existência do reconhecimento dos fatores de virulência das diferentes raças do fungo pelos fatores de resistência do cafeeiro (Rodrigues e Bettencourt 1975). Entretanto, até o momento, nenhuma proteína de virulência que ancore a determinação de raças fisiológicas foi documentada na literatura.

Pelo sistema de identificação de raças, a doença ocorre se existir a atuação, de forma independente ou conjunta, de fatores de virulência V₁, V₂, V₃, V₄, V₅, V₆, V₇, V₈ e V₉ do fitopatógeno e com fatores de suscetibilidade à *H. vastatrix* - SH₁, SH₂, SH₃, SH₄, SH₅, SH₆, SH₇, SH₈ e SH₉ da planta. Apesar do sistema de identificação

de raças ser consagrado na literatura, SH₃ em *Coffea liberica* é o único loci identificado até o momento ao nível molecular (Prakash *et al.* 2004). Esse sistema já identificou mais de 50 raças de *H. vastatrix* no mundo e no Brasil, 16 raças foram identificadas até o momento em *Coffea arabica*: I (V₂V₅), II (V₅), III (V₁V₅), VII (V₃V₅), X (V₁V₄V₅), XIII (V₅V₇), XV (V₄V₅), XVI (V₁V₂V₃V₄V₅), XVII (V₁V₂V₅), XXII (V₅V₆), XXIII (V₁V₂V₄V₅), XXIV (V₂V₄V₅), XXV (V₂V₅V₆), XXXIII (V₅V₇ OU V₅V₇V₉) E XXXVII (V₂V₅V₆V₇V₉), com raça II (V₅) sendo a mais prevalente no país (Zambolim e Caixeta 2021).

Neste sistema de identificação de raças, é sugerido que *H. vastatrix* possui capacidade de suprimir PTI e desencadear à suscetibilidade através de efetores no hospedeiro (ETS, *effector-triggered susceptibility*) (Birch *et al.* 2008). Neste caso, considera-se cada fator de virulência como um hipotético efector. A priori, cada fator pode contribuir parcialmente para a virulência resultante. As interações preditas entre proteínas de virulência do *H. vastatrix* e proteínas de suscetibilidade do cafeeiro podem ser classificadas como direta (modelo gene-a-gene) (Howden *et al.* 2012) ou indireta (modelo guarda) (Jones *et al.* 2006). Neste sentido, o principal obstáculo para a discriminar as raças fisiológicas e patótipos neste sistema ao nível molecular é a dificuldade de caracterizar um efector relacionado à virulência.

2.3. Elementos transponíveis em agentes etiológicos das ferrugens

Os elementos transponíveis (ETs) podem ser definidos como sequência de DNA moveis capazes de replicar de maneira independente no genoma (Wells; Feschotte, 2020). Por muito tempo, os elementos transponíveis foram considerados apenas mais uma espécie de “DNA lixo” e a hipótese sobre seus papéis evolutivos levantada por Barbara McClintock na década de 1940 permaneceu negligenciada (Biémont, 2010). Atualmente, os elementos transponíveis são considerados responsáveis por mutações, exaptações, cooptações de novos genes e rearranjos nos genomas de bactérias, fungos, plantas e animais (Lisch, 2013; Gonçalves *et al.* 2020; Wells e Feschotte, 2020).

Em eucariotos, os ETs podem ser divididos em classes em função dos intermediários de transposição, componentes estruturais e relações filogenéticas. Os principais ETs integrantes da classe I descritos em fungos são os retrotransposons.

Na classe II, os principais ETs são denominados transposons de DNA (Finnegan *et al.* 1989).

Os elementos da classe I replicam-se através de um RNA intermediário, que é então transcrito reversamente em uma cópia do DNA e integrado ao genoma. Nesta classe, a transposição é semiconservativa e o número de cópias descendentes do retrotransposon progenitor pode ser alto. Os ETs de classe I possuem três subclasses principais de acordo com seu mecanismo de replicação e integração: i) elementos LTR (*Long terminal repeat*) mobilizados por uma integrase (IN) ou retrotransposons; ii) elementos não LTR; e iii) elementos imobilizados com tirosina recombinase. Os retrotransposons são a principal família deste grupo. Os retrotransposons estão entre os mais abundantes encontrados até o presente momento em fungos causadores de ferrugens são os Gypsy (Rincão *et al.* 2018; Tobias *et al.* 2021). Os retrotransposons possuem a estrutura similar a família viral Retroviridae. Este grupo contém vírus de RNA que utilizam a transcriptase reversa para replicação (ICTV, 2022).

Em contraste ao ETs da classe I, a maioria dos elementos da classe II se mobilizam por um mecanismo de recortar e colar, em que o próprio transposon é excisado e movido para um novo local genômico. As classes I e II podem ser subdivididas em subclasses hierárquicas de acordo com seus mecanismos de replicação e / ou integração cromossômica e em superfamílias e famílias, caracterizadas em função das relações filogenéticas (Wicker *et al.* 2007). Os ET de classe II possuem 4 grupos principais conhecidos até o momento: i) elementos de cortar e colar mobilizados por transposases nomeados após sua tríade de assinatura de resíduos catalíticos de ácido aspártico e glutâmico. Neste grupo, os transposons que se destacam em fungos são ETs de DNA Harbinger. As principais características de DNA Harbinger incluem repetições invertidas terminais de 25 pb, locais alvo de 3 pb e duas ORFs. ii) elementos imobilizados de tirosina recombinase, conhecidos como Cryptons; iii) elementos de círculo rolante, também conhecidos como Helitrons; e iv) transposons autossintetizadores, conhecidos como Mavericks ou Polintons. Destes, destacam-se os transposons EnSpm ou Cacta. Estes ETs possuem TIRs (*Terminal Inverted Repeats*) que flanqueiam duas sequências de leitura aberta (ORFs), uma codificando uma transposase e a outra, chamada ORF2, uma proteína de função desconhecida (Wicker *et al.* 2007; Wells e Feschotte, 2020).

Outra classificação importante, proposta por Wessler em 2006, é baseada na capacidade dos ETs se moverem no genoma de forma autônoma ou não. Entende-se como ETs autônomos aqueles que codificam a maquinaria enzimática necessária para sua própria transposição. Por outro lado, ETs não autônomos normalmente não são codificadores de transposases, mas ainda são capazes de se mobilizar em trans, sequestrando a maquinaria produzida por suas regiões autônomas.

Os elementos transponíveis desempenham um papel central nos mecanismos de variabilidade que governam a coevolução entre plantas e fitopatógenos. Geralmente, elementos transponíveis causam deleções, inversões, contração e expansão de sequências de DNA ao longo do genoma de fungos e plantas. Em fitopatógenos filamentosos, como *Phytophthora infestans* e *Leptosphaeria maculans*, os sequenciamentos dos genomas estão revelando que genes efetores não são distribuídos aleatoriamente, mas preferencialmente localizados em regiões enriquecidas com ETs e sequências repetitivas. Esta constatação sugere que os ETs desempenham papéis chaves na dinâmica evolutiva entre o gene efetor e a adaptação a novos genótipos hospedeiros (Dong *et al.* 2015).

Os ETs podem participar da dedelção de genes efetores relacionados à avirulência. O fungo *L. maculans* teve a frequência alélica do gene AvrLm3 reduzida na população presentes nos campos de produção de Brassicaceae da Europa (Stachowiak *et al.* 2006). Neste trabalho, foi sugerido que a redução da frequência alélica ocorreu devido influência do ETs na inativação de mutações pontuais em várias cópias do gene ao longo do genoma do fungo.

Os ETs ainda podem estar associados ao surgimento de novos efetores. O efetor Ave1 da linhagem Vd991 de *Verticillium dahliae*, que infecta o algodoeiro, não apresenta sintenia no genoma com outras linhagens da mesma espécie do fungo. A principal hipótese do seu surgimento na linhagem Vd991 é a transferência horizontal de genes mediada por elementos transponíveis com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Chen *et al.* 2018).

Considerando *H. vastatrix*, o impacto dos elementos transponíveis ao longo do genoma e sobre genes relacionados à virulência é pouco conhecido. Até o momento, os trabalhos com elementos transponíveis mais significativos foram publicados com tentativas de montar o genoma completo do fungo. Em 2014, Cristancho e colaboradores utilizaram 8 isolados de *H. vastatrix* para montar um

genoma de 333Mb. Nesta genoma, os ETs encontrados foram classificados em LTR (38,7%), ETs de DNA (7,2%), LINEs (2,1%) e 26,3% repetições são desconhecidas.

Em 2019, o maior genoma relatado até o momento para raça XXXIII foi proposto (Porto *et al.* 2019). Este genoma possui 548 Mb distribuídos em 118 mil contigs. Cerca de 82% destes contigs possuem elementos repetitivos. Neste genoma, cerca de 49 mil elementos repetitivos pertencem ao grupo dos retrotransposons, 7 mil elementos repetitivos são transposons e 71 mil são outros elementos repetitivos simples ou de baixa complexidade. O principal desafio para estudos com ETs em *H. vastatrix* consiste na ausência outros genomas completos para estudos comparativos dos elementos transponíveis mais promissores. Em outra abordagem, utilizando um esboço genômico de 333 Mb de *H. vastatrix*, foram encontrados retrotransposons que constituem 37% dos dados genômicos disponíveis (Orozco-arias *et al.* 2022).

2.4. Referências

- ALMEIDA D. P. CAIXETA E. T. MOREIRA K. F. DE OLIVEIRA A. C. B. DE FREITAS K. N. P. PEREIRA A. A. ROSADO R. D. S. ZAMBOLIM L. CRUZ C. D. Marker-assisted pyramiding of multiple disease resistance genes in coffee genotypes (*Coffea arabica*). **Agronomy** v. 11 n. 9 1 set. 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091763>
- ANDERSEN, E. J. ALI, S. BYAMUKAMA, E. YEN, Y. & NEPAL, M. P Disease resistance mechanisms in plants. **Genes**, v. 9, n. 7, 2018. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- AUCIQUE-PÉREZ, C. E. Resende, R. S. Martins, A. O. Silveira, P. R. Cavalcanti, J. H. F. Vieira, N. M. Fernie, A. R. Araújo, W. L. DaMatta, F. M. & Rodrigues, F. Á. How do wheat plants cope with *Pyricularia oryzae* infection? A physiological and metabolic approach. **Planta**, v. 252, n. 2, 1 ago. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03428-9>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>

- BIÉMONT, C. A brief history of the status of transposable elements: From junk DNA to major players in evolution. **Genetics** Vol. 186, Issue 4, pp. 1085–1093. 2010. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.124180>
- BIRCH, P. R. Boevink, P. C. Gilroy, E. M. Hein, I. Pritchard, L. & Whisson, S. C. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 373–379, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.005>
- 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.12411>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13314-012-0081-7>
- CAPUCHO, A. S. ZAMBOLIM, L. CABRAL, P. G. C. MACIEL-ZAMBOLIM, E. & CAIXETA, E. T. Climate favourability to leaf rust in Conilon coffee. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p. 511–514, 2013a. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0187-6>
- CAPUCHO, A. S. ZAMBOLIM, L. LOPES, U. N. & MILAGRES, N. S. Chemical control of coffee leaf rust in *Coffea canephora* cv. conilon. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, n. 6, p. 667–673, 2013b. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0242-y>
- CARVALHO, C. R. FERNANDES, R. C. CARVALHO, G. M. A. BARRETO, R. W. & EVANS, H. C. Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026387>
- CASTRO, I. S. L. FREITAS-LOPES, R. D. L. FERREIRA, S. DE S. MACIEL, T. E. F. FLOREZ, J. C. ZAMBOLIM, E. M. ZAMBOLIM, L. & CAIXETA, E. T. Transcriptome Analysis Uncovers the Gene Expression Profile of *Hemileia vastatrix* (Race XXXIII) during the Interactions with Resistant and Susceptible Coffee. **Agronomy**, v. 12, n. 2, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020444>
- CHAVES G.M. CRUZ FILHO J. CARVALHO M.G. MATSUOKA K. COELHO D.T. & SHIMOYA C. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). Revisão

de literatura com observações e comentários sobre a enfermidade no Brasil. **Seiva** 1970.

- CHEN, J. Y. LIU, C. GUI, Y. J. SI, K. W. ZHANG, D. D. WANG, J. SHORT, D. P. G. HUANG, J. Q. LI, N. Y. LIANG, Y. ZHANG, W. Q. YANG, L. MA, X. F. LI, T. G. ZHOU, L. WANG, B. L. BAO, Y. M. SUBBARAO, K. V. ZHANG, G. Y. & DAI, X. F. Comparative genomics reveals cotton-specific virulence factors in flexible genomic regions in *Verticillium dahliae* and evidence of horizontal gene transfer from *Fusarium*. **New Phytologist**, v. 217, n. 2, p. 756–770, 2018. <https://doi.org/10.1111/nph.14861>
- CONAB – Levantamento de safra (2022). <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>
- CRISTANCHO, M. A. BOTERO-ROZO, D. O. GIRALDO, W. TABIMA, J. RIAÑO-PACHÓN, D. M. ESCOBAR, C. ROZO, Y. RIVERA, L. F. DURÁN, A. RESTREPO, S. EILAM, T. ANIKSTER, Y. & GAITÁN, A. L. Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. October, p. 1–11, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00594>
- DONG, S.; RAFFAELE, S.; KAMOUN, S. The two-speed genomes of filamentous pathogens: Waltz with plants. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 35, p. 57–65, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.09.001>
- FERNANDES, R. D. C. FERNANDES, R. D. C. EVANS, H. C. EVANS, H. C. BARRETO, R. W. & BARRETO, R. W. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. **Plant Pathology**, 34(2), 2009 <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000200005>
- FIGUEROA, M.; DODDS, P. N.; HENNINGSEN, E. C. Evolution of virulence in rust fungi — multiple solutions to one problem. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 56, p. 20–27, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.007>
- FRANCESCHETTI, M. MAQBOOL, A. JIMÉNEZ-DALMARONI, M. J. PENNINGTON, H. G. KAMOUN, S. & BANFIELD, M. J. Effectors of Filamentous Plant Pathogens: Commonalities amid Diversity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 2, 2017. <https://doi.org/10.1128/mubr.00066-16>
- GONÇALVES, O. S. CAMPOS, K. F. DE ASSIS, J. C. S. FERNANDES, A. S. SOUZA, T. S. RODRIGUES, L. G. D. C. DE QUEIROZ, M. V. & SANTANA, M. F. Transposable elements contribute to the genome plasticity of *Ralstonia*

solanacearum species complex. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 5, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000374>

HENRY, E. YADETA, K. A. & COAKER, G. Recognition of bacterial plant pathogens: Local, systemic and transgenerational immunity 2013. **New Phytologist**, 199(4), 908–915. <https://doi.org/10.1111/nph.12214>

HIND, S. R. STRICKLER, S. R. BOYLE, P. C. DUNHAM, D. M. BAO, Z. O'DOHERTY, I. M. BACCILE, J. A. HOKI, J. S. VIOX, E. G. CLARKE, C. R. VINATZER, B. A. SCHROEDER, F. C. & MARTIN, G. B. Tomato receptor flagellin-sensing 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. **Nature Plants**, 2(9), 1–8. 2016 <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.128>

HOWDEN, A. J. M.; HUITEMA, E. Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. JUL, p. 1–6, 2012. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00160>

ICO World Coffee Production. International Coffee Organization. <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>. Acessado em outubro de 2022.

JONES, J.D.G. DANGL. J. L. (2006). The plant immune system. **Nature**, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

LI, F. UPADHYAYA, N. M. SPERSCHNEIDER, J. MATNY, O. NGUYEN-PHUC, H. MAGO, R. RALEY, C. MILLER, M. E. SILVERSTEIN, K. A. T. HENNINGSEN, E. HIRSCH, C. D. VISSER, B. PRETORIUS, Z. A. STEFFENSON, B. J. SCHWESSINGER, B. DODDS, P. N. & FIGUEROA, M. Emergence of the Ug99 lineage of the wheat stem rust pathogen through somatic hybridisation. **Nature Communications**, 10(1). 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12927-7>

LISCH D. How important are transposons for plant evolution? **Nature Reviews Genetics** v. 14 n. 1 p. 49–61 2013. <https://doi.org/10.1038/nrg3374>

LO PRESTI, L. LANVER, D. SCHWEIZER, G. TANAKA, S. LIANG, L. TOLLOT, M. ZUCCARO, A. REISSMANN, S. & KAHMANN, R. Fungal effectors and plant susceptibility. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 513–545, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>

McCAIN JW, HENNEN JF Development of the uredinal talo and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. **Phytopathology** 74:714–721. 1984.

OBSERVATÓRIO DO CAFÉ. Empresa Brasileira de Pesquisa; Embrapa Café: <http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias>

- OROZCO-ARIAS, S. CANDAMIL, M. S. JAIMES, P. A. CRISTANCHO, M. TABARES-SOTO, R. & GUYOT, R. Composition and Diversity of LTR Retrotransposons in the Coffee Leaf Rust Genome (*Hemileia vastatrix*). **Agronomy**, v. 12, n. 7, p. 1665, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12071665>
- PORTO, B. N. CAIXETA, E. T. MATHIONI, S. M. VIDIGAL, P. M. P. ZAMBOLIM, L. ZAMBOLIM, E. M. DONOFRIO, N. POLSON, S. W. MAIA, T. A. CHEN, C. ADETUNJI, M. KINGHAM, B. DALIO, R. J. D. & DE RESENDE, M. L. V. Genome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* reveal expression dynamics of candidate effectors dependent on host compatibility. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215598>
- RAMACHANDRAN, S. R. YIN, C. KUD, J. TANAKA, K. MAHONEY, A. K. XIAO, F. & HULBERT, S. H. Effectors from wheat rust fungi suppress multiple plant defense responses. **Phytopathology**, v. 107, n. 1, p. 75–83, 2017. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0083-R>
- REZENDE R. M. ANDRADE V. T. SALGADO S. M. L. DE REZENDE J. C. MENEZES J. DE O. & CARVALHO G. R. Genetic gain in the resistance of arabica coffee progenies to root-knot nematode. **Crop Science** 57(3) 1355–1362. 2017. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.07.0606>
- RINCÃO, M. P., DE CARVALHO, M. C. DA C. G., NASCIMENTO, L. C., LOPES-CAITAR, V. S., DE CARVALHO, K., DARBEN, L. M., YOKOYAMA, A., CARAZZOLLE, M. F., ABDELNOOR, R. V., ; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. New insights into *Phakopsora pachyrhizi* infection based on transcriptome analysis in planta. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 3, p. 671–691, 1 jul. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0161>
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.13.090175.000405>
- SERA, G. H. CARVALHO, C. H. S. ABRAHÃO, J. C. DE R. POZZA, E. A. MATIELLO, J. B. DE ALMEIDA, S. R. BARTELEGA, L. & BOTELHO, D. M. D. S. Coffee Leaf Rust in Brazil: Historical Events, Current Situation, and Control Measures. **Agronomy** v1 fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020496>
- SILVA, M. D. C. GUERRA-GUIMARÃES, L. DINIZ, I. LOUREIRO, A. AZINHEIRA, H. PEREIRA, A. P. TAVARES, S. BATISTA, D. & VÁRZEA, V. An Overview of the Mechanisms Involved in Coffee-*Hemileia vastatrix* Interactions: Plant and Pathogen Perspectives. **Agronomy**, 12(2). 2022 <https://doi.org/10.3390/agronomy12020326>

- SOUSA, T. V. CAIXETA, E. T. ALKIMIM, E. R. OLIVEIRA, A. C. B. PEREIRA, A. A. SAKIYAMA, N. S. ZAMBOLIM, L. & RESENDE, M. D. V. Early selection enabled by the implementation of genomic selection in coffee arabica breeding. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. January, p. 1–12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01934>
- SOUZA A. F. ZAMBOLIM L. DE JESUS JÚNIOR V. C. & CECON P. R. Chemical approaches to manage coffee leaf rust in drip irrigated trees. **Australasian Plant Pathology** 40(3) 293–300. 2011. <https://doi.org/10.1007/s13313-011-0046-x>
- STACHOWIAK, A. OLECHNOWICZ, J. JEDRYCZKA, M. ROUXEL, T. BALESSENT, M. H. HAPPSTADIUS, I. GLADDERS, P. LATUNDE-DADA, A. & EVANS, N. Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, n. 1, p. 67–75, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2931-z>
- TALHINHAS, P. BATISTA, D. DINIZ, I. VIEIRA, A. SILVA, D. N. LOUREIRO, A. TAVARES, S. PEREIRA, A. P. AZINHEIRA, H. G. GUERRA-GUIMARÃES, L. VÁRZEA, V. & SILVA, M. DO C. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039–1051, 2017. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- THOMMA, B. P. H. J.; NÜRNBERGER, T.; JOOSTEN, M. H. A. J. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. **Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 4–15, 2011. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602>
- TOBIAS, P. A., SCHWESSINGER, B., DENG, C. H., WU, C., DONG, C., SPERSCHNEIDER, J., JONES, A., LOU, Z., ZHANG, P., SANDHU, K., SMITH, G. R., TIBBITS, J., CHAGNÉ, D.,; PARK, R. F. *Austropuccinia psidii* causing myrtle rust, has a gigabase-sized genome shaped by transposable elements. **Genes, Genomes, Genetics**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2021. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaa015>
- VALE, F. X. R. DO, PARLEVLIET, J. E. & ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, 26(3), 577–589. 2001. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582001000300001>
- WELLS, J. N.; FESCHOTTE, C. A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements. **Annual Review of Genetics**, v. 54, p. 539–561, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-040620-022145>

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>

ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E. T. An Overview Of Physiological Specialization Of Coffee Leaf Rust – New Designation Of Pathotypes. **International Journal of Current Research** v. 13, 2021. <https://doi.org/10.24941/ijcr.40600.01.2021>

3. CAPÍTULO I

Identificação de elementos transponíveis de *Hemileia vastatrix*
nas interações compatível e incompatível com o cafeeiro

Identificação de elementos transponíveis de *Hemileia vastatrix* nas interações compatível e incompatível com o cafeeiro

3.1. Introdução

Apesar da importância do café arábica (*C. arabica*) e conilon (*C. canephora*) para segurança alimentar de vários países no mundo, epidemias severas da ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br ameaçam a produção. A doença pode causar até 50 % de perdas nas lavouras brasileiras quando as condições são favoráveis (Zambolim, 2016). Há um consenso que existe grande variabilidade genética na população de *H. vastatrix* e o surgimento de novas raças e patótipos são um grande desafio para o desenvolvimento de métodos de controle eficazes no mesmo espaço-tempo em que as epidemias ocorrem (Capucho *et al.* 2012). As raças são identificadas pelo padrão da infecção obtidos em uma série de plantas diferenciadoras que segue relação gene a gene (Flor, 1971). A manifestação da doença em cafeeiros é governada por pelo menos nove genes dominantes principais (SH₁-SH₉) que são únicos ou associados; no entanto, outros genes principais e secundários também podem estar envolvidos (Rodrigues *et al.* 1975; Barka *et al.* 2020). Da mesma forma, a virulência do fungo está associada a diferentes genes de virulência (V₁-V₉) (Rodrigues *et al.* 1975).

Dentre os mecanismos capazes de gerar variabilidade genética em fungos fitopatogênicos e que podem estar associados com a virulência nas interações compatíveis (manifestação da doença) e incompatíveis (ausência de doença) do patossistema, os fragmentos de elementos transponíveis (ETs) estão entre os mais diversificados e abundantes no genoma de *Hemileia vastatrix* (Porto *et al.* 2018).

Os ETs são sequências de DNA móveis que podem se movimentar no genoma (Finnegan *et al.* 1989). Existem duas classes de ETs, sendo: classe I - retrotransposons e classe II - transposons de DNA. Os ETs da classe I se replicam por meio de um RNA intermediário, então transcrito reversalmente em uma Cópia do DNA e integrado ao genoma. Em contraste, a maioria dos elementos da classe II se mobilizam por meio de um mecanismo recorta e cola, onde o próprio transposon é excisado e movido para um novo local genômico.

Não raro, elementos transponíveis estão associados a deleções, inversões, contração e expansão de sequências de DNA ao longo do genoma de fitopatógenos e plantas (Wells e Feschotte, 2020). Na interação entre plantas e patógenos, os

elementos transponíveis expressos no momento da interação podem apresentar um papel central na regulação gênica, emergência de novos genes de virulência, recombinação, deleção de genes e splicing alternativo que governam a coevolução entre plantas e fitopatógenos (Wang *et al.* 2016; Andersen *et al.* 2018; Razali *et al.* 2019). Os ETs podem estar associados ao surgimento de novos efetores (Chen *et al.* 2018). Em fungos biotróficos, como *Hemileia vastatrix*, o impacto dos ETs ao longo do genoma e sobre genes relacionados à virulência é pouco conhecido. No entanto, fragmentos de ETs já foram identificados no genoma. Os retrotransposons constituem 38,7% do genoma, seguidos dos elementos DNA com 7,2% das sequências de nucleotídeos (Porto *et al.* 2018).

Novas possibilidades surgiram com a montagem de um banco de dados de referência informações sobre o transcriptoma da interação compatível e incompatível do patossistema (Castro *et al.* 2022). Este banco de dados foi obtido através do sequenciamento de bibliotecas de cDNA das interações compatíveis e incompatíveis entre a raça XXXIII de *Hemileia vastatrix*, *Coffea arabica* (suscetível) e o Híbrido de Timor (resistente). Neste transcriptoma foram preditos 3523 genes diferencialmente expressos em momentos distintos da interação e 162 milhões de reads foram disponibilizadas no NCI (*National Center for Biotechnology Information*).

Considerando a complexidade da virulência descrita para o patossistema e os prováveis impactos dos elementos transponíveis no genoma de *H. vastatrix*, este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar ETs no genoma de *Hemileia vastatrix* expressos nas interações compatíveis e incompatíveis com o cafeeiro.

3.2. Material e métodos

3.2.1 Identificação e caracterização dos elementos transponíveis em *Hemileia vastatrix*

O genoma da raça XXXIII de *H. vastatrix* foi utilizado para identificação dos elementos transponíveis (Porto *et al.* 2018). Este genoma possui 535 Mb e foi obtido em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV) - Viçosa (Brasil), Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras (Brasil) e a Universidade de Delaware (UDEL) - Newark - EUA. O sequenciamento do DNA genômico foi realizada por duas plataformas: *Pacific Biosciences (PacBio RS5II)* e *Illumina (HiSeq*

2500). O isolado fúngico está armazenado na Micoteca do Biocafé (Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, Bioagro-UFV). O genoma está disponível no NCBI BioProject ID: PRJNA419278 e BioSample ID: SAMN08048888. O *script* para identificação e caracterização dos ETs estão sumarizados na Figura 1.

Na etapa 1, o genoma do fungo e o transcriptoma da interação foram baixados do NCBI (Porto et al, 2018; Castro *et al.* 2022). Na etapa 2 estão descritos as abordagens para identificação dos ETs no genoma.

Na etapa 3, outra abordagem mapeou os ETs nas interações de compatível e incompatível no genoma de *H. vastatrix* com suporte do transcriptoma. Nesta etapa, a qualidade dos dados transcriptômicos brutos foi aferida usando o programa FastQC. As leituras de baixa qualidade e sequências de adaptadores foram eliminadas com o programa Trimmomatic. Os parâmetros utilizados foram LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MIMLEN:50 (Bolger *et al.* 2014). Os transcritos foram mapeados contra o genoma de referência de *H. vastatrix*, *C. canephorae*, *C. arabica* com programa Tophat2. Os arquivos 'bam' foram utilizados para montagem do transcriptoma usando o programa Cufflinks (Trapnell *et al.* 2012). As funções cuffmerge e gffread foram utilizadas para obtenção das sequências no formato fasta. A função cuffcompare foi utilizada para anotação dos exons e classificação dos transcritos em intergênicos, intrônicos e cis-antisense, respectivamente. Os arquivos referentes ao genoma e ao transcriptoma foram utilizados para mapear os elementos transponíveis. Um script Perl foi desenvolvido para extrair as sequências fastas maiores que 150 nt mapeadas utilizando genoma de *H. vastatrix* como referência para localização dos elementos transponíveis.

Na etapa 4, os ETs completos de Classe I e II foram identificados com auxílio dos programas RepeatModeller v. 2.0.1 (RepeatMasker genome.fa -lib dfam.fa ou repbase.fa -small -gff -ace -engine ncbi). A biblioteca fngrep.ref foi utilizada como referência para ETs (Flynn *et al.* 2020).

Na etapa 5, os contigs contendo os elementos transponíveis foram obtidos do genoma do fungo e as ORFs foram identificadas através do programa ORF-Finder. Os parâmetros utilizados foram (ORFfinder -in contigs.fa -out contigs1.fa -outfmt 1) (Rombel *et al.* 2020).

Na etapa 6, as ORFs foram submetidas aos bancos de dados nt, nonredundat, Pfam, CDD, COILS, Gene3D, HAMAP, SUPERFAMILY e TIGRFAM para identificação dos componentes dos elementos transponíveis (Quevillon *et al.*

2005) (Figura 1). Os parâmetros utilizados foram i) `interproscan.sh -t n -i contigs1.fa -appl Pfam CDD COILS Gene3D HAMAP SUPERFAMILY TIGRFAM`; ii) `diamond blastp -q contigs1.fa -d nonredundant_database_prot.dmnd -o contigs1.results_p -p 4 --max-target-seqs 500 -f 6 qseqid sseqid qlen slen pident evalue qstart sstart qseq sseq`. As ORFs foram ranqueadas em função da localização nos contigs.

Na etapa 7, a identificação dos ETs contendo LTR (*Long terminal repeat*) foi realizada pela presença de domínios proteicos gag, polimerase, integrase, ribonuclease H, transcriptase reversa e aspartil protease, LTR3' e LTR5'. Os elementos transponíveis da classe II foram identificados através das transposases com domínio DDE (superfamília de endonucleases) e presença de outras ORFs (*Open reading frame*) internas às regiões TIR3' e TIR5'. Os dados dos componentes estruturais dos elementos transponíveis, transcritos e estimadores da expressão de cada transcritos foram plotados com auxílio do pacote ggplot2 do programa R.

3.2.2 Descrição da diversidade genética entre os componentes dos elementos transponíveis

Foram construídas bibliotecas com as sequências dos componentes de cada elemento transponível completo encontrado no genoma da raça XXXIII de *Hemileia vastatrix*. As sequências foram alinhadas através do programa Muscle (Edgar, 2004). Os parâmetros foram `muscle -in file.fa -out file_alin -maxiters 1 -diags1`. Em cada análise, o arquivo file.fa foi composto por sequências de nucleotídeos dos componentes estruturais ou do ETs completos. Em seguida, foram obtidos os seguintes descritores de variabilidade genética com programa DnaSP v. 5.10: número de sequências; número total de sítios segregantes (s); diferenças médias de nucleotídeos entre as sequências (k); diversidade de nucleotídeos (π); número total de mutações; número de haplótipos (h); diversidade de haplótipos (Hd) e; estimador de Watterson para a taxa de mutação em escala populacional com base no número total de sítios segregantes (θ -W) (Rozas *et al.* 2003).

3.3. Resultados

3.3.1 Identificação e caracterização dos elementos transponíveis em *Hemileia vastatrix*

A análise com RepeatMasker forneceu a localização preliminar dos elementos transponíveis. Foram encontrados componentes estruturais das seguintes famílias de elementos transponíveis: Academ, Ambal, Angela, Arnoldy, AT, BEL, CACTA, Chapaev, Copia, CR1, Crypton, Dada, Daphne, DIRS, EnSPM, ERV, Ginger, Harbinger, hAT, Helitron, Hero, I, ISL2EU, Jockey, Kiri, Kolobok, L1, L2, LINE, LTR, Mariner, MER, Merlin, MuDR, Nimb, Odin, P, Penelope, PiggyBac, Polinton, R1, RTE, Sabelle, Sabrina, SINE, Sola, Tad, Telka, Transib, Tx1, Gypsy, Vesta, Vingi, Zator e Zisupton. As sequências completas dos ETs foram obtidas do genoma para identificação ETs da classe I ou da classe II. Os ETs Gypsy, Copia, Harbinger e Cacta foram os mais abundantes encontrados no genoma da raça XXXIII de *H. vastatrix*. Os componentes estruturais dos elementos transponíveis selecionados estão ilustrados na Figura 2.

Para os elementos da classe I, ETs estão descritos nas Tabela 1. Foram identificados 25 retrotransposons da superfamília Gypsy completos ao longo do genoma de *Hemileia vastatrix*. Os tamanhos dos elementos transponíveis variaram de 6,09 Kb a 26,4 Kb. A região pol é composta pelos domínios de aspartil protease, DNA polimerase, transcriptase reversa, ribonucleases e integrase em uma organização típica de retrotransposons Ty3/Gypsy. Em relação as LTRs, o tamanho da LTR5' variou entre 1,14kb e 4,1 kb, enquanto a LTR3' 0,8kb e 7,4kb, respectivamente.

Um total de 12 elementos transponíveis da superfamília Copia foram identificados. A localização da integrase próxima à região LTR nos elementos transponíveis Gypsy é a principal característica que os distingue dos elementos transponíveis Copias. As regiões LTR encontradas nos elementos transponíveis Copia foram menores em relação aquelas encontradas em Gypsy. A LTR5' variou entre 0,9kb e 5,7 kb, enquanto o tamanho da região LTR3' oscilou entre 0,9 kb e 5,6 kb. As ORFs encontradas nos elementos Gypsy e Copia possuem códon de iniciação ATG adjacentes a LTR5'. O tamanho das ORFs correspondentes a proteína gag nos elementos transponíveis Copia e Gypsy variaram entre de 0,25kb e 4,4 kb.

Os elementos transponíveis de DNA completos encontrados no genoma da raça XXXIII de *H. vastatrix* estão apresentados na Tabela 2. Para os elementos de DNA da classe II, as análises de bioinformática permitiram identificar superfamílias Cacta e Harbinger através dos componentes TIR5', TIR3' transposase e ORFs. Foram identificados 35 elementos transponíveis completos Cacta e 16 elementos

transponíveis Harbinger. O menor elemento transponível encontrado foi o Cacta_hv_9 (2,9kb) e o maior elemento transponível foi o Cacta_hv_16 (9,9kb). Em relação ao Harbinger, o menor elemento transponível encontrado foi o hv_05 (2,9 kb) e o maior o hv_11 (6,7 kb). As sequências referentes as ORFs e as transposases para ambos os grupos variaram entre 0,5kb e 2,6 kb de tamanho. As TIRs das extremidades 5' e 3' variam entre 0,016 e 0,087 kb de tamanho nos dois grupos.

3.1.2 Os retrotransposons ltr_11 e o ltr_18 são os mais expressos durante a interação

Os retrotransposons identificados com os dados transcriptômicos estão descritos na Tabela 3. Foram identificados 4 transposons de DNA completos (Figura 6) e 25 retrotransposons (Figura 7) na interação compatível. No tempo 0, foram identificados 19 retrotransposons de *Hemileia vastatrix* expressos no tempo 0 da inoculação. Logo após às 6 primeiras horas da infecção, dna_1, dna_3, ltr_6, ltr_7, ltr_10, ltr_11 e ltr_20 foram expressos (Figura 7). Após 12 horas da inoculação, 14 transcritos dos elementos transponíveis foram identificados, sendo que os transcritos CUFF.41.1, CUFF.1084.1, CUFF.2655.1 e CUFF.3499.1 são elementos transponíveis completos de transposons de DNA (Figura 6). Apenas 2 elementos transponíveis (ltr_3 e dna_2) foram detectados após 24 horas da inoculação. Após 17 dias da inoculação, os elementos transponíveis dna_1, dna_2, ltr_3, ltr_6, ltr_7, ltr_8 e ltr_10 tiveram expressão detectada.

Os níveis de expressão dos dados RNA-seq normalizados foram expressos em FPKM (Fragmentos por quilo base de transcrição por milhão de fragmentos mapeados). Na interação compatível, o maior índice de expressão no tempo 0 foi ltr_8.com 272,7 FPKM. O ltr_11 teve a expressão de 93,3 FPKM. A expressão de ltr_11 aumentou para 244,22 após 6h da inoculação e atingiu o pico em 331,26 de FPKM após 12h da inoculação. O ltr_11 considerado o retrotransposons mais expresso durante o período de infecção. Após 17 dias, o ltr_7 foi o retrotransposons mais expresso com índice de 33,3 FPKM (Figura 7).

Por outro lado, para interação incompatível, foram encontrados 11 retrotransposons de *H. vastatrix* na interação com o Híbrido de Timor. Destes grupos de retrotransposons, apenas os ltr_1, ltr_14 e ltr_5 não foram detectados em *H.*

vastatrix na interação compatível com *Coffea arabica*. O ltr_20 obteve 384,3 de FPKM e foi o LTR mais expresso no momento da inoculação. Após 6h, o ltr_18 apresentou índices de 341,6 e foi o mais expresso. Após 24 horas de infecção, os transcritos CUFF.1312.1 e CUFF.1313.1 também apresentaram os maiores índices de expressão (Figura 8). Não houve elementos transponíveis de DNA sendo expressos durante a interação incompatível da raça XXXIII de *Hemileia vastatrix* com o Híbrido de Timor.

Os elementos transponíveis dna_1, dna_2, dna_3 e dna_4 foram identificados na interação com *C. arabica* (Figura 6). No tempo 0 da infecção nenhum elemento transponível de DNA foi detectado em nossas análises. O pico da expressão em *C. arabica* ocorreu nos tempos 6h e 12h após a inoculação e o dna_3 foi o mais expresso durante o período infeccioso. Após 17 dias da infecção, dna_1 e dna_2 ainda se mantiveram ativos, com índices de FPKM 74,8 e 63,3, respectivamente.

Em relação a diversidade de eventos relacionados a transposição, a distância de Kimura calculadas para os LTRs possibilitou identificar dos elementos divergentes expressos no transcriptoma da interação compatível. Os pares de retrotransposons mais divergentes relações aos eventos de transposições e transição foram: ltr_15:ltr_11 (1,80) e ltr_18:ltr_12 (1,56).

3.1.3 A proteína gag e a integrase presentes nos elementos transponíveis Gypsy e Copia possuem variabilidade genética

A variabilidade genética foi estimada nos componentes estruturais dos elementos transponíveis. As sequências de nucleotídeos de cada componente estrutural foram avaliadas como populações. Para os retrotransposons, foram criadas bibliotecas para elementos transponíveis completos, ORF da proteína gag, ORF da proteína integrase, LTR3' e LTR5'. Os resultados dos descritores da variabilidade genética entre os componentes estruturais dos ETs estão na figura 3. A diversidade de haplótipos, diversidade de nucleotídeos, θ -W, número de sítios polimórficos e o número de mutações foram maiores na sequência de nucleotídeos que codifica a proteína gag nos elementos transponíveis Gypsy em relação a superfamília Copia

Para a integrase, a diversidade de nucleotídeo nos retrotransposons Gypsy (0,87) foi maior em relação Copia (0,69). Foram 159 mutações encontradas em

Gypsy e 116 em Copia. A diversidade de nucleotídeo das sequências de nucleotídeos das proteínas gag foi de 1,03 para o elemento Gypsy e 0,77 para elemento Copia. Foram encontradas 189 mutações em Copia e 74 em Gypsy.

Em Gypsy, foram encontrados 32 sítios polimórficos para a proteína gag. Já o número de sítios polimórficos para a gag foi maior em Copia (101,0). Em consequência, os valores de θ -W foram maiores para Copia (33,4) em relação ao Gypsy (8,5). O número de sítios polimórficos na integrase foi maior em Gypsy (77,0), no entanto, o índice em Copia (69,0) também foi elevado. Os valores de θ -W foram similares em Copia (23,6) e em Gypsy (24,21). Em relação ao total de mutações e número de sítios polimórficos nas sequências, houve concentração das mutações nas regiões entre os componentes dos ETs.

A análise da distância de Kimura baseadas nos parâmetros de transição ou transversão de nucleotídeos permitiu encontrar os ETs completos, possivelmente ativos e mais divergentes no genoma do fungo (Figura 5). Para o retrotransposons da superfamília Gypsy, os dois pares mais divergentes foram Gypsy_hv_14:Gypsy_hv_18 e Gypsy_hv_8:Gypsy_hv_3 com taxas de transversão de 2,51 e 2,26, respectivamente. Por outro lado, os retrotransposons da superfamília Copia apresentou taxas de transversão de nucleotídeos menores 1,54 (Copia_hv_12:Copia_hv_2) e 1,41 (Copia_hv_20:Copia_hv_23) para os indivíduos mais divergentes.

3.1.4 As transposases dos elementos transponíveis de DNA ricas em mutações

Os descritores de variabilidade genética dos ETs de DNA completos (te), ORF com função desconhecida (ORF), transposase com *motif* DDE, TIR5' e TIR3' estão sumarizados na figura 4. Os estimadores de sítios polimórficos, θ -W e o número de mutações sugerem que as transposase é uma região de maior variabilidade genética nos elementos transponíveis Harbinger. Estes descritores evidenciaram maior variabilidade genética para as regiões reguladoras de componentes estruturais dos elementos transponíveis Harbinger em relação ao transposons Cacta. A diversidade de nucleotídeo da transposase foi de 0,55 para Harbinger e 0,34 para Cacta. Já em relação a análise de polimorfismo, foram encontrados sítios polimórficos em Cacta (161) e Harbinger (40). Esses resultados refletiram no índice θ -W para as sequências das transposases. Em Cacta, θ -W foi de 48,52. Em Harbinger, θ -W foi

de 12,05 (Figura 4). O total de mutações foi maior na sequência completa do ET. No entanto, foi possível observar polimorfismo na transposase, especialmente no transposons Cacta.

A análise de divergência evolutiva obtida pela distância de Kimura evidência que o elemento transponível Harbinger possui maior polimorfismo em relação ao elemento transponível Cacta na raça XXXIII de *Hemileia vastatrix* (Figura 5). Os ETs Harbinger encontrados que possuem as maiores taxas de transversão de nucleotídeos. Os pares mais divergentes foram haribinger_hv_12:haribinger_hv_3 (1,51) haribinger_hv_6:haribinger_hv_8 (1,26). Os pares de ETs Cacta mais divergentes foram Cacta_hv_6:Cacta_hv_11 (0,83) e Cacta_hv_18:Cacta_hv_27 (0,82) (Tabela 3 e 4).

3.4. Discussão

A estratégia adotada nesse trabalho permitiu identificar fragmentos de 55 tipos de ETs no genoma da raça XXXIII de *Hemileia vastatrix*. Estes fragmentos foram utilizados como banco de dados para análises comparativas no próprio genoma e no transcriptoma da interação com o cafeeiro. Os grupos de ETs mais abundantes para classe I e classe II tiveram a sequência identificada. A caracterização dos componentes estruturais em relação ao número de nucleotídeos, início das regiões codificadoras e regiões terminais dos ETs possibilitou a classificação estrutural e taxonômica da classe I (Gypsy e Copia) e classe II (Cacta e Harbinger). Nesta abordagem, foram apenas identificados elementos transponíveis completos.

Por não ser possível delimitar a LTR ou a TIR, os ETs truncados ou incompletos ao longo do genoma de *H. vastatrix* não foram considerados na análise. Assim, apenas ETs completos com todos os componentes estruturais foram considerados nas análises. No entanto, muitos ETs incompletos carregam seus próprios promotores, como a proteína gag, e elementos reguladores, como a integrase, e não são necessariamente inativados (Wells e Feschotte, 2020). Embora as informações sejam escassas para outros patossistemas, não é desprezível a hipótese que ETs incompletos observados no genoma de *Hemileia vastatrix* podem influenciar o aumento da expressão gênica de proteínas relacionadas à virulência.

Na interação de compatibilidade entre *H. vastatrix* e o cafeeiro, os fatores de virulência interagem com os fatores de suscetibilidade do cafeeiro em uma interação análoga gene a gene para manifestação ou não da doença (Flor, 1971; Rodrigues *et al.* 1975). Dentre os 25 ltr encontrados na interação incompatível, apenas os retrotransposons ltr_1, ltr_14 e ltr_5 não foram detectados em *H. vastatrix* na interação compatível com *C. arabica*. Os retrotransposons ltr_11 e o ltr_18 foram expressos nas interações compatíveis e incompatíveis com o cafeeiro. Por outro lado, os ETs de DNA dna_1, dna_2, dna_3 e dna_4 foram identificados na interação compatível. Estes resultados evidenciam que os ETs possam participar da regulação de proteínas efetoras relacionadas a virulência. Acredita-se que proteínas efetoras de *H. vastatrix* são produzidas nos haustórios, secretadas na matriz extrahaustorial e translocadas para células do cafeeiro (Castro *et al.* 2022). Uma vez dentro das células hospedeiras, os efetores relacionados à virulência podem modular o metabolismo e vias de defesa na interação compatível, na qual ocorre a manifestação da doença. Quando os efetores são reconhecidos pelo sistema imune do cafeeiro nas interações incompatíveis, a reação de hipersensibilidade se inicia logo nas primeiras horas da infecção, o que coincide com o pico da expressão dos ETs em diferentes momentos do processo infeccioso encontrados neste trabalho.

Em relação aos descritores de variabilidade genética, as evidências do presente sugerem que o componente estrutural gag é polimórfico nos retrotransposons Gypsy e Copia (Figura 2). A distância de Kimura obtida a partir das sequências de nucleotídeo do componente estrutural gag evidenciou que as maiores taxas de transição e transversão indicam que o retrotransposons Gypsy pode ser mais ativo no genoma de *H. vastatrix* em relação ao retrotransposons Copia (Figura 5). Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato dos componentes estruturais dos retrotransposons em fitopatógenos apresentarem taxas evolutivas diferenciais com implicações no mecanismo de transposição (Muszewska *et al.* 2011). No início da transposição, a gag desencadeia uma série de sinais específicos para empacotamento, dimerização, transcrição reversa, transposição e integração do elemento transponível (Wells e Feschotte, 2020).

Em relação aos ETs da classe II Cacta e Harbinger, os descritores de variabilidade genética demonstraram que a transposase possuem variabilidade molecular. As maiores taxas de transição e transversão estimados com a distância de Kimura indicam que os eventos de transposição podem ser mais comuns em

Harbinger. Estes ETs não foram identificados nas interações compatíveis e incompatíveis com o cafeeiro. Entretanto, as localizações das cópias destes ETs indicam que eles estão localizados em regiões ricas em *motifs* quinase, leucina e cisteína. Estes *motifs* geralmente estão associados a modulação do metabolismo vegetal durante a infecção (Andersen *et al.* 2018). O potencial desses ETs na capacidade de *H. vastatrix* causar doença no cafeeiro é significativo. Em outros patossistemas, como *Moniliophthora perniciosa* x *Theobroma cacao*, os ETs Harbinger são ativos no fitopatógenos (Pereira *et al.* 2013). Não raro, como o relatado para *Puccinia striiformis*, ETs estão significativamente mais próximos de regiões do genoma relacionadas com a virulência (Xia *et al.* 2018).

Tanto Cacta quanto Harbinger possuem duas ORFs, uma que codifica uma proteína de ligação ao DNA ou com função desconhecida e a outra que codifica uma transposase com domínio DDE (endonuclease). Entretanto, parte dos ETs encontrados não possuem a segunda ORFs. As regiões terminais (TIRs) também foram utilizadas para diferenciar os ETs. O elemento Cacta é geralmente caracterizado por TIRs que terminam com extremidades CACTA ou CACTG altamente conservadas (Wicker *et al.*, 2007). Os transposons Cacta deste trabalho diferem neste aspecto e apresentam os nucleotídeos CCCC ou TTTT nas extremidades. Este é o primeiro relato deste ET Harbinger em *H. vastatrix*.

A abundância, diversidade genética e impacto nas interações de compatibilidade dos ETs e seus componentes estruturais no genoma de *H. vastatrix* está relacionada com a taxa de transposição. Os ETs progenitores geram cópias descendentes, que em muitos casos, podem ser inativadas (Grabundzija *et al.* 2016). A ausência de algum componente estrutural pode inviabilizar a transposição dos ETs (Ali *et al.* 2014). Essa inativação pode ser causada por mecanismos de defesa do genoma hospedeiro, mutações ou devido ao truncamento de ETs, o que pode gerar variações degeneradas ou incompletos (Santana, 2015). Mecanismos de defesa do genoma hospedeiro associados Mutação pontual induzida por repetição (RIP), Metilação de DNA e RNA interferente (*Quelling*) podem estar associados as variações dos componentes estruturais dos ETs (Amselem *et al.* 2015). A existência de um mecanismo de defesa do genoma em *H. vastatrix* contra a transposição, porém pouco eficaz ou suprimido, pode explicar a abundância de ETs incompletos e outros elementos repetitivos. Esta hipótese precisa ser desafiada.

A ineficácia destes mecanismos de defesa do genoma pode explicar a diferenças alguns pontos da evolução de *H. vastatrix*. Cerca de 82% dos *scaffolders* do genoma de *H. vastatrix* são ricos em ETs e outras regiões repetitivas (Porto *et al.* 2018). Neste contexto, a atividade dos ETs pode explicar as diferenças de tamanho entre o genoma de *H. vastatrix* e os demais fungos que causam ferrugem (Tavares *et al.* 2014; Xia *et al.* 2022).

Em conclusão, as análises de bioinformática permitiram identificar e caracterizar os elementos transponíveis em função do tamanho e constituição de nucleotídeos. Os resultados das análises dos componentes estruturais indicam que os elementos transponíveis de *H. vastatrix* são potencialmente ativos. Os *ltr_11* e *ltr_18* de *H. vastatrix* foram os elementos transponíveis mais expressos nas interações compatíveis e incompatíveis com o cafeeiro. A *gag* é o componente estrutural mais polimórfico nos retrotransposons analisados. Em relação aos transposons de DNA, *Cacta* e *Harbinger* possuem regiões polimórficas. As transposases do Elemento transponível *Harbinger* possui as maiores taxas de transposição e transversão de nucleotídeos. Os elementos transponíveis de *H. vastatrix* *dna_1*, *dna_2*, *dna_3* e *dna_4* foram encontrados na interação compatível. Não foram encontrados elementos transponíveis da classe II na interação incompatível com o Híbrido de timor. Estas informações podem contribuir para compreensão para do impacto dos elementos transponíveis na virulência de *H. vastatrix*. Estes resultados também abrem precedentes para novos estudos que correlacionem a abundância de elementos transponíveis com as variações de tamanho encontradas nos genomas da família fúngica *Pucciniaceae*.

3.5. Figuras e tabelas

Tabela 01- Descrição dos retrotransposons encontrados no genoma da raça XXXIII de <i>H. vastatrix</i>			
Código do ET*	Coting	A*	B*
copia_hv_1	PHNK01000334.1	12188	258
copia_hv_10	PHNK01006933.1	5515	1262
copia_hv_11	PHNK01012458.1	10702	771
copia_hv_12	PHNK01013035.1	13223	288
copia_hv_2	PHNK01000789.1	19960	900
copia_hv_20	PHNK01024418.1	16835	375
copia_hv_23	PHNK01039656.1	14155	942
copia_hv_24	PHNK01052115.1	18761	303
copia_hv_30	PHNK01079268.1	12520	459
copia_hv_33	PHNK01098079.1	16179	4461
copia_hv_34	PHNK01105407.1	15112	4461
copia_hv_35	PHNK01105493.1	11156	456
gypsy_hv_13	PHNK01013386.1	15804	132
gypsy_hv_14	PHNK01014725.1	7513	909
gypsy_hv_15	PHNK01015791.1	10704	195
gypsy_hv_16	PHNK01016529.1	8583	1266
gypsy_hv_17	PHNK01021321.1	11047	144
gypsy_hv_18	PHNK01022495.1	9020	195
gypsy_hv_19	PHNK01022762.1	10910	675
gypsy_hv_21	PHNK01026701.1	20876	420
gypsy_hv_22	PHNK01029453.1	8029	195
gypsy_hv_25	PHNK01057275.1	9645	690
gypsy_hv_26	PHNK01067220.1	11951	450
gypsy_hv_27	PHNK01074559.1	14990	195
gypsy_hv_28	PHNK01076469.1	15176	192
gypsy_hv_29	PHNK01077178.1	10018	735
gypsy_hv_3	PHNK01000830.1	6090	819
gypsy_hv_31	PHNK01096433.1	26376	153
gypsy_hv_32	PHNK01097543.1	8437	675
gypsy_hv_36	PHNK01110182.1	16267	4461
gypsy_hv_37	PHNK01111334.1	13980	126
gypsy_hv_4	PHNK01000949.1	8441	414
gypsy_hv_5	PHNK01002321.1	17507	729
gypsy_hv_6	PHNK01002807.1	10856	729
gypsy_hv_7	PHNK01003200.1	12230	462
gypsy_hv_8	PHNK01003395.1	11849	186
gypsy_hv_9	PHNK01004922.1	11683	2580

* ET: Elemento transponível; A tamanho do ET; B: tamanho da região que codifica o componente estrutural gag

Tabela 02 - Descrição dos transposons de DNA encontrados no genoma da raça XXXIII de *H. vastatrix*

Classe	Código do ET*	Coting	A*	B*	C*
Cacta	hv_1	PHNK01000863.1	3301	12048	2662
Haribinger	hv_1	PHNK01000047.1	15847	20343	1115
Cacta	hv_10	PHNK01015762.1	3316	12051	2261
Haribinger	hv_10	PHNK01008022.1	3811	8299	902
Cacta	hv_11	PHNK01017039.1	10533	18528	1139
Haribinger	hv_11	PHNK01020063.1	8505	15467	211
Cacta	hv_12	PHNK01021794.1	13655	20698	1139
Haribinger	hv_12	PHNK01020578.1	2645	7706	362
Cacta	hv_13	PHNK01025663.1	3570	12312	2261
Haribinger	hv_13	PHNK01028795.1	513	6290	349
Cacta	hv_14	PHNK01026918.1	6229	14732	1504
Haribinger	hv_14	PHNK01041562.1	2061	4098	128
Cacta	hv_15	PHNK01027041.1	3023	12564	1506
Haribinger	hv_15	PHNK01073464.1	572	4819	528
Cacta	hv_16	PHNK01029001.1	2704	12641	1505
Haribinger	hv_16	PHNK01114937.1	942	3870	527
Cacta	hv_17	PHNK01034108.1	1611	9298	1505
Cacta	hv_18	PHNK01037216.1	11620	20356	2661
Cacta	hv_19	PHNK01046520.1	13812	20809	1140
Cacta	hv_2	PHNK01001866.1	6018	14901	2662
Haribinger	hv_2	PHNK01000280.1	16446	20561	620
Cacta	hv_20	PHNK01051762.1	10429	19175	2262
Cacta	hv_21	PHNK01063628.1	8703	17764	2262
Cacta	hv_22	PHNK01070276.1	558	9379	1505
Cacta	hv_23	PHNK01078425.1	13903	20971	1138
Cacta	hv_24	PHNK01085038.1	3312	12056	2260
Cacta	hv_25	PHNK01085960.1	3324	12053	2260
Cacta	hv_26	PHNK01087563.1	3159	11561	1504
Cacta	hv_27	PHNK01088162.1	167	7688	1139
Cacta	hv_28	PHNK01090423.1	2974	12021	2262
Cacta	hv_29	PHNK01091799.1	3280	11868	2262
Cacta	hv_3	PHNK01002963.1	17619	9528	2661
Haribinger	hv_3	PHNK01000439.1	17816	23258	1249
Cacta	hv_30	PHNK01091997.1	3181	12068	2261
Cacta	hv_31	PHNK01098225.1	1674	9957	2261
Cacta	hv_32	PHNK01103546.1	3311	12058	1507
Cacta	hv_33	PHNK01106688.1	14434	21114	1137
Cacta	hv_34	PHNK01111681.1	13770	20940	1142
Cacta	hv_35	PHNK01112273.1	717	9000	1505
Cacta	hv_4	PHNK01003043.1	3395	11469	2661
Haribinger	hv_4	PHNK01001203.1	14262	18511	677
Cacta	hv_5	PHNK01004979.1	13289	22193	1504
Haribinger	hv_5	PHNK01001531.1	19723	22639	676
Cacta	hv_6	PHNK01010360.1	3634	11648	2262

Continuação Tabela 02

Classe	Código do ET*	Coting	A*	B*	C*
Haribinger	hv_6	PHNK01002641.1	2580	7158	539
Cacta	hv_7	HNK01011574.1	661	8934	2262
Haribinger	hv_7	PHNK01004762.1	3340	10578	315
Cacta	hv_8	PHNK01011700.1	1004	6381	1137
Haribinger	hv_8	PHNK01006365.1	4052	6312	744
Cacta	hv_9	PHNK01014513.1	13621	16588	552
Haribinger	hv_9	PHNK01006948.1	10152	13081	902

*ET: elemento transponível; A: início do ET no coting; B: fim do ET no coting; C:tamanho da transposase;

Tabela 03. Elementos transponíveis de *H. vastatrix* mapeados no transcriptoma do patossistema

Hospedeiro*	Classe	Código do ET*	A*	B*	C*	D*	E*
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_1	12 HAI	PHNK01000069.1	16308	18150	CUFF.41.1
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_1	17 DAI	PHNK01000069.1	16243	18028	CUFF.55.1
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_1	6 HAI	PHNK01000069.1	16331	18131	CUFF.31.1
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_2	12 HAI	PHNK01003495.1	5126	6634	CUFF.1084.1
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_2	17 DAI	PHNK01003495.1	5171	6688	CUFF.1286.1
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_2	24 HAI	PHNK01003495.1	5171	6688	CUFF.1286.1
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_3	12 HAI	PHNK01020067.1	5270	5998	CUFF.2655.1
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_3	6 HAI	PHNK01020067.1	5341	6077	CUFF.1948.1
<i>C. arabica</i>	DNA	dna_4	12 HAI	PHNK01045461.1	10092	11191	CUFF.3499.1
HDT	LTR	ltr_1	24 HAI	PHNK01000046.1	19404	21025	CUFF.27.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_10	0 HAI	PHNK01002314.1	4	4264	CUFF.1615.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_10	12 HAI	PHNK01002314.1	2604	4286	CUFF.798.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_10	17 DAI	PHNK01002314.1	2586	4165	CUFF.959.1
HDT	LTR	ltr_10	24 HAI	PHNK01002314.1	2598	4240	CUFF.735.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_10	6 HAI	PHNK01002314.1	2724	4258	CUFF.595.1
HDT	LTR	ltr_10	6 HAI	PHNK01002314.1	2622	4240	CUFF.273.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	0 HAI	PHNK01002401.1	5995	9352	CUFF.1657.3
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	0 HAI	PHNK01002401.1	5981	9352	CUFF.1657.2
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	0 HAI	PHNK01002401.1	5981	9352	CUFF.1657.2
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	0 HAI	PHNK01002401.1	4991	9352	CUFF.1657.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	0 HAI	PHNK01002401.1	4254	9352	CUFF.1658.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	12 HAI	PHNK01002401.1	7399	9222	CUFF.822.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	12 HAI	PHNK01002401.1	7289	9222	CUFF.821.1
HDT	LTR	ltr_11	24 HAI	PHNK01002401.1	7301	9086	CUFF.757.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	6 HAI	PHNK01002401.1	6299	9098	CUFF.610.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	6 HAI	PHNK01002401.1	7080	9098	CUFF.611.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_11	6 HAI	PHNK01002401.1	7080	9098	CUFF.611.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_12	0 HAI	PHNK01002482.1	22953	25349	CUFF.1702.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_13	0 HAI	PHNK01002641.1	8572	10082	CUFF.1775.1
HDT	LTR	ltr_14	24 HAI	PHNK01002724.1	1425	2826	CUFF.836.1

Continuação tabela 03

Hospedeiro*	Classe	Código do ET*	A*	B*	C*	D*	E*
HDT	LTR	ltr_14	24 HAI	PHNK01002724.1	4	1304	CUFF.835.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_15	0 HAI	PHNK01003389.1	10554	12470	CUFF.2135.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_16	12 HAI	PHNK01003512.1	7236	9881	CUFF.1085.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_17	0 HAI	PHNK01004788.1	7518	8926	CUFF.2600.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_18	12 HAI	PHNK01005702.1	6118	10354	CUFF.1423.1
HDT	LTR	ltr_18	24 HAI	PHNK01005702.1	7828	10092	CUFF.1312.1
HDT	LTR	ltr_18	24 HAI	PHNK01005702.1	7828	10092	CUFF.1312.2
HDT	LTR	ltr_18	24 HAI	PHNK01005702.1	7828	10092	CUFF.1313.1
HDT	LTR	ltr_18	24 HAI	PHNK01005702.1	7828	10092	CUFF.1313.1
HDT	LTR	ltr_18	6 HAI	PHNK01005702.1	8632	10079	CUFF.486.1
HDT	LTR	ltr_18	6 HAI	PHNK01005702.1	6121	7029	CUFF.485.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_19	0 HAI	PHNK01016835.1	19458	20952	CUFF.4858.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_2	0 HAI	PHNK01000146.1	8891	11359	CUFF.151.3
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_2	12 HAI	PHNK01000146.1	9054	10735	CUFF.66.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_20	0 HAI	PHNK01018932.1	8022	10427	CUFF.5318.3
HDT	LTR	ltr_20	0 HAI	PHNK01018932.1	8538	9562	CUFF.611.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_20	12 HAI	PHNK01018932.1	8218	10632	CUFF.2525.3
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_20	6 HAI	PHNK01018932.1	7961	10633	CUFF.1857.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_21	0 HAI	PHNK01019040.1	15304	16521	CUFF.5342.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_21	0 HAI	PHNK01019040.1	14937	16612	CUFF.5341.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_22	0 HAI	PHNK01019151.1	9384	12732	CUFF.5381.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_23	0 HAI	PHNK01021384.1	11552	13322	CUFF.5888.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_23	12 HAI	PHNK01021384.1	11908	13266	CUFF.2800.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_24	0 HAI	PHNK01022030.1	19026	21447	CUFF.6020.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_24	0 HAI	PHNK01022030.1	19026	21447	CUFF.6020.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_24	0 HAI	PHNK01022030.1	19026	21447	CUFF.6019.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_25	0 HAI	PHNK01035597.1	8149	9698	CUFF.7123.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_3	0 HAI	PHNK01000202.1	13076	14673	CUFF.187.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_3	17 DAI	PHNK01000202.1	12867	14473	CUFF.117.1
HDT	LTR	ltr_3	24 HAI	PHNK01000202.1	12918	14671	CUFF.85.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_3	24 HAI	PHNK01000202.1	12867	14473	CUFF.117.1
HDT	LTR	ltr_3	24 HAI	PHNK01000202.1	12918	14671	CUFF.84.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_4	0 HAI	PHNK01000393.1	7313	11061	CUFF.363.1
HDT	LTR	ltr_5	24 HAI	PHNK01000692.1	19975	21116	CUFF.270.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_6	17 DAI	PHNK01001159.1	8407	10729	CUFF.566.1
HDT	LTR	ltr_6	24 HAI	PHNK01001159.1	9571	11135	CUFF.434.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_6	6 HAI	PHNK01001159.1	10196	11208	CUFF.348.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_7	12 HAI	PHNK01001260.1	3357	4861	CUFF.496.1
HDT	LTR	ltr_7	12 HAI	PHNK01001260.1	3586	4926	CUFF.493.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_7	17 DAI	PHNK01001260.1	4059	4886	CUFF.603.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_7	17 DAI	PHNK01001260.1	82	3917	CUFF.602.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_7	17 DAI	PHNK01001260.1	20	3917	CUFF.601.1
HDT	LTR	ltr_7	24 HAI	PHNK01001260.1	34	3501	CUFF.462.1
HDT	LTR	ltr_7	24 HAI	PHNK01001260.1	3613	5088	CUFF.463.1

Continuação tabela 03

Hospedeiro*	Classe	Código do ET*	A*	B*	C*	D*	E*
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_7	6 HAI	PHNK01001260.1	3157	4864	CUFF.364.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_8	0 HAI	PHNK01002280.1	14425	16197	CUFF.1589.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_8	0 HAI	PHNK01002280.1	17201	19172	CUFF.1590.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_8	12 HAI	PHNK01002280.1	14423	16441	CUFF.784.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_8	12 HAI	PHNK01002280.1	14423	16441	CUFF.783.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_8	17 DAI	PHNK01002280.1	14426	16221	CUFF.944.1
<i>C. arabica</i>	LTR	ltr_8	17 DAI	PHNK01002280.1	14426	16449	CUFF.943.1
HDT	LTR	ltr_8	24 HAI	PHNK01002280.1	14427	16732	CUFF.724.1

*HDT: Híbrido de Timor (incompatível e resistente); *C.arabica* (compatível e suscetível) HAI: Horas após a inoculação; DAI: Dias Após a inoculação; ET: Elemento transponível; A:Tempo de inoculação; B:Coting; C:Início no Coting; D:Fim no Coting; E:Transcripts

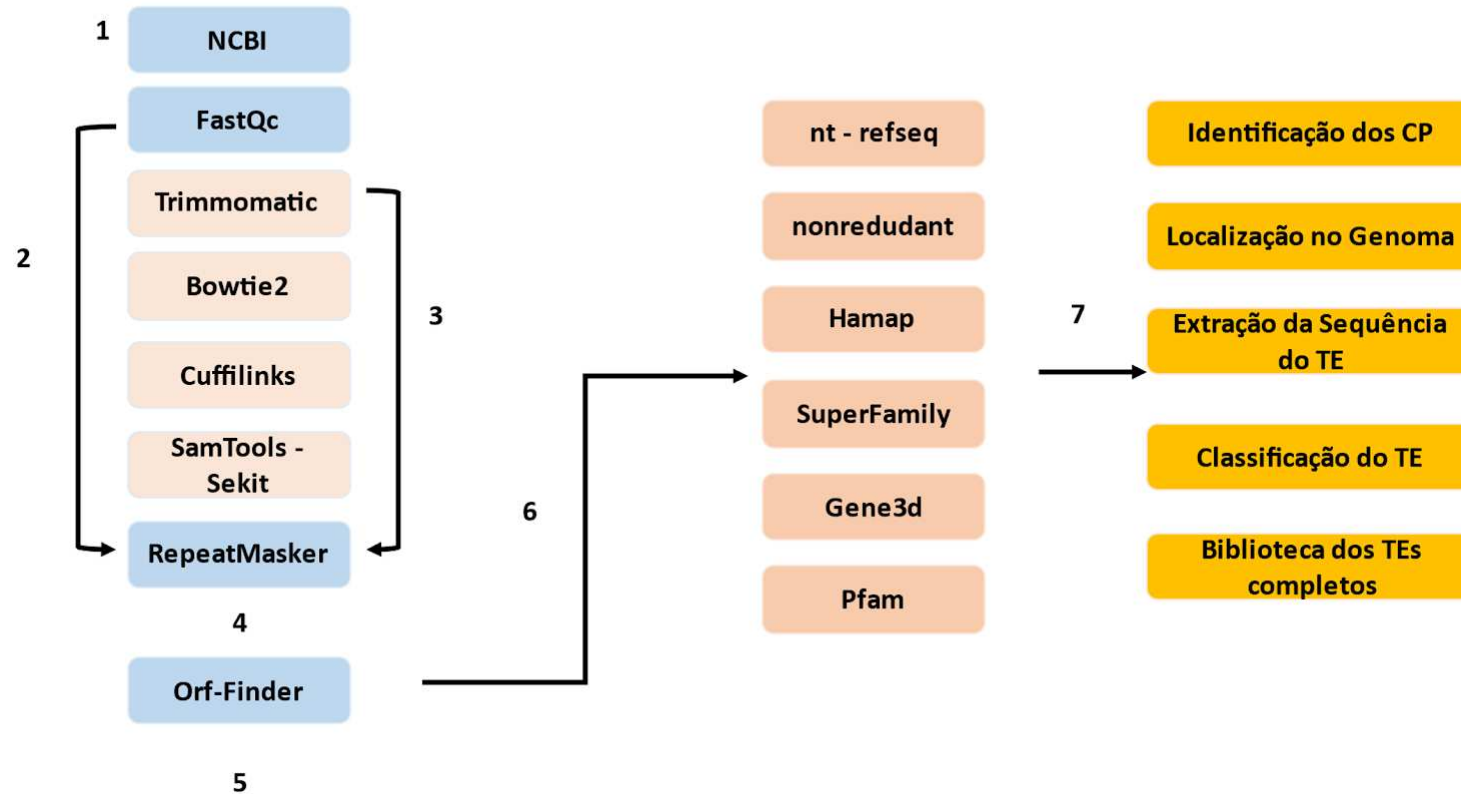


Figura 1. Etapas do script com programas e banco de dados usados para mapear os ETs no genoma e no transcriptoma de *H. vastatrix*. (1) Download do genoma de *H. vastatrix* e do transcriptoma da interação compatível e incompatível; (2) roteiro das análises utilizadas para identificação dos ETs no genoma de *H. vastatrix*; (3) sequência de análises para a identificação dos ETs nas interações compatível e incompatível entre *H. vastatrix* e *Coffea* spp.; (4) Identificação dos ETs com o RepeatMasker e obtenção das sequências dos candidatos a ETs; (5) identificação das ORFs dos ETs; (6) banco de dados utilizados para identificação das ORFs; (7) estratégia para obtenção das sequências dos ETs completos.

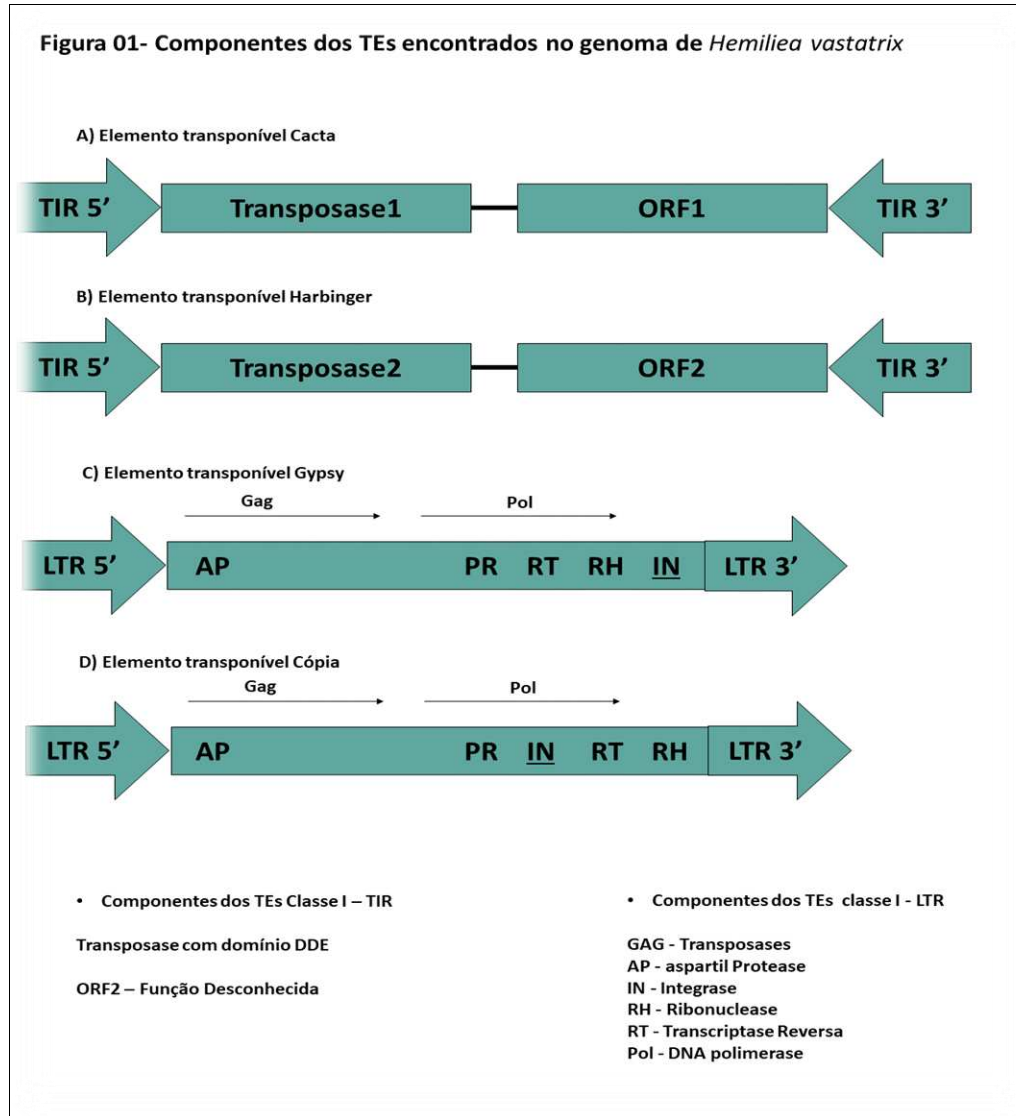


Figura 2. Componentes estruturais dos elementos transponíveis encontrados no genoma da raça XXXIII de *H. vastatrix*

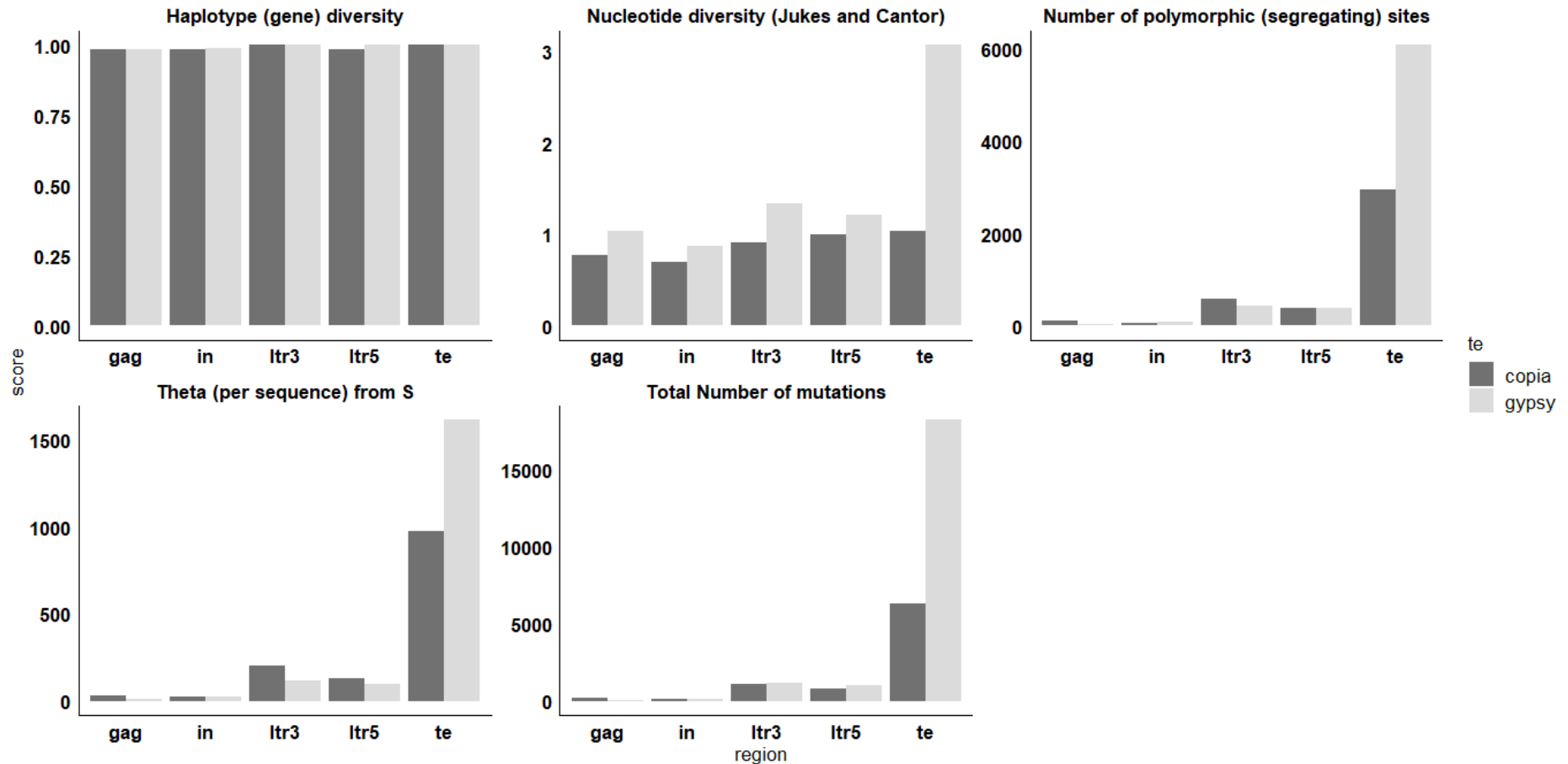


Figura 3. Descritores da variabilidade genética entre sequências de nucleotídeos dos elementos transponíveis Copia e Gypsy. Onde, proteína GAG (gag), integrase (in), região terminal longa 3' (ltr3), região terminal longa 5' (ltr5) e elemento transponível (te).

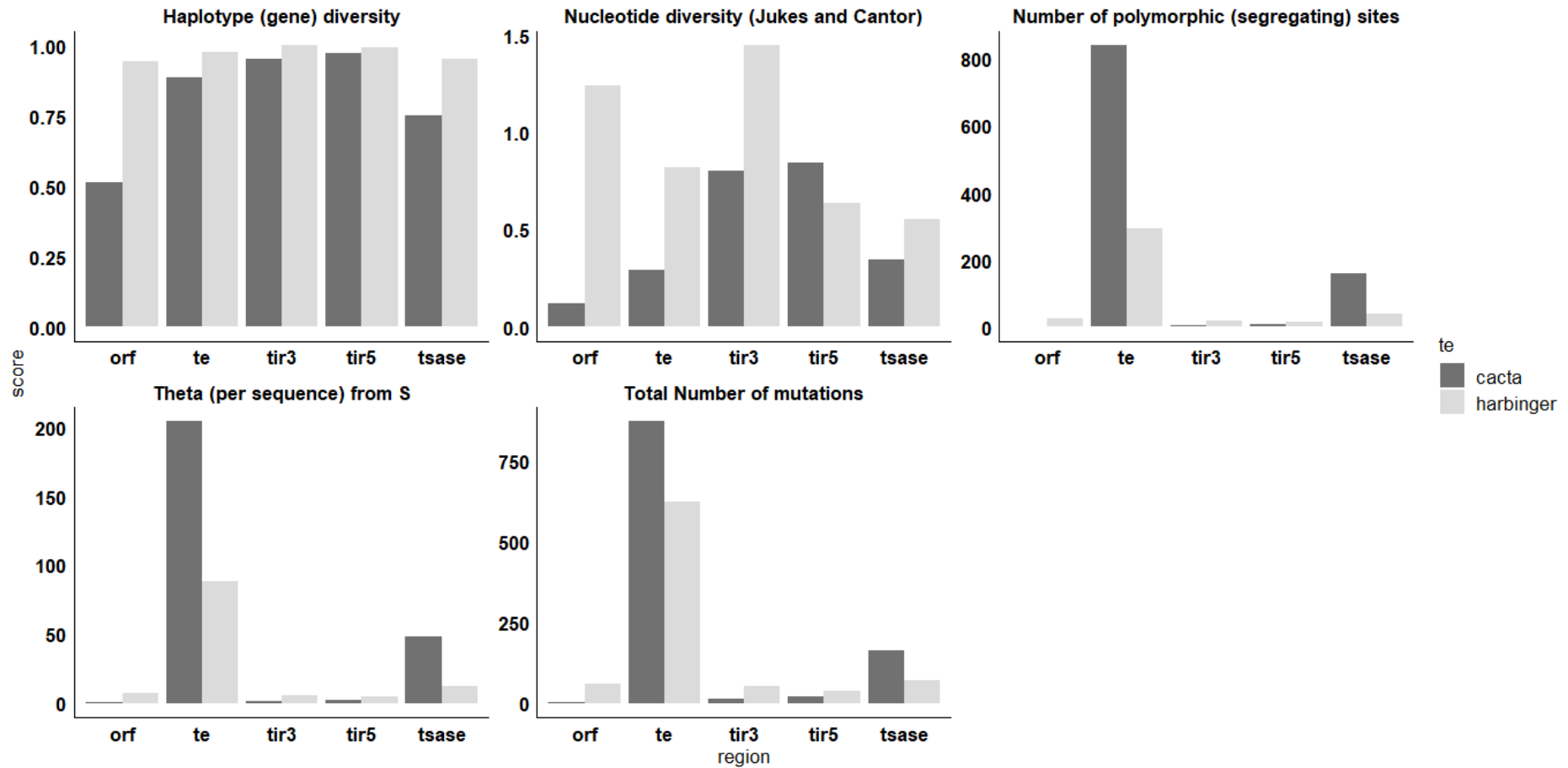


Figura 4. Descritores da variabilidade genética entre seqüências de nucleotídeos da transposase dos elementos transponíveis Cacta e Harbinger. Onde, elemento transponível (te), região aberta para leitura (ORF), transposase (tsase), TIR3' e TIR5'.

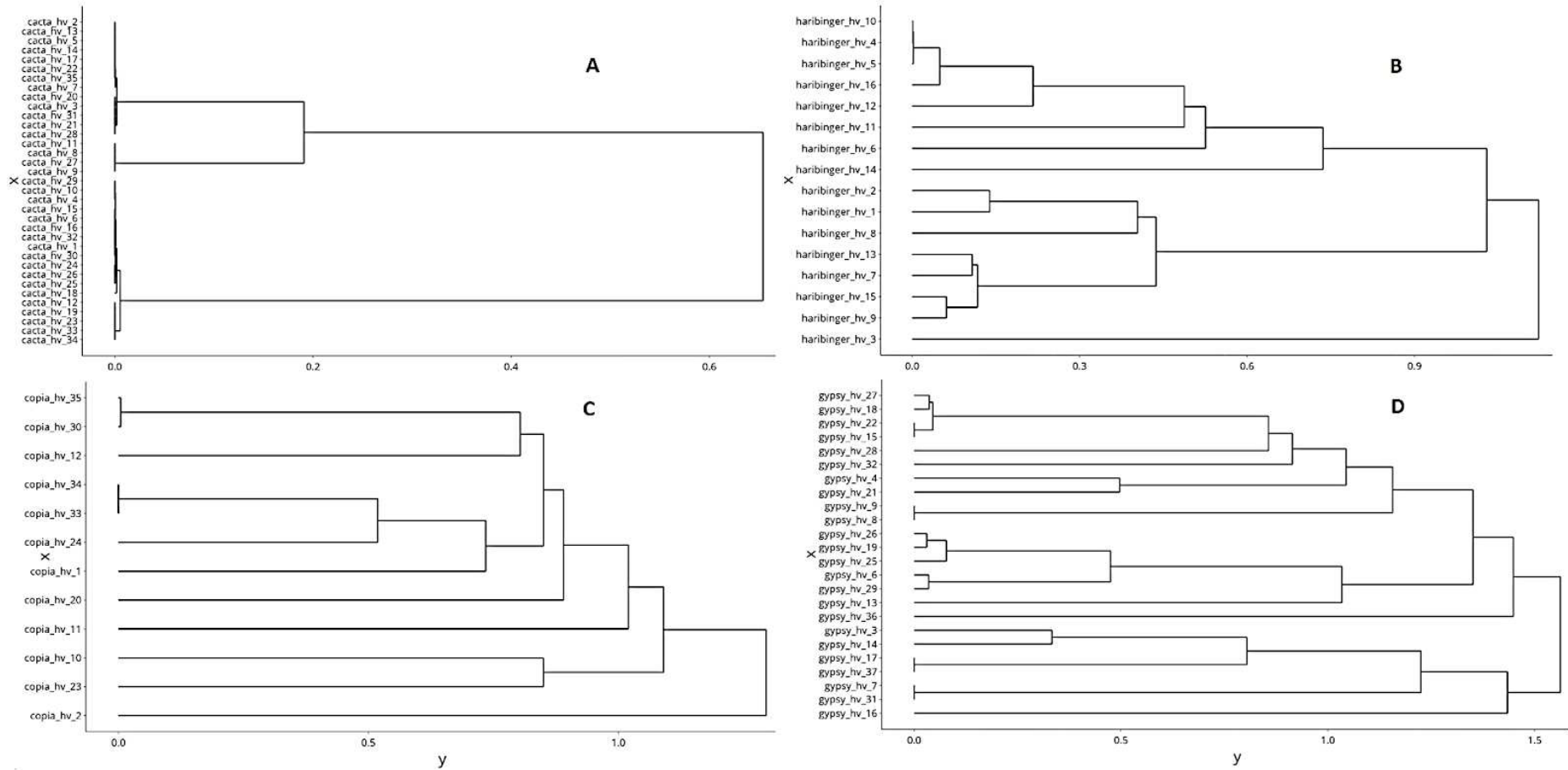


Figura 5. Dendrograma construído a partir das seqüências de nucleotídeos da transposase dos elementos transponíveis Cacta (A), Harbinger (B), e da proteína gag para os LTRs Copia (C) e Gypsy (D). A distância de Kimura (1980) foi usada como medida de dissimilaridade, y é a taxa de transversão e x é a identificação do elemento transponível. Nesta análise, uma transição é a substituição de uma pirimidina (C, T) por outra, ou a substituição de uma purina (A, G) por outra. Uma transversão é a substituição de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa.

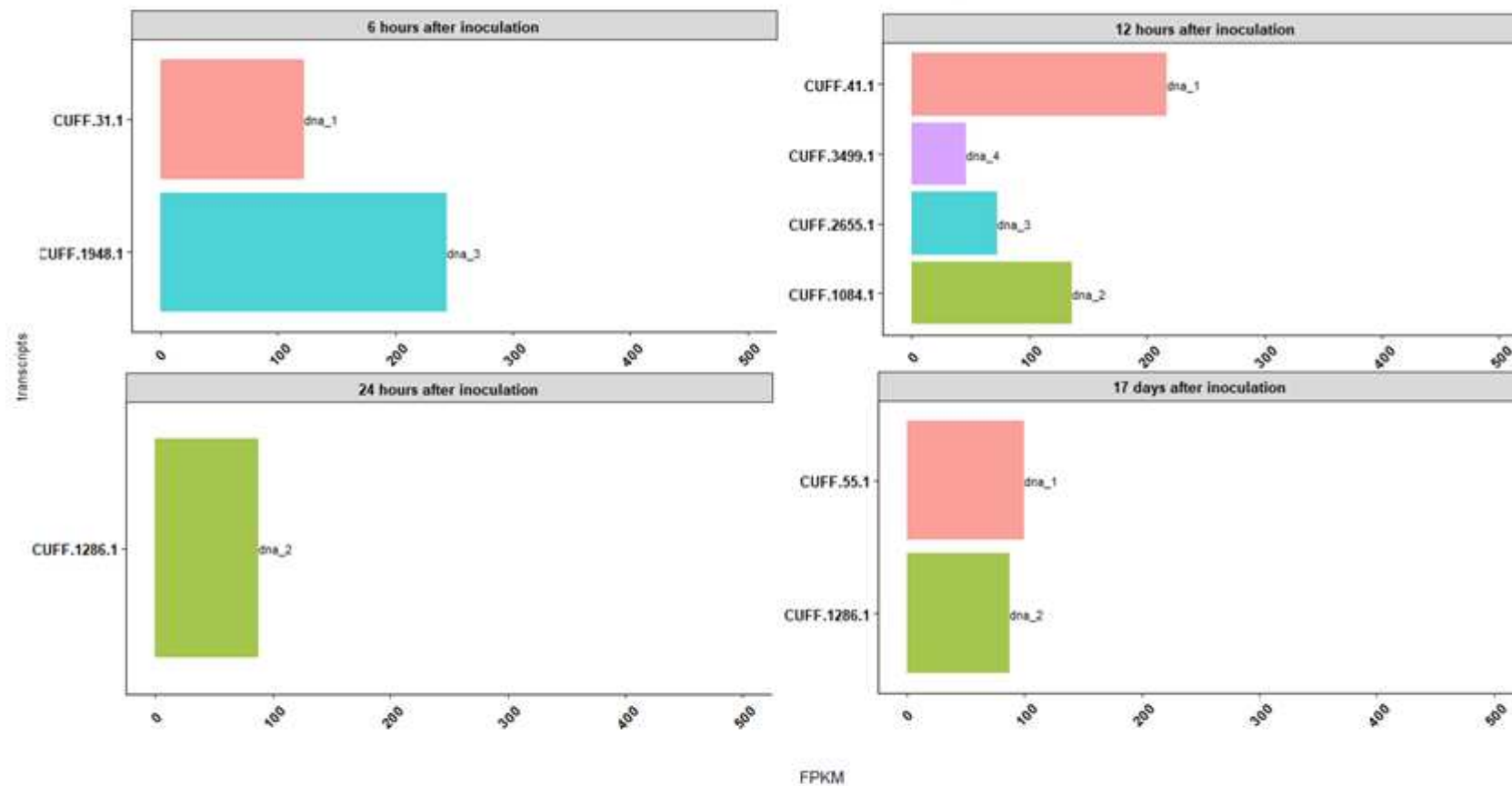


Figura 6. Elementos transponíveis da classe II (DNA) e os respectivos transcritos (Cuff.) encontrados durante a interação compatível entre *Hemileia vastatrix* e *Coffea arabica*

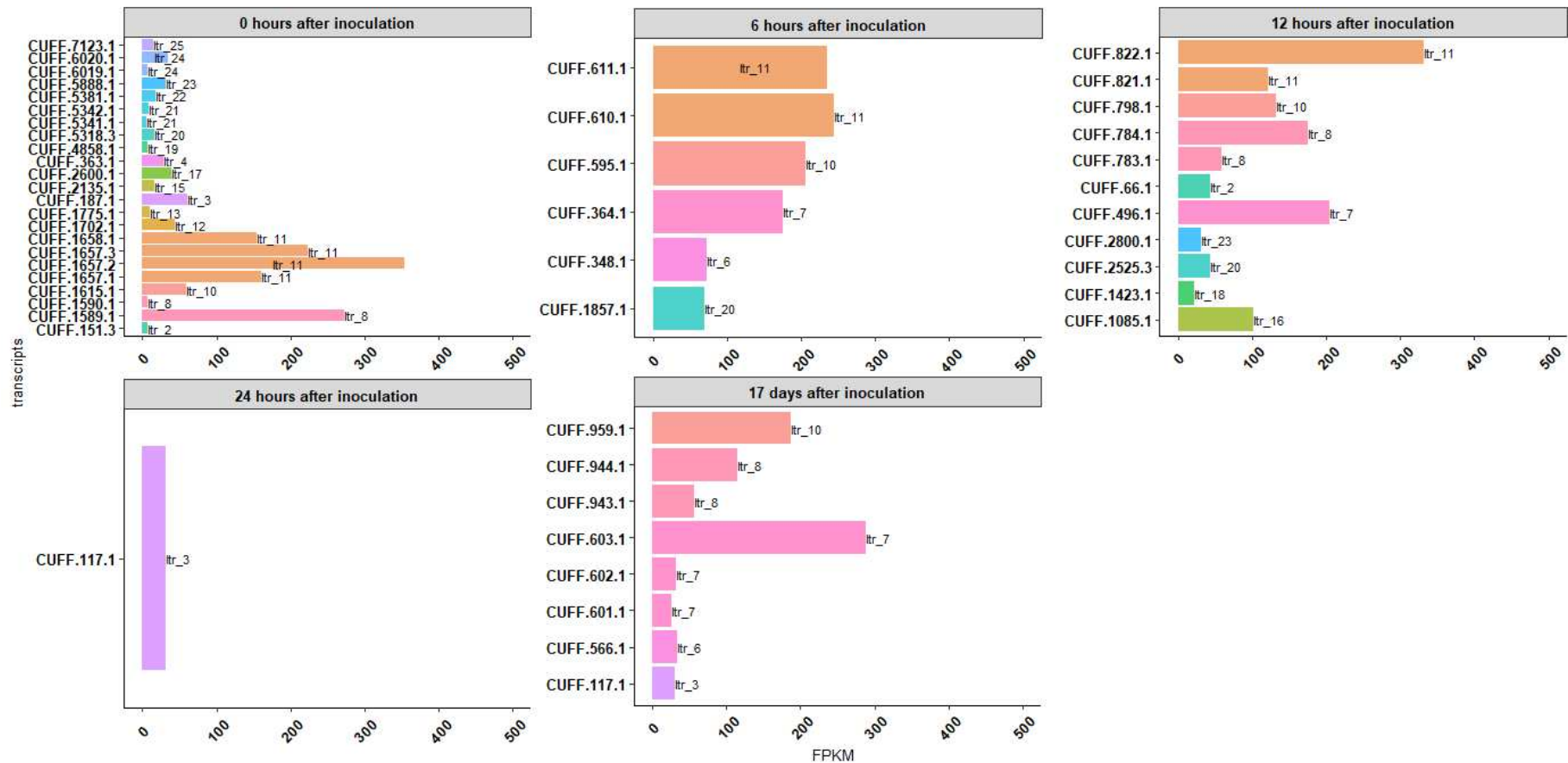


Figura 7. Elementos transponíveis da classe I (retrotransposons) e os respectivos transcritos (Cuff_n) encontrados durante a interação compatível entre *Hemileia vastatrix* e *Coffea arabica*.

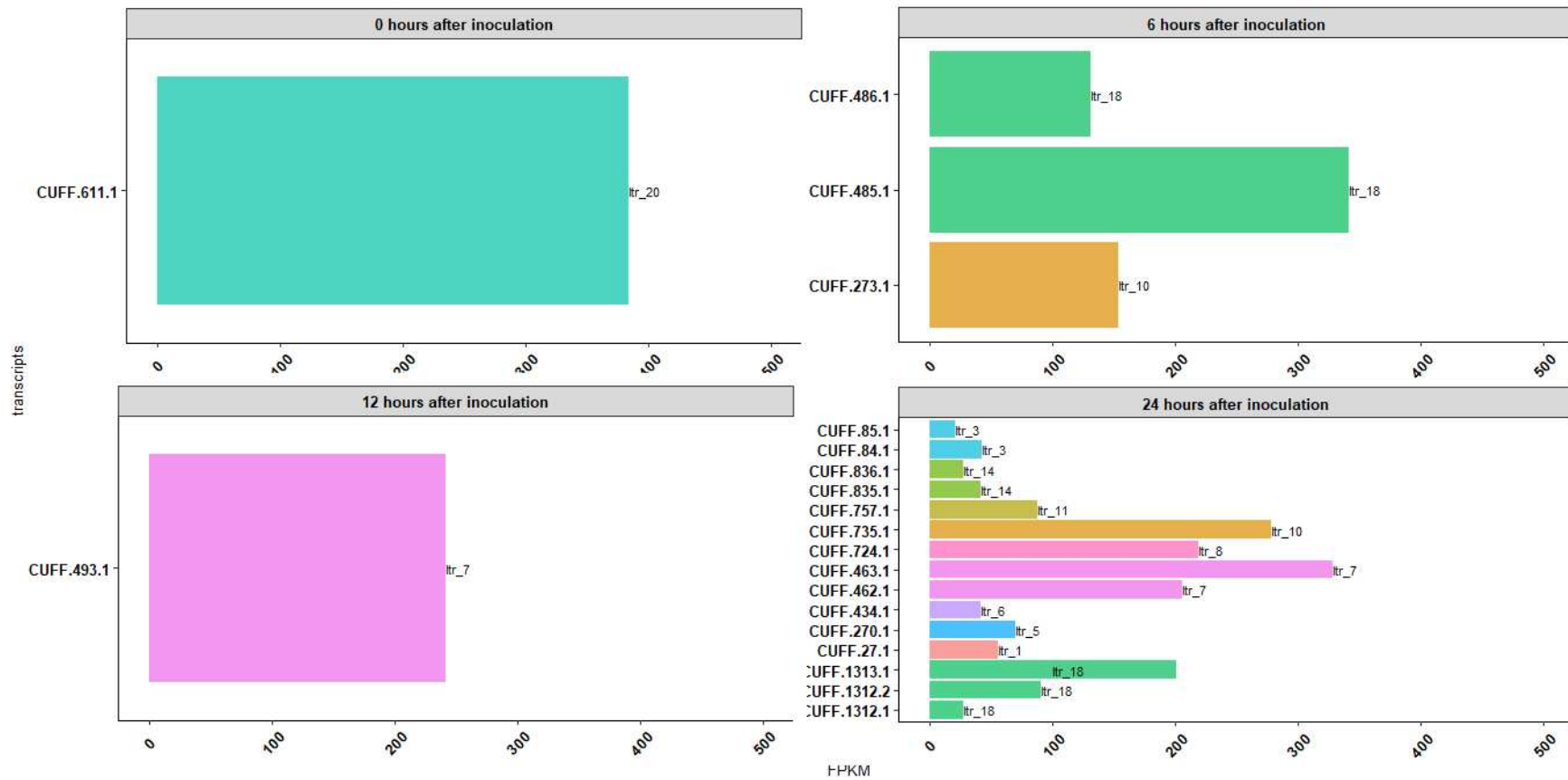


Figura 8. Elementos transponíveis da classe I (retrotransposons) e os respectivos transcritos (Cuff_n) encontrados durante a interação incompatível entre *Hemileia vastatrix* e o Híbrido de Timor.

3.6. Referências

- ANDERSEN, E J. ALI, S. BYAMUKAMA, E. YEN, Y. & NEPAL, M. P. Disease resistance mechanisms in plants. **Genes**, v.9 2018. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- BARÇA G. D. CAIXETA E. T. FERREIRA S. S. & ZAMBOLIM L. (2020). In silico guided structural and functional analysis of genes with potential involvement in resistance to coffee leaf rust: A functional marker based approach. **PLoS ONE** 15(7) 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222747>
- BOLGER, A. M. LOHSE, M. & USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30(15), 2114–2120. (2014). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- CAPUCHO, A. S. ZAMBOLIM, E. M. FREITAS, R. L. HADDAD, F. CAIXETA, E. T. & ZAMBOLIM, L. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on Coffea arabica Catimor derivatives in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, 7(1), 189–191. (2012). <https://doi.org/10.1007/s13314-012-0081-7>
- CASTRO, I. S. L. FREITAS-LOPES, R. D. L. FERREIRA, S. DE S. MACIEL, T. E. F. FLOREZ, J. C. ZAMBOLIM, E. M. ZAMBOLIM, L. & CAIXETA, E. T. Transcriptome Analysis Uncovers the Gene Expression Profile of *Hemileia vastatrix* (Race XXXIII) during the Interactions with Resistant and Susceptible Coffee. **Agronomy**, 12(2). (2022). <https://doi.org/10.3390/agronomy12020444>
- CHEN, J. Y. LIU, C. GUI, Y. J. SI, K. W. ZHANG, D. D. WANG, J. SHORT, D. P. G. HUANG, J. Q. LI, N. Y. LIANG, Y. ZHANG, W. Q. YANG, L. MA, X. F. LI, T. G. ZHOU, L. WANG, B. L. BAO, Y. M. SUBBARAO, K. V. ZHANG, G. Y. & DAI, X. F. Comparative genomics reveals cotton-specific virulence factors in flexible genomic regions in *Verticillium dahliae* and evidence of horizontal gene transfer from Fusarium. **New Phytologist**, 217(2), 756–770. (2018). <https://doi.org/10.1111/nph.14861>
- DONG, S. RAFFAELE, S. & KAMOUN, S. The two-speed genomes of filamentous pathogens: Waltz with plants. **Current Opinion in Genetics and Development**, 35, 57–65. (2015). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.09.001>
- EDGAR, R. C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, 5, 1–19. (2004). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **TIG APRIL** 1989 vol. 5, n°. 4 (1989). doi: 10.1016/0168-9525(89)90039-5
- FLOR H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** Vol. 9:275-296 1971. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- FLYNN, J. M. HUBLEY, R. GOUBERT, C. ROSEN, J. CLARK, A. G. FESCHOTTE, C. & SMIT, A. F. RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable

element families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(17), 9451–9457 (2020). <https://doi.org/10.1073/pnas.1921046117>

- PORTO, B. N. CAIXETA, E. T. MATHIONI, S. M. VIDIGAL, P. M. P. ZAMBOLIM, L. ZAMBOLIM, E. M. DONOFRIO, N. POLSON, S. W. MAIA, T. A. CHEN, C. ADETUNJI, M. KINGHAM, B. DALIO, R. J. D. & DE RESENDE, M. L. V. Genome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* reveal expression dynamics of candidate effectors dependent on host compatibility. *PLoS ONE*, 14(4), 1–23. (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215598>
- QUEVILLON, E. SILVENTOINEN, V. PILLAI, S. HARTE, N. MULDER, N. APWEILER, R. & LOPEZ, R. InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 116–120. (2005). <https://doi.org/10.1093/nar/gki442>
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.13.090175.000405>
- ROMBEL, I. T. SYKES, K. F. RAYNER, S. & JOHNSTON, S. A. ORF-FINDER: A vector for high-throughput gene identification. *Gene*, 282(1–2), 33–41. (2002). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00819-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00819-8)
- ROZAS, J. SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C. MESSEGUER, X. & ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496–2497. (2003). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
- TRAPNELL, C. ROBERTS, A. GOFF, L. PERTEA, G. KIM, D. KELLEY, D. R. PIMENTEL, H. SALZBERG, S. L. RINN, J. L. & PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562–578. (2012). <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>
- WANG, X. AI, G. ZHANG, C. CUI, L. WANG, J. LI, H. ZHANG, J. & YE, Z. Expression and diversification analysis reveals transposable elements play important roles in the origin of *Lycopersicon*-specific lncRNAs in tomato. *New Phytologist*, 209(4), 1442–1455. (2016). <https://doi.org/10.1111/nph.13718>
- WELLS, J. N. & FESCHOTTE, C. A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements. *Annual Review of Genetics*, 54, 539–561 (2020). <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-040620-022145>
- WICKER T. SABOT F. HUA-VAN A. BENNETZEN J. L. CAPY P. CHALHOUB B. FLAVELL A. LEROY P. MORGANTE M. PANAUD O. PAUX E. SANMIGUEL P. & SCHULMAN A. H. Reply: A unified classification system for eukaryotic transposable elements should reflect their phylogeny. *Nature Reviews Genetics* 10(4) 276. 2009. <https://doi.org/10.1038/nrg2165-c4>
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1–8. (2016). <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>

4. CAPÍTULO II

Identificação de elementos transponíveis em três espécies de
Coffea spp.

Identificação de elementos transponíveis em três espécies de *Coffea* spp.

4.1. Introdução

As espécies de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (aproximadamente 60 e 40% da produção mundial, respectivamente) são as duas espécies de importância econômica para produção de café e representam quase a totalidade da produção mundial (ICO, 2019). A espécie *C. arabica* possui melhores atributos relacionadas qualidade de bebida como acidez, aroma e adstringência. Enquanto, *C. canephora* é considerada mais resistente a doenças e pragas e possui maior teor de cafeína do que *C. arabica* (Souza *et al.* 2018; Zambolim, 2016). A espécie *C. arabica* é geralmente caracterizada por um baixo polimorfismo molecular em relação às espécies do gênero *Coffea*. O baixo polimorfismo molecular pode ser atribuído à sua origem poliploide, biologia reprodutiva e diferenciação recente sob o ponto de vista evolutivo em espécie (Bawin *et al.* 2021). No entanto, estudos recentes sugerem a existência de regiões polimórficas em partes específicas do genoma (Alkimim *et al.* 2017).

Estes estudos abrem precedentes para investigação de mecanismos de variabilidade que consideram modelos de adaptação com taxas evolutivas diferenciais ao longo do genoma de plantas (Bennetzen e Wang, 2014). Dentre os mecanismos de variabilidade genética que atuam sobre os genomas de plantas, os elementos transponíveis (ETs) são os mais abundantes e influenciam no desenvolvimento de plantas (Quesneville, 2020). Os ETs estão envolvidos em eventos de duplicações, deleções, inversões, translocações, movimento de genes e a evolução de novas sequências funcionais de codificação de proteínas ao longo do genoma de plantas para a adaptação em novos nichos ecológicos (Feschotte *et al.* 2002; Almojil *et al.* 2021). Os ETs podem ser classificados em duas classes.

Os retrotransposons (classe I) da superfamília Gypsy estão entre os mais ativos em plantas (Lee e Kim, 2014). O elemento transponível Gypsy completo possui um complexo de proteínas gag-polimerase, integrase, ribonuclease, aspartil protease, transcriptase reversa, LTR3' e LTR5'. A localização de cada componente ao longo do elemento transponível é critério de classificação estrutural dos retrotransposons. O elemento transponível da superfamília Gypsy se difere da superfamília Copia por conter a integrase próxima ao complexo gag-polimerase (Wells e Feschotte, 2020).

Considerando a classe II, o elemento transponível *Cacta* possui grande mobilidade no genoma de plantas (Catoni *et al.* 2019). Estes elementos transponíveis estão envolvidos na expansão dos genomas e diferenciação de espécies de plantas (Wicker *et al.* 2003). Diversas espécies vegetais, como milho, arroz, *arabidopsis*, ervilha e soja possuem elementos *Cacta* clonados e caracterizados (Ping-Fang, 2006). O ET completo possui duas TIRs (*Terminal inverted repeat sequences*), uma ORF (*Open reading frame*) que codificam uma transposase e uma segunda ORF que codifica uma proteína de função desconhecida. Acredita-se que a segunda ORF auxilie na transposição, porém a transposase com *motif* DDE (endonuclease) altamente conservado é a enzima de transposição chave. Geralmente, as TIRs nas extremidades 5' e 3' possuem *motif* altamente conservado CACTA e TAGTG, respectivamente, daí o nome do elemento (Wells e Feschotte, 2020).

Considerando as diferenças nos componentes estruturais e o impacto ETs no genoma de plantas, é razoável supor que os elementos transponíveis Gypsy (classe I) e *Cacta* (classe II) podem ter desempenhado um papel relevante ainda desconhecido na divergência genética entre *C.arabica*, *C.canephora* e *C. eugenioi-des*. Neste contexto, o presente trabalho teve o objetivo de identificar e analisar a diversidade genética nas populações de elementos transponíveis Gypsy e *Cacta* encontrados em três espécies do cafeeiro.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Identificação e caracterização dos elementos transponíveis em *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea eugenioi-des*

Para identificação dos ETs foram utilizados os genomas das espécies de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioi-des* disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com os números de acesso PRJNA506972 (*C. arabica*, Caturra vermelho, planta CCC135-36), PRJEB4211 (*C. canephora*, planta DH200-94) e PRJNA508372 (*C.eugenioi-des*, planta CCC68of). As principais etapas estão descritas na Figura 1.

Na etapa 1, os genomas baixados do NCBI tiveram a qualidade aferidas pelo programa FastQc. Na etapa 2, os ETs de Classe I e II presentes nas regiões do ge-

noma de *H. vastratrix* foram identificados através dos programas RepeatModeller v. 2.0.1 e RepeatMasker v.4.1.1. A biblioteca Dfam foi utilizada como referência de ETs para plantas (Flynn *et al.* 2008). Foi realizado um *BLASTN* dos ETs contra o genoma das 3 espécies do gênero *Coffea*. As sequências selecionadas foram submetidas ao programa ORF-Finder para localização das ORFs.

Posteriormente, na etapa 3, sequências das ORFs foram submetidas os bancos de dados nt, nonredundat, Pfam, CDD, COILS, Gene3D, HAMAP, SUPERFAMILY e TIGRFAM para identificação dos componentes dos ETs (Rombel, 2008; Quevilon *et al.* 2005). A identificação das extremidades LTR (*Long terminal repeat*) e TIRs (*Terminal inverted repeats*) dos ETs foram verificadas com o programa de alinhamento Muscle (Edgar, 2004). Na etapa 4, as sequências das ORFs (*Open reading frame*) dos componentes gag, polimerase, ribonucleases, aspartil protease, integrase e transcriptase reversa foram extraídas para os ETs Gypsy. Para o transposon Cacta, as ORFs das transposases e da segunda ORF, quando existente, foram utilizadas para elaboração do banco de dados dos elementos transponíveis. Cada ORF e as extremidades foram considerados componentes estruturais dos elementos transponíveis Gypsy e Cacta.

4.2.2. Descritores de variabilidade genética

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas com o programa Muscle. Os ETs e seus componentes estruturais foram analisados como populações. Os arquivos de alinhamentos foram utilizados para obtenção dos descritores de variabilidade genética no programa DnaSP v. 5.10 (Rozas *et al.* 2003). Os descritores utilizados nas análises foram: número de sequências; número total de sítios segregantes (s); diferenças médias de nucleótidos entre as sequências (k); diversidade de nucleotídeos (π); número total de mutações; número de haplótipos (h); diversidade de haplótipos (Hd); e estimador de Watterson para a taxa de mutação em escala populacional com base no número total de sítios segregantes (θ -W).

4.2.3. Análise discriminante de componentes principais (DAPC)

A Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) foi realizada com pacote adegenet do programa R (Jombart, 2008). O método DAPC destina-se a

descrever a diversidade entre grupos populacionais previamente definidos. Os ETs completos encontrados nas respectivas espécies de *Coffea* foram analisados como uma população. O algoritmo do método DAPC gerou autovalores e autovetores a partir da transformação dos nucleotídeos em códigos numéricos. Os autovalores e autovetores gerados foram mantidos para conservar toda a variação nos dados originais e estruturar a população apresentada nos gráficos.

4.2.4. Divergência evolutiva

Para verificar a divergência evolutiva no genoma das três espécies de café, as sequências de elementos transponíveis foram alinhadas e submetidas aos modelos evolutivos disponíveis no pacote ape do R. As taxas de transição e transversão foram calculadas para esses alinhamentos e, em seguida, transformadas para distâncias de Kimura “K80” com a seguinte equação: $K = -1/2 \ln(1 - 2p - q) - 1/4 \ln(1 - 2q)$, onde q é a proporção de sites com transversões e p é a proporção de sites com transições (Paradis e Schliep, 2019; Strimmer *et al.* 2012).

4.3. Resultados

4.3.1. A integrase é componente do elemento GYPSY mais polimórfico para *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea eugenioides*

As análises de bioinformática possibilitaram a identificação e caracterização de 119 elementos transponíveis Gypsy completos em *C. arabica*, 129 em *C. canephora* e 98 em *C. eugenioides*. Os descritores da diversidade genética evidenciaram que existem polimorfismos entre os componentes do elemento transponível Gypsy nas espécies de *Coffea* estudadas (Figura 2). Por outro lado, as regiões que codificam a proteínas gag em *C. arabica* e *C. eugenioides* possuem as menores taxa de diversidade de nucleotídeos. Não houve diferenças na diversidade de haplotipos.

Os resultados de θ -W, número de sítios polimórficos e o número de mutações indicam que vários componentes dos transposons Gypsy possuem diversidade genética. A integrase e aspartil protease são um hotspots de mutações considerando os componentes estruturais dos ETs em *C. eugenioides*. Já a transcriptase reversa e a

integrase foram as mais divergentes em *C. arabica*. Para *C. canephora*, a região que codifica a proteína gag foi considerada a mais polimórfica (Figura 2).

A análise discriminante de componentes principais evidenciou quais os sítios que mais contribuíram para diferenciação da população dos elementos Gypsy no genoma do cafeeiro (Figura 4). As análises dos 347 retrotransposons identificaram 12362 possíveis componentes LTRs, gag, polimerase, integrase, ribonuclease, transcriptase reversa e aspartil protease. Os retrotransposons foram estruturados em função da espécie de café na qual o ETs foi identificado. A maior diversidade de ETs foi observada no genoma de *Coffea canephora* (0,71). Os SNPs que os mais contribuíram para a diversidade dos ETs estão localizados nas posições 15587, 15541 e 15563 das sequências alinhadas.

4.3.2. Os elementos transponíveis CACTA são mais polimórficos em *Coffea arabica*

As análises de bioinformática possibilitaram identificar e caracterizar 55 elementos transponíveis Cacta em *C. arabica*, 46 em *C. canephora* e 49 em *C. eugenioides*. Os descritores evidenciaram que as mutações nos ETs estão concentradas entre regiões codificadoras dos componentes estruturais e as extremidades TIR3', TIR5'. No entanto, as transposases possuem mais mutações em *C. arabica* e *C. eugenioides*. A diversidade de nucleotídeos foi mais baixa em *C. eugenioides* para a transposase (0,02), segunda ORF (0,15) e ET completo (0,02). A espécie *C. arabica* apresentou os maiores estimadores de diversidade genética para transposase (0,41), segunda ORF (0,52) e elemento transponível completo (0,37) (Figura 3).

Os elementos transponíveis Cacta são mais polimórficos em *C. arabica* em relação às espécies de *C. canephora* e *C. eugenioides*. Em *C. arabica*, 418 sítios polimórficos foram encontrados em todas as sequências de elementos transponíveis e foi o mais alto dentre as espécies, sendo 38 localizados na transposase e apenas 10 na segunda ORF. Na espécie *C. canephora*, foram encontrados 194 sítios polimórficos, dos quais 18 se encontram na transposase e apenas 5 estão localizados na segunda ORF. Já para *C. eugenioides*, foram encontrados 153 sítios polimórficos no elemento transponível. No entanto, apenas 6 sítios polimórficos foram localizados na segunda ORF e 8 sítios polimórficos foram encontrados nas transposases.

Em relação DAPC realizada para os ETs Cacta, foram identificados 173 sítios polimórficos nas sequências de elementos transponíveis, sendo que a proporção de sequências conservadas foi de 0,87 % (Figura 5). Esta análise evidenciou que os SNPs que mais contribuíram para a diversidade dos ETs estão localizados nas posições 5255, 3028 e 4316 das sequências alinhadas. Esses resultados sugerem que mesmo em espécies filogeneticamente relacionadas, os elementos transponíveis Cacta são mais polimórficos em *C. arabica* em relação às espécies de *C. canephora* e *C. eugenioides*.

4.3.3. Identificação dos elementos transponíveis mais divergentes

A distância de Kimura calculadas para os elementos transponíveis Gypsy e Copia nos genomas das espécies de *Coffea* estão plotados nas (Figuras 6). Para o elemento Gypsy, os elementos transponíveis mais divergentes foram: i) *C. canephora* -Gypsy_1439:Gypsy_1375 (3,30); ii) *C. arabica* - Gypsy_695:Gypsy_420 (2,76) (2,75); e iii) *C. eugenioides* Gypsy_1906:Gypsy_1913 (3,04) (Figura 6). O ápice das frequências da distância de Kimura obtidas para *C. arabica* foi abaixo de 1, enquanto *C. eugenioides* e *C. canephora* obtiveram o ápice com valores maiores que 1. Estes resultados sugerem a existência de uma progressão de eventos mutacionais relacionados a transição de nucleotídeos em relação à transversão em *C. arabica*.

A frequência das distâncias de Kimura para os elementos Cacta estão ilustradas na figura 7. Os pares de elementos transponíveis divergentes identificados foram: i) *C. arabica* - Cacta_24:Cacta_23 (1,50); ii) *C. eugenioides*- Cacta_10:Cacta_18 (0,13); iii) *C. canephora* - Cacta_6:Cacta_31 (1,49). Os picos da frequência de transposons Cacta foram distintos nas três espécies, o que sugere a ocorrência de uma dinâmica evolutiva distinta entre às três espécies (Figura 7). Em *C. eugenioides*, taxas de mutação ficaram concentradas abaixo de 0,05 para o elemento Cacta, enquanto os picos de das frequências com maiores amplitudes ocorreram a partir de 1,0 de taxa de substituição.

4.4. Discussão

Apesar dos avanços em estudos para verificar os impactos de elementos transponíveis no cafeeiro, as variações dos componentes estruturais dos

retrotransposons Gypsy e do transposons de DNA Cacta não foram investigadas até o momento. Este trabalho evidencia diferenças estruturais significativas que podem auxiliar na compreensão de papel dos ETs na evolução do cafeeiro. Estes componentes estruturais não são apenas critérios de classificação taxonômica dos ETs, mas também podem refletir informações importantes sobre a evolução das espécies. Foram construídos banco de dados com os ETs e seus componentes estruturais identificados para *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*.

Os descritores de variabilidade genética evidenciaram que a integrase é componente do retroelemento Gypsy é mais polimórfico para as espécies de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*. A integrase é componente estrutural fundamental para a transposição de retroelementos autônomos e foi mais conservada em *C. arabica* e *C. eugenioides*. Isso sugere que os componentes estruturais do retroelemento Gypsy evoluíram com taxas distintas para essas espécies. Geralmente, o componente estrutural integrase está envolvido na mobilidade dos retrotransposons ao longo dos genomas de plantas e está associado com um complexo enzimático responsável pela transposição (Wicker *et al.* 2007). Em contraste com os resultados deste trabalho, a maior variabilidade genética apresentada para integrase dos retrotransposons nas espécies de café é diferente dos resultados que Neumann *et al.* 2019 encontraram após realizaram uma estruturação sistemática dos retrotransposons em plantas. Estes autores observaram que o componente estrutural gag é mais polimórfico em comparação com RT, IN e RH.

Em relação variabilidade genética para o elemento Cacta, os descritores evidenciaram que as transposases são mais polimórficas em *C. arabica*. Os elementos Cacta realizam a transposição ao longo do genoma usando um mecanismo de 'cortar e colar' mediado por uma transposase DDE. É razoável supor que os ETs Cacta estejam relacionados na adaptação de *C. arabica* aos novos nichos ecológicos após o processo de hibridização e duplicação de genoma que originou a espécie. Em outras espécies de plantas, a variabilidade genética das transposases forneceram informações importantes sobre variações em parâmetros agrônômicos e diferenciação de espécies vegetais. Em *Arabidopsis*, elementos transponíveis Cacta possuem alta atividade relacionada a transposição. Catoni *et al.* 2019 demonstraram em *in vivo* que os ETs Cacta estão promovendo rearranjo de genes relacionado a adaptação e variações fenotípicas relacionadas ao

desenvolvimento de Arabidopsis. Na família botânica Triticeae, regiões enriquecidas com ETs Cacta contribuíram para organização e evolução diferencial dos genomas das espécies *Triticum monococcum* e *Triticum durum* (Wicker *et al.* 2003).

As análises discriminantes e DAPC permitiram estruturar a variabilidade genética das populações elementos transponíveis em grupos pré-definidos de acordo com a espécie. Esta análise demonstrou que as populações de elementos transponíveis Gypsy e Cacta são estruturadas por espécies do cafeeiro. As três espécies de café compartilham ETs conservados e divergentes entre si. Este fato sugere a hipótese que *C. canephora* e *C. eugenioides* forneceram ETs progenitores ativos para *C. arabica*. A espécie *C. arabica* é alotetraplóide autógama (anfidiplóide; $2n = 4x = 44$) que possivelmente surgiu através da hibridação natural entre *C. canephora* (ou uma espécie relacionada a canephoroide) e *C. eugenioides* ocorrido nos planaltos da Etiópia Central, seguida de uma duplicação do genoma, provavelmente durante um único evento de aloploidização (Lashermes *et al.* 1999; Bawin *et al.* 2021). Neste contexto, os ETs mais conservados em *C. arabica* pode ter origem em linhagem ancestrais de *C. canephora* e *C. eugenioides* que deram origem a espécie. A análise das distâncias de Kimura corroboram com essa hipótese. A distância de Kimura possibilitou estabelecer uma relação empírica entre transição/transversão nas populações dos elementos transponíveis Gypsy e Cacta estudados (Strimmer *et al.* 2012).

Os resultados deste trabalho fornecem uma análise comparativa sobre os retrotransposons e transposons de DNA encontrados nas espécies *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*. Os retrotransposons e Transposons de DNA foram estruturados em função da espécie de café. Em relação aos retrotransposons Gypsy da classe I, a integrase é componente estrutural é mais polimórfico entre as espécies de café estudadas. O componente estrutural gag foi o mais conservado. Em relação ao elemento transponível da classe II, Cacta são mais polimórficos em *C. arabica* em relação às espécies de *C. canephora* e *C. eugenioides*. As taxas de transição e transversão de nucleotídeos foram maiores nas populações de retrotransposons Gypsy em relação as populações dos elementos transponíveis Cacta encontradas no genomas estudados.

4.5 Figuras e gráficos

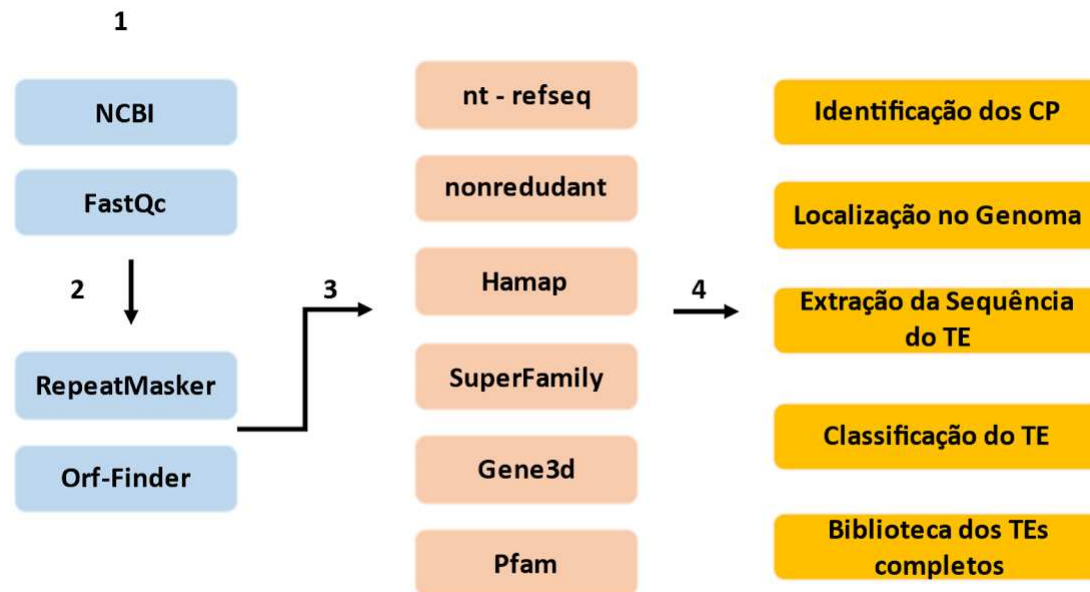


Figura 1. Etapas do script com programas e banco de dados usados para mapear os ETs nos genomas das três espécies de café. (1) Download dos genomas *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*; (2) roteiro das análises utilizadas para identificação dos ETs nos genomas, identificação do ETs com o RepeatMasker e identificação das ORFs dos ETs; (3) banco de dados utilizados para identificação das ORFs; (4) estratégia para obtenção das sequências dos ETs completos.

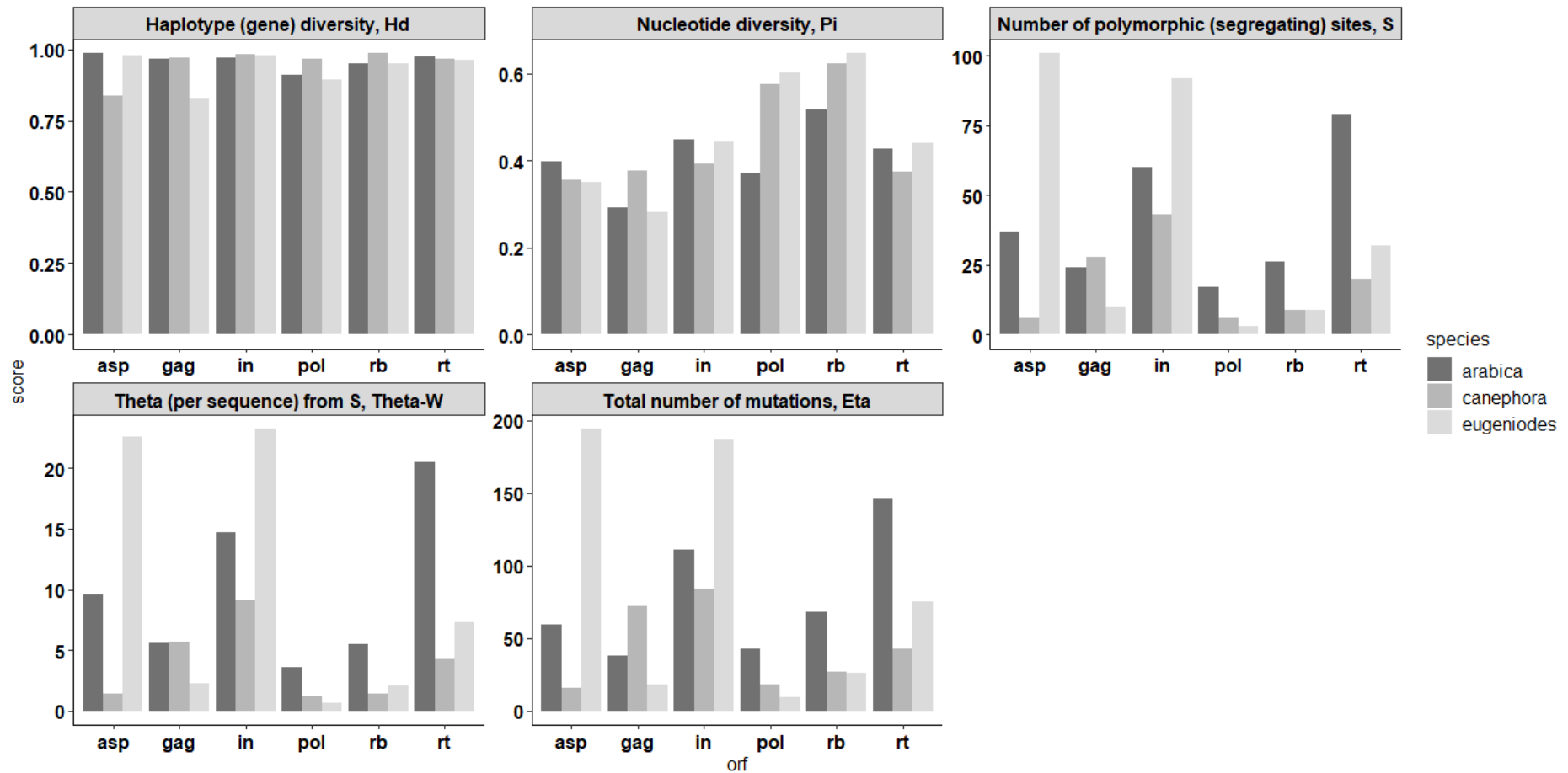


Figura 02- Descritores da variabilidade genética entre seqüências de nucleotídeos dos ETs Gypsy encontrados nas espécies de *Coffea*. Onde, proteína GAG (gag), aspartil protease (asp), polimerase (pol), ribonuclease (rb), transcriptase reversa (rt) e integrase (in).

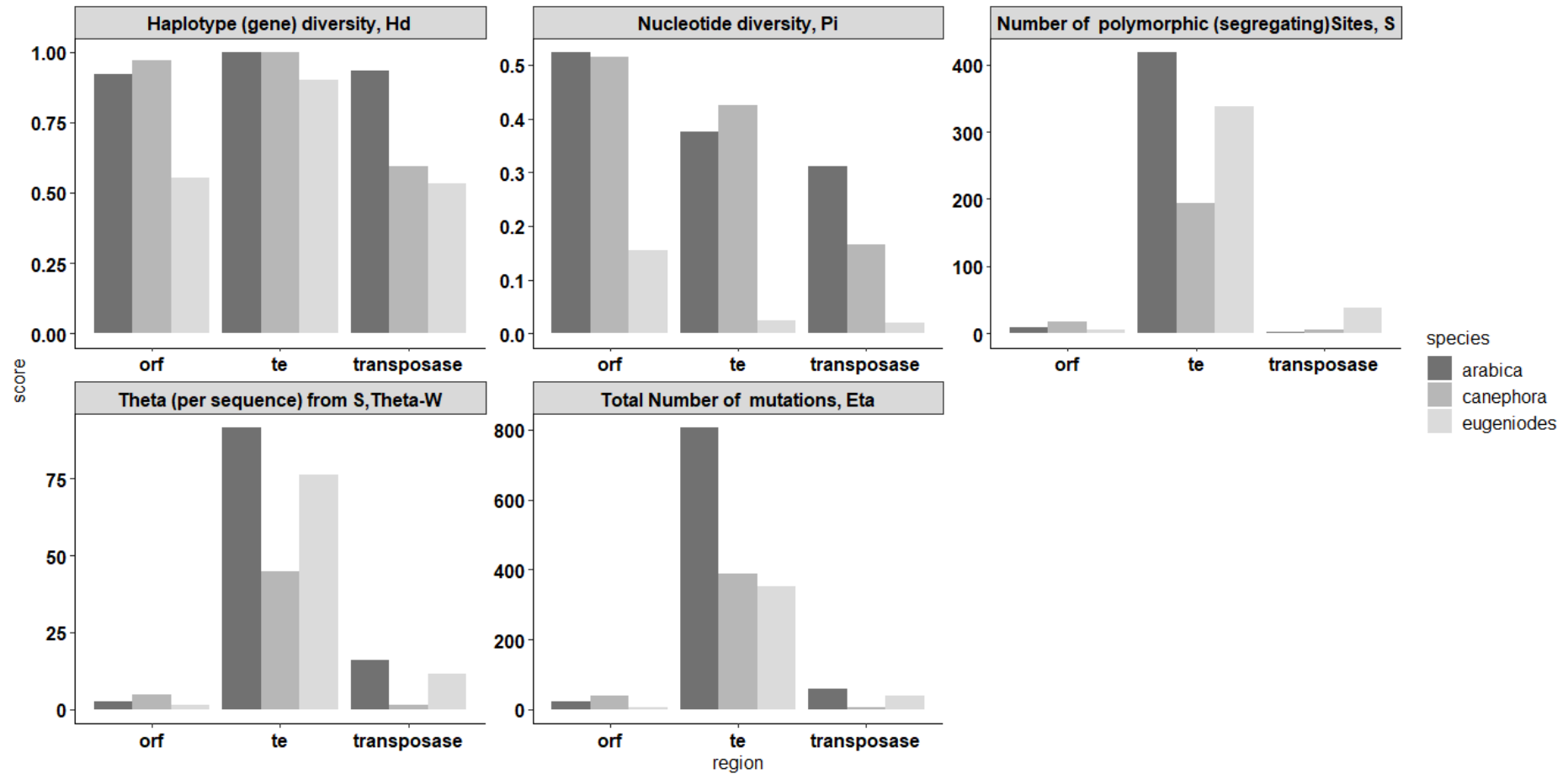


Figura 03- Descritores da variabilidade genética entre seqüências de nucleotídeos dos ETs Cacta encontrados nas espécies de *Coffea*. Onde, elemento transponível (te), região aberta para leitura (orf), transposase (tsase).

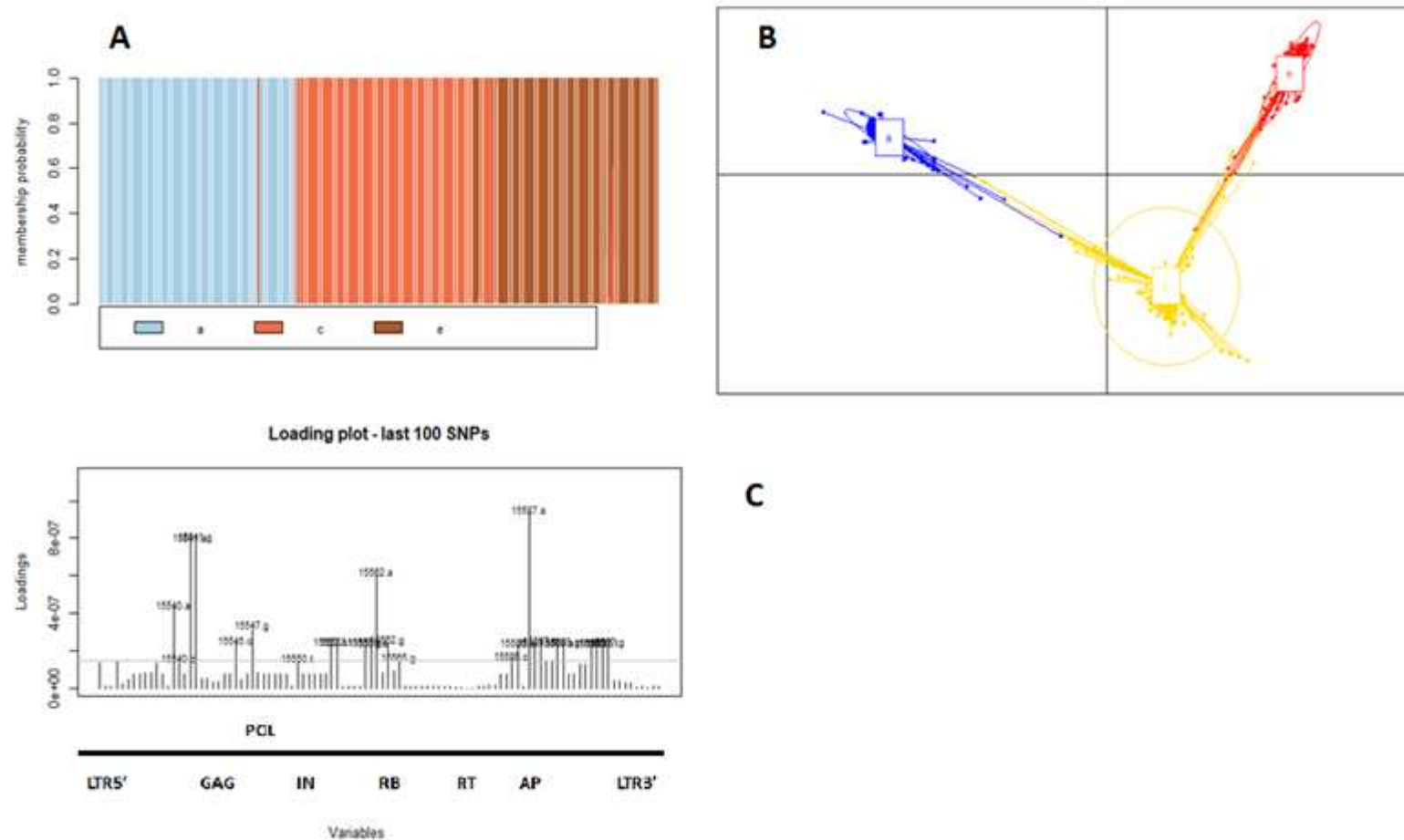


Figura 04- DAPC realizada para os transponíveis Gypsy da classe I. Foram utilizados 119 Gypsy de *C. arabica*, 129 Gypsy de *C. canephora* e 99 Gypsy de *C. eugeniodes*. (A) Representação da função compoplot, mostrando o coeficiente de pertinência de cada espécie a cada espécie (ou seja, *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugeniodes*), seguindo as cores do gráfico de dispersão. (B) Gráfico de dispersão dos dois componentes principais agrupados por espécie (cores e elipses). (C) Plotagem de carregamento gerada pelos 2.827 SNPs, mostrando os SNPs que mais contribuem para a separação dos elementos transponíveis entre as três espécies.

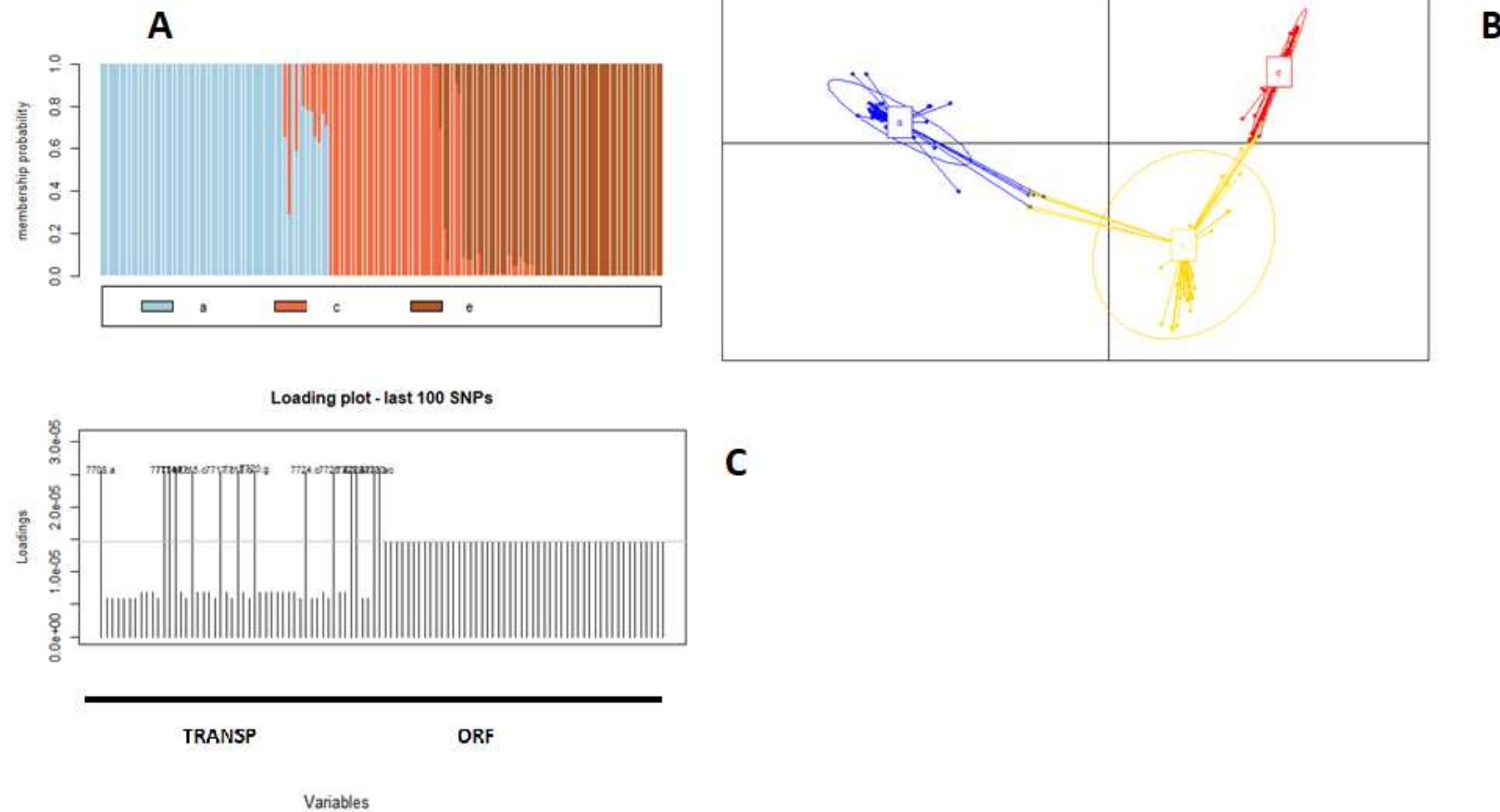


Figura 05- DAPC realizada para os ETs Cacta da classe II. Foram utilizados 55 Cacta de *C. arabica*, 45 Cacta de *C. canephora* e 48 Cacta de *C. eugeniodes*. (A) Representação da função compoplot, mostrando o coeficiente de pertinência de cada espécie a cada espécie (ou seja, *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugeniodes*), seguindo as cores do gráfico de dispersão. (B) Gráfico de dispersão dos dois componentes principais agrupados por espécie (cores e elipses). (C) Plotagem de carregamento gerada pelos 2.827 SNPs, mostrando os SNPs que mais contribuem para a separação dos elementos transponíveis entre as três espécies.

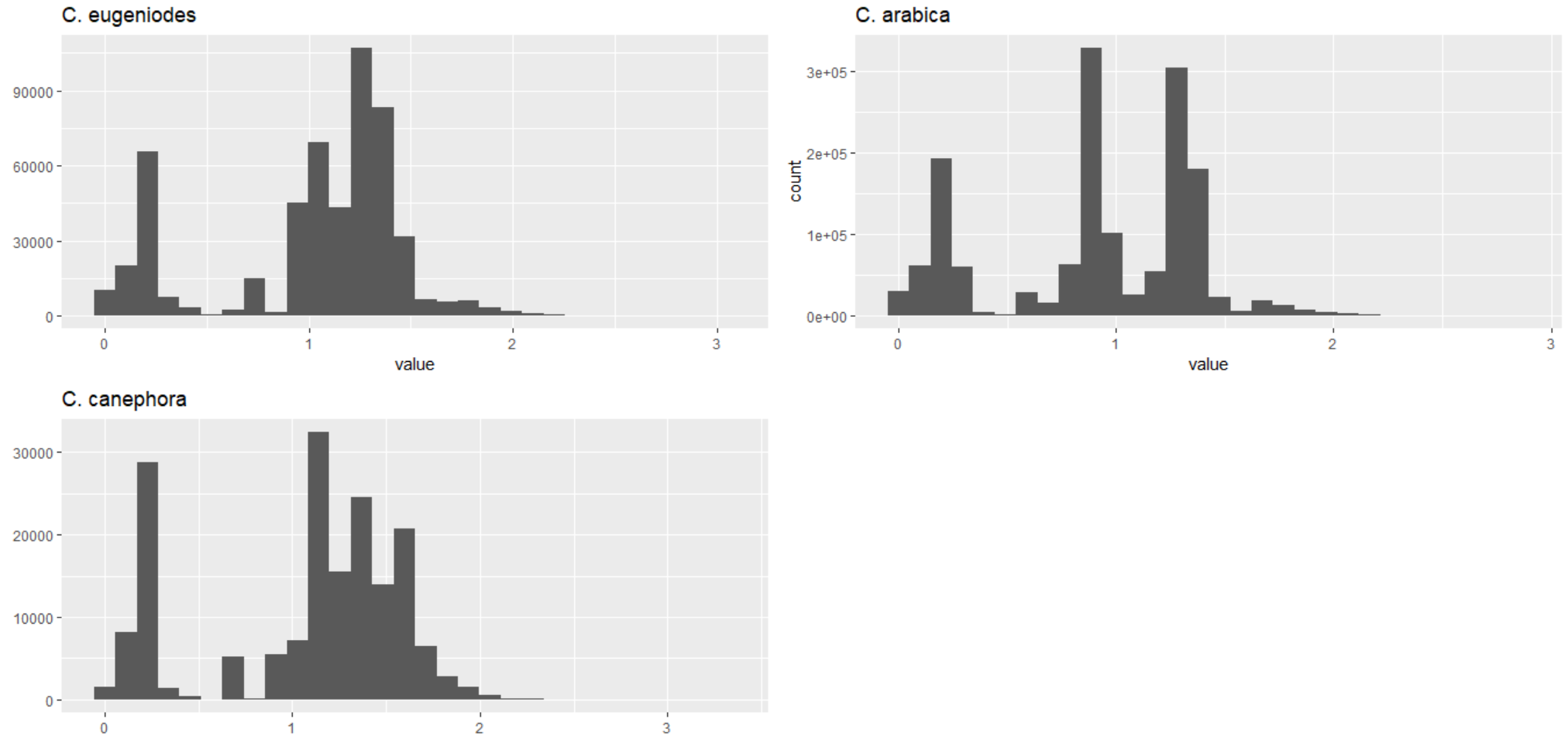


Figura 06- Análise de divergência cópias do retrotransposons Gypsy encontrados nos genomas de *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugeniodes*. Os gráficos representam a frequência das cópias dos elementos Gypsy distribuídos nos genomas de cada espécie. O agrupamento foi realizado de acordo com suas distâncias de Kimura (valor K de 0 a 3).

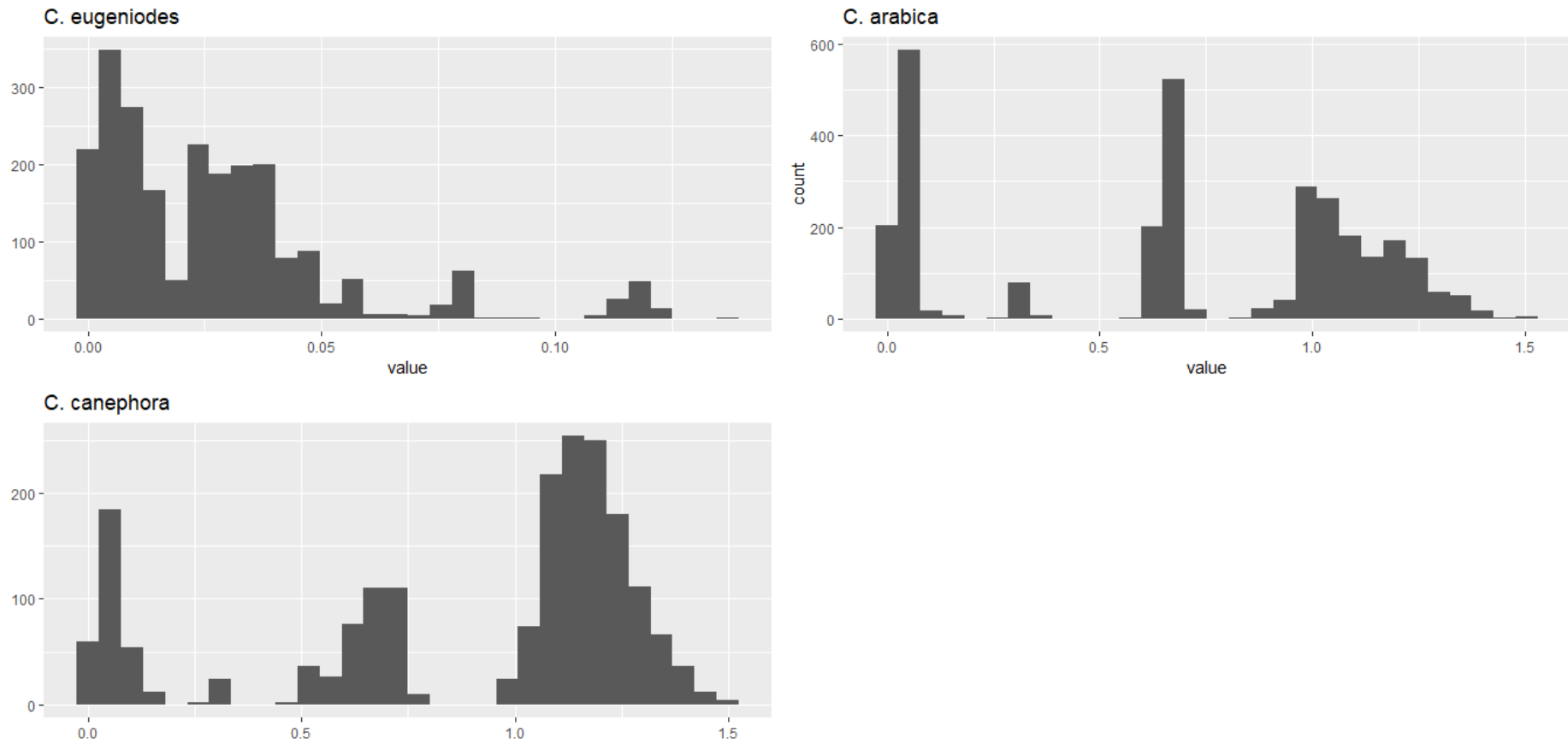


Figura 07- Análise de divergência das cópias elementos transponíveis Cacta encontrados no genoma de *C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugeniodes*. Os gráficos representam a frequência das cópias dos elementos Gypsy distribuídos nos genomas de cada espécie. O agrupamento foi realizado de acordo com suas distâncias de Kimura (valor K de 0 a 1,5).

4.6. Referências

- ALKIMIM, E. R. CAIXETA, E. T. SOUSA, T. V. PEREIRA, A. A. DE OLIVEIRA, A. C. B. ZAMBOLIM, L. & SAKIYAMA, N. S. Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. **Molecular Breeding**, v. 37, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0609-1>
- ALMOJIL, D. BOURGEOIS, Y. FALIS, M. HARIYANI, I. WILCOX, J. & BOISSINOT, S. The structural, functional and evolutionary impact of transposable elements in Eukaryotes. **Genes**, v. 12, n. 6, 2021. <https://doi.org/10.3390/genes12060918>
- BAWIN, Y. RUTTINK, T. STAELENS, A. HAEGEMAN, A. STOFFELEN, P. MWANGA MWANGA, J. C. I. ROLDÁN-RUIZ, I. HONNAY, O. & JANSSENS, S. B. Phylogenomic analysis clarifies the evolutionary origin of *Coffea arabica*. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 59, n. 5, p. 953–963, 2021. <https://doi.org/10.1111/jse.12694>
- BENNETZEN J. L. & WANG H. The contributions of transposable elements to the structure function and evolution of plant genomes. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 65 pp. 505–530). Annual Reviews 2014 <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035811>
- CATONI M. JONESMAN T. CERRUTI E. & PASZKOWSKI J. Mobilization of Pack-CACTA transposons in *Arabidopsis* suggests the mechanism of gene shuffling. **Nucleic Acids Research** 47(3) 1311–1320. 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1196>
- CENCI, A.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. Genome evolution in diploid and tetraploid *Coffea* species as revealed by comparative analysis of orthologous genome segments. **Plant Molecular Biology**, v. 78, n. 1–2, p. 135–145, jan. 2012. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9852-3>
- EDGAR, R. C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 1–19, 2004. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- FAZUOLI, C. TOMA BRAGHINI, M. BERNADETE SILVAROLLA, M. GONÇALVES, W. CÉSAR MISTRO, J. BOLLER GALLO, P. GUERREIRO FILHO, O. IAC Catuaí SH3-a dwarf Arabica coffee cultivar with leaf rust resistance and drought tolerance CULTIVAR RELEASE. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, p. 356–359, 2019. <https://doi.org/10.1590/1984>

- FESCHOTTE C. JIANG N. & WESSLER S. R. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics* 3(5) 329–341. 2002. <https://doi.org/10.1038/nrg793>
- FLYNN, J. M. HUBLEY, R. GOUBERT, C. ROSEN, J. CLARK, A. G. FESCHOTTE, C. & SMIT, A. F. RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable element families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 17, p. 9451–9457, 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921046117>
- ICO World Coffee Production. International Coffee Organization. <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>. Acessado em outubro de 2022.
- JOMBART, T. Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, n. 11, p. 1403–1405, 2008. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- KENT, T. V.; UZUNOVIĆ, J.; WRIGHT, S. I. Coevolution between transposable elements and recombination. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* Royal Society Publishing, , 19 dez. 2017. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0458>
- 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** 261(2) 259–266. 1999. <https://doi.org/10.1007/s004380050965>
- LEE S.-I. & KIM N.-S. Transposable Elements and Genome Size Variations in **Plants. Genomics & Informatics** v 12-87 2014. <https://doi.org/10.5808/gi.2014.12.3.87>
- LISCH, D. How important are transposons for plant evolution? **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 1, p. 49–61, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrg3374>
- LLORÉNS C. FUTAMI R. BEZEMER D. & MOYA A. The Gypsy Database (GyDB) of mobile genetic elements. **Nucleic Acids Research** 36(SUPPL. 1). 2008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm697>
- NEUMANN P. NOVÁK P. HOŠTÁKOVÁ N. & MACAS J. Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. In **Mobile DNA** (Vol. 10 Issue 1). BioMed Central Ltd. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13100-018-0144-1>

- PING-FANG, T. Progress in Plant CACTA Elements. **Acta Genetica Sinica** v. 33, n. 9, p. 765–774, 2006. DOI: 10.1016/S0379-4172(06)60109-1
- QUESNEVILLE, H. Twenty years of transposable element analysis in the *Arabidopsis thaliana* genome. **Mobile DNA**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13100-020-00223-x>
- QUEVILLON, E. SILVENTOINEN, V. PILLAI, S. HARTE, N. MULDER, N. APWEILER, R. & LOPEZ, R. InterProScan: Protein domains identifier. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 116–120, 2005. <https://doi.org/10.1093/nar/gki442>
- ROMBEL, I. T. SYKES, K. F. RAYNER, S. & JOHNSTON, S. A. ORF-FINDER: A vector for high-throughput gene identification. **Gene**, v. 282, n. 1–2, p. 33–41, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00819-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00819-8)
- ROZAS, J. SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C. MESSEGUER, X. & ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496–2497, 2003. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
- SOUZA, C. A. ROCHA, R. B. ALVES, E. A. TEIXEIRA, A. L. DALAZEN, J. R. & DA FONSECA, A. F. A. Characterization of beverage quality in *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. **Coffee Science**, v. 13, n. 2, p. 210–218, 2018. <https://doi.org/10.25186/cs.v13i2.1419>
- STRIMMER, K.; VON HAESELER, A.; SALEMI, M. Genetic distances and nucleotide substitution models. **The Phylogenetic Handbook**, p. 111–141, 2012. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511819049.006>
- WELLS, J. N.; FESCHOTTE, C. A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements. **Annual Review of Genetics**, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-040620-022145>
- WICKER T. GUYOT R. YAHIAOUI N. & KELLER B. CACTA transposons in triticeae. A diverse family of high-copy repetitive elements. **Plant Physiology** 132(1) 52–63. 2003 <https://doi.org/10.1104/pp.102.015743>
- WICKER T. SABOT F. HUA-VAN A. BENNETZEN J. L. CAPY P. CHALHOUB B. FLAVELL A. LEROY P. MORGANTE M. PANAUD O. PAUX E. SANMIGUEL P. & SCHULMAN A. H. (*A unified classification system for eukaryotic transposable elements*). **Nature** 2007. www.nature.com/reviews/genetics
- ZAMBOLIM L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology** v. 41 n. 1 p. 1–8 2016. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>

5. CAPÍTULO III

Resistência de genótipos de *Coffea arabica* às raças II e XXXIII
de *Hemileia vastatrix*

Resistência de genótipos de *Coffea arabica* às raças II e XXXIII de *Hemileia vastatrix*

5.1. Introdução

A ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome foi relatada pela primeira vez no território brasileiro em 1970 no sul da Bahia e rapidamente disseminou-se para todas as regiões produtoras de café do país (Chaves *et al.* 1970). A doença é encontrada em praticamente todas as regiões que produzem Café arábica (*Coffea arabica*) e Café conilon (*Coffea canephora*), sendo considerada a principal doença da cultura no Brasil e no mundo (Zambolim 2016; Talhinhos *et al.* 2017). As perdas causadas podem alcançar níveis de 50 % na ausência de medidas de controle integradas e as condições climáticas são favoráveis para a doença.

Dentre as estratégias de manejo integrado para a ferrugem do cafeeiro, o controle genético baseado na combinação de resistência vertical e horizontal é considerada a mais importante para reduzir os impactos da ferrugem na produção. A resistência durável à ferrugem do cafeeiro é uma busca constante nos programas de melhoramento. O pilar da resistência durável é o desenvolvimento de cultivares que contemplem boas características de produção e resistência aos biótipos agressivos e/ou raças virulentas prevalentes nos campos de produção de café (Vale *et al.* 2001). Tanto a resistência horizontal quanto a vertical podem ser encontradas em cultivares de café (Sousa *et al.* 2019). No entanto, alguns genótipos podem ser severamente afetados pela ferrugem, embora a maioria apresente níveis intermediários de resistência a *H. vastatrix*. No Brasil, as raças II e XXXIII são as mais importantes (Capucho *et al.* 2012; Cabral *et al.* 2016).

A emergência de novas raças de *H. vastatrix* é um desafio para utilização de cultivares resistentes (Avelino *et al.* 2015; Zambolim 2016; Sousa *et al.* 2019). A raça II de *H. vastatrix* é a de maior prevalência nas áreas de cultivo. A raça XXXIII de *H. vastatrix* foi detectada infectando as principais cultivares de café conilon (Cabral *et al.* 2009). Esta raça também infecta o café arábica e possui genes de virulência complexos. Quando uma variedade com resistência vertical é lançada para plantio, o tempo útil da resistência varia entre 4 e 6 anos (Zambolim, 2016).

Considerando as perdas causadas pela ferrugem do cafeeiro e que as informações sobre os padrões de resistência do Café arábica poderão ser posteriormente úteis aos cafeicultores para seleção de genótipos resistentes com alto potencial agrônômico, além de possibilitar estudos genéticos e moleculares sobre o caráter da herança para interação raça-genótipo, este estudo teve o objetivo de caracterizar a resistência de genótipos de café arábica às raças II e XXXIII de *Hemileia vastatrix*.

5.2. Material e métodos

As raças fisiológicas II (V₅) e XXXIII (V_{5,7,9}) de *H. vastatrix* armazenadas na micoteca do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro – Bioagro/UFV foram utilizados no experimento. Os uredosporos estavam armazenados a -80 °C e foram reativados em uma estufa por 10 minutos à 40 °C. Em seguida, os uredosporos foram inoculados na face abaxial das folhas com auxílio de pincel em mudas da cultivar Caturra CIFC 19/1 para multiplicação. Após o surgimento das pústulas, os esporos coletados foram armazenados a 4°C durante duas semanas. Foram desconsideradas amostras de uredosporos com germinação inferior a 50% em meio ágar-ágar 2,0 %.

5.2.1 Produção de inóculo

Uma população composta por 13 genótipos de *C. arabica* do banco de germoplasma da UFV e 17 genótipos coletados no sudoeste do estado da Bahia foram utilizadas nesse trabalho (Tabela 1). O plantio das sementes foi realizado em caixas com areia úmida. As caixas foram mantidas no escuro por 28°C. Após trinta dias, as plantas na fase de 'orelha de onça' foram selecionadas e transplantadas para vasos plásticos de 2 dm³, sendo o volume da mistura constituído por 50% de substrato Tropstrato enriquecido com micronutrientes e calcário, 30% de latossolo amarelo e 20 % de esterco bovino. Os vasos com as mudas receberam a cada 15 dias 100 mL de uma solução nutritiva contendo em mg/L os seguintes componentes: 192 de KCl, 104,42 de K₂SO₄, 150,35 de MgSO₄.7H₂O, 61 de ureia, 0,27 de NH₄Mo₇O₂₄.4H₂O, 1,61 de H₃BO₃, 6,67 de 12 ZnSO₄, 1,74 de CuSO₄.5H₂O, 4,10 de MnCl₂.4H₂O, 4,08 de FeSO₄.7H₂O e 5,58 de EDTA bissódico.

5.2.2 Avaliação dos componentes de resistência

Vinte folhas das mudas de café totalmente expandidas foram selecionadas de cada genótipo para produção dos discos foliares. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por um gerbox plástico (20,0 × 20,0 × 3,0 cm) contendo 12 discos foliares (2,0 cm de Ø), espalhados no topo de uma tela de aço inoxidável para evitar o contato dos discos foliares com a espuma úmida no fundo do gerbox. Os discos foram colocados na parte superior da tela, com a superfície abaxial voltada para cima. Em seguida, foram inoculados com 5 miligramas de uredosporos de *H. vastatrix* de cada raça, com auxílio de pincel. Após a inoculação, atomizou-se água destilada na face abaxial dos discos, deixando a superfície inoculada levemente umedecida. Os gerboxes contendo os discos inoculados foram mantidas no escuro por 48 h a 22 ± 2 °C. Posteriormente, foram transferidos para uma câmara de incubação, onde permaneceram até o final das avaliações sob condições controladas de temperatura e luz (22 ± 2 °C e 12 h de fotoperíodo). Para evitar o ressecamento dos discos, a espuma no interior das gerboxes foi umedecida duas vezes por semana.

A partir do 7º dia após a inoculação foram feitas avaliações diárias para verificação das pústulas. A quantificação dos esporos foi realizada com auxílio de um microscópio ótico no 45º dia após a inoculação. Os ensaios foram repetidos três vezes ao longo do tempo em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram utilizados para estimar os componentes de resistência de cada genótipo. Os componentes de resistência obtidos foram: período de incubação (PI), período latente (PL), Número de lesões esporuladas (NLE), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), Produção de esporos (PE), número de lesões entre o dia 0 e 15 após a inoculação ($n_{les_0_15}$), número de lesões entre o dia 16 e 30 após a inoculação ($n_{les_16_30}$), número de lesões entre o dia 31 e 45 após a inoculação ($n_{les_31_45}$), ponto de inflexão da curva logística (PICL) e inclinação relativa em torno ao ponto de inflexão (IRPI). Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett verificar a homogeneidade das variâncias.

O teste t de Student foi realizado para os componentes de resistência das cultivares nos experimentos com as raças II e XXXIII para as plantas que manifestaram sintomas. Os dados obtidos após a classificação dos componentes de

resistência foram utilizados para elaboração de matrizes de dissimilaridade pelos métodos da distância Euclidiana Padronizada, Máximo, Manhattan, Canberra, Binária e Minkowski. As matrizes de dissimilaridade foram submetidas às técnicas hierárquicas aglomerativa Ligação completa, Mcquitty, Mediana ou Centróide. Os melhores métodos selecionados pelo teste de Mantel e pelo maior coeficiente de correlação cofenética. Desta forma, os genótipos foram agrupadas conforme o nível de resistência contra as raças II e XXXIII de *H. vastatrix*. Todas as análises foram realizadas no programa R.

5.3. Resultados

As análises dos componentes de resistência possibilitaram a caracterização do padrão de resistência dos genótipos submetidas à inoculação com as raças II e XXXIII de *Hemileia vastatrix*. O teste t de Student revelou diferenças significativas nas comparações pareada de cada componente de resistência obtidos para as raças (Figura 01). Os genótipos Caturra CIFC 19/1 e Bourbon Amarelo IAC foram as mais suscetíveis para ambas as raças. O genótipo IBC-Palma2 foi suscetível à raça II e imune à raça XXXIII. Por outro lado, o genótipo Japy foi suscetível à raça XXXIII e imune à raça II.

Nas Figuras 2 e 3, a variável IRPI reflete o efeito combinado dos componentes sobre a resistência dos genótipos estudadas. Essa variável reflete a taxa de infecção aparente baseada no número de lesões acumuladas temporalmente. O genótipo Acauã_C47 apresentou o menor valor em relação à variável para as raças II e XXXIII (Figura 2 e 3). Já o genótipo Caturra CIFC 19/1 apresentou maior a inclinação para ambas as raças.

Os componentes de resistência foram utilizados para calcular a distância euclidiana média padronizada (DEMP). O cálculo de DEMP como medida de dissimilaridade permitiu incluir as cultivares que não apresentaram sintomas da doença. Desta forma, o período de incubação e período latente não foram consideradas nas análises. As variáveis contínuas obtidas através da análise de regressão logística, quantificação de esporos e quantificação da doença tiveram índices iguais a zero para genótipos onde não foi detectada a manifestação da doença.

A análise de DEMP revelou que os genótipos Caturra CIFC 19/1 e IPR 99 foram as mais divergentes em relação aos componentes epidemiológicos, quando inoculadas com a raça II e XXXIII. Esta análise foi utilizada para a escolha dos genótipos IPR 99 (resistente) e Caturra CIFC 19/1 (suscetível) como padrões na análise de agrupamento. O método de ligação direta para agrupamento hierárquico da DEMP apresentou o maior valor de correlação cofenética (99,8%), sendo utilizado para classificar os genótipos quanto aos níveis de resistência. O agrupamento revelou a formação de cinco grupos com diferentes níveis de resistência com as seguintes composições: grupo I (altamente suscetível), grupo II (suscetível), grupo III (resistente), grupo IV (altamente resistente) e grupo V_a (imune). O subgrupo V_b também foi proposto para contemplar os genótipos que apresentaram um nível baixo de doença e que possivelmente tiveram resistência vertical suplantada (Figura 04).

Em relação à resistência dos genótipos de café arábica à raça II, quatro genótipos {Caturra CIFC 19/1, Sabiá tardio, Catucaí Roxinho e Catucaí Vermelho 20/15} foram classificadas como altamente suscetíveis(7%); dois {Catucaí Vermelho 24/137 e Bourbom Amarelo IAC} são suscetíveis (3,5%); seis genótipos {Acauã_C105, Acauã_C47 Acauã_C13} são resistentes (10,5%) ; dois genótipos são altamente resistentes { Catucaí Vermelho 36/6 e IBC-Palma2}; e treze genótipos {IPR 99, Arara, MGS Catiguá 3, Catiguá Amarelo, IBC-Palma2, MGS Aranãs, MGS Ametista, Paraíso_MG_H 419-1, Pau Brasil MG1, Sagarana, Catiguá MG2 e Japy} foram classificados como imunes (22%).

Para resistência à raça XXXIII, três genótipos {Caturra CIFC 19/1 e Catucaí Vermelho 36/6_C365} foram classificadas como altamente suscetível (5%); dois genótipos {Arara e Bourbom Amarelo IAC } suscetível (8,6%); cinco genótipos {Japy, Catucaí Vermelho 20/15, Catucaí Vermelho 24/137, Catucaí Roxinho, Catucaí Amarelo 19/08} resistente (13,5%); quatro genótipos {Acauã_C105, Acauã_C13, Catucaí Vermelho 36/6 e Sábica tardio}; o genótipo Acauã_C47 foi classificada no subgrupo V_b; (7%); e 13 genótipos {IPR 99, Arara, MGS Catiguá 3, Catiguá Amarelo, IBC-Palma2, MGS Aranãs, MGS Ametista, MGS Catiguá 3, Paraíso_MG_H 419-1, Pau Brasil MG1, Sagarana, Catiguá MG 2, IBC-Palma2} foram classificados como imunes (22%).

5.4 Discussão

Neste estudo, avaliou-se os padrões de resistência de genótipos de *Coffea arabica* inoculadas com às raças II (V₅) e XXXIII (V_{5,7,9}) de *H. vastatrix*. A abordagem utilizada neste trabalho permitiu uma análise pareada da interação raça-genótipo. Os desdobramentos das análises com os componentes de resistência pareadas permitiram a construção de grupos em função da resistência qualitativa e quantitativa observadas nos experimentos.

A análise dos componentes de resistência demonstrou a existência de genótipos que são mais suscetíveis à raça XXXIII em relação à raça II. Os genótipos Arara, Catucaí Vermelho 36/6, Acauã_C13, Catucaí Vermelho 19/8 foram mais suscetíveis à raça XXXIII considerando às variáveis NLE, n_les_0_15, n_les_16_30 e n_les_31_45. A análise da AACPD para o genótipo Catucaí Vermelho 36/6_C36 evidenciou que houve diferença significativa entre os genótipos. No entanto, o genótipo Catucaí Vermelho 36/6_C não apresentou diferenças significativas para as variáveis n_les_0_15, n_les_16_30 e n_les_31_45. Outros genótipos também apresentaram variações no número de pústulas encontradas para ambas as raças. Nos genótipos com resistência vertical, os componentes PI e PL não assumiram valores numéricos contínuos após a avaliação. Assim, PI e PL não foram incluídos no cálculo da DEMP e obtenção do dendrograma. As variáveis consideradas para análises multivariadas foram: NLE, PE, AACPD, n_les_0_15, n_les_16_30, n_les_31_45, PICL e IRPI. Estes resultados são complementares aqueles encontrados por Zambolim *et al.* em 2016 para genótipos de *C. canephora*. Neste trabalho, os genótipos de *C. canephora* tiveram correlação significativa e positiva para os componentes de resistência relacionados ao número de pústulas, esporulação e área lesionada. Os autores também encontraram um padrão de resistência diferentes nos genótipos de *C. canephora* quando inoculados com as raças II e XXXIII de *H. vastatrix*.

Considerando a resistência quantitativa, os genótipos dos grupos I, II, III, IV e o subgrupo V_b apresentaram pústulas e níveis intermediários das doenças para as raças estudadas. Estes grupos apresentam resistência quantitativa. A cultivar Acauã_C47 foi classificada em grupos de resistência diferentes em função da raça do fungo utilizada para inoculação. O grupo IV é composto apenas pela cultivar Acauã_C47 inoculada com a raça XXXIII. Quando a cultivar Acauã_C47 foi

inoculada com a raça II, a análise conjunta dos componentes de resistência indicou a classificação no grupo II.

O genótipo Arara foi mais resistente a raça XXXIII de *H. vastatrix* em relação a raça II. O genótipo Arara é uma variedade derivada do Sarchimor 1669-20 com o Catuaí lançada em 2012 e está sendo plantada em larga escala pelos produtores brasileiros como resistente à ferrugem.

As diferenças nos componentes de resistências relacionados aos parâmetros epidemiológicos podem ser explicadas por uma atuação conjunta de e descentralizada de vários mecanismos de mecanismos relacionado a biossíntese de hormônios, componentes bioquímicos ou estruturais (Carré-Missio *et al.* 2013; Schurt *et al.* 2016). Estas substâncias e estruturas podem restringem o desenvolvimento de fitopatógenos podem afetar o número de pústulas, esporulação, período latente e período de incubação (Carré-Missio *et al.* 2012). Dentre os hormônios produzidos por plantas relacionados a resistência, ácido salicílico, óxido nítrico, citocininas, giberelina, auxina e brassinosteróides são considerados os mais importantes (Andersen *et al.* 2018). Considerando os componentes bioquímicos, os compostos fenólicos, lactonas, glicosídeos, saponinas, terpenoides, estilbenos, fitoalexinas, quitinases, glucanases e inibidores proteicos estão entre os produtos das rotas metabólicas mais importantes (Chang *et al.* 2012; Aucique-Pérez *et al.* 2020). Já para os componentes estruturais, algumas estruturas do tecido vegetal também afetam o crescimento fúngico após o estabelecimento da relação parasitária, tais como: a estrutura das paredes celulares epidérmicas e o tamanho, localização e forma dos estômatos (Céu *et al.* 2006).

A resistência horizontal é herdada quantitativamente e não previne a infecção. O número exato de genes expressos envolvidos na interação não é conhecido, embora existam QTLs (*quantitative trait loci*) descritos potencialmente úteis para a piramidação de genes em cultivares comerciais (Romero *et al.* 2014; Almeida *et al.* 2021). A resistência quantitativa pode ocorrer em alguns genótipos de progênes de *C. arabica* advindas do Híbrido de Timor e a herdabilidade de resistência variaram de 73 a 53% no sentido amplo e restrito, respectivamente (Romero *et al.* 2010).

Tanto a resistência horizontal quanto a resistência vertical apresentadas neste trabalho requerem mais estudos para confirmar a herança monogênica ou poligênica da resistência, para aumentar as chances de obter uma resistência durável em *Coffea arabica* à ferrugem do cafeeiro. O tipo de resistência no genótipo

Japy foi vertical para raça II e horizontal para a raça XXXIII. Por outro lado, a resistência encontrada na cultivar IBC-Palma2 foi horizontal para raça XXXIII e vertical para a raça II.

O grupo V_a ilustrado no dendrograma é composto por 26 genótipos nos quais as expressões fenotípicas da interação com raças foram ausência de doença ou manifestação da reação de hipersensibilidade. Os genótipos do grupo V_a (imune) apresentaram resistência qualitativa para interação raça-genótipo. A interação raça-genótipo pode seguir a teoria gene a gene (Flor, 1971). No cafeeiro, essa interação é governada por fatores de virulência (V_{1-9}) e fatores de suscetibilidade ao cafeeiro (SH_{1-9}). Destes fatores, SH_1 , SH_2 , SH_4 e SH_5 são descritos para *Coffea arabica* (Bettencourt e Noronha-Wagner 1971). Entretanto, apenas SH_3 em *Coffea liberica* foi clonado até o momento (Prakash *et al.* 2004). Possivelmente os genótipos com resistência vertical à raça XXXIII ($V_{5,7,9}$) possuem o fator de resistência SH_6 (Zambolim e Caxeita 2021).

Em conclusão, os genótipos de *Coffea arabica* foram classificadas em relação aos níveis de resistência horizontal e pela constatação da resistência vertical para às raças II e XXXIII de *H. vastatrix*. Os componentes de resistência podem ser utilizados como referência em futuros estudos de triagem de genótipos com resistência horizontal a genótipos de *Coffea arabica* à ferrugem. A interação raça-genótipo foi determinante para os níveis de resistência para em *Coffea arabica*. A raça XXXIII de *H. vastatrix* é agressiva ao genótipo Arara. Possivelmente, o subgrupo V_b foi estabelecido para interação raça-genótipo Acauã e a raça XXXIII devido a suplantação da resistência vertical.

5.5. Figuras e tabelas

TABELA 1. RELAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CAFÉ ARÁBICA UTILIZADOS NOS ESTUDOS DE RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS II E XXXIII DE <i>Hemileia vastatrix</i>				
LOCALIDADE	DENOMINAÇÃO	CRUZAMENTO OU SELEÇÃO QUE ORIGINARAM OS GENÓTIPOS	MANTENEDOR	RNC*
Barra do Choça-BA	Acauã (Covas 13, 47 e 105)	Sarchimor 1668 com Mundo Novo IAC 388-17	Procafé	4995
Barra do Choça-BA	Arara	Seleção Sarchimor amarelo (cruzamento natural com Catuai)	Procafé	28884
Viçosa-MG	Arara	Seleção Sarchimor amarelo (cruzamento natural com Catuai)	Procafé	28884
Barra do Choça-BA	Bourbon Amarelo IAC J10	Cruzamento é desconhecido	IAC	2903
Viçosa-MG	Catiguá Amarelo	Catuaí Amarelo IAC 86 e Híbrido Timor UFV 440-9		
Viçosa-MG	Catiguá MG2	Catuaí Amarelo IAC 86 e Híbrido Timor UFV 440-10	Epamig	18633
Viçosa-MG	Catucuí Roxinho	Icatu com Catuaí		
Barra do Choça-BA	Catucuí Vermelho 19/8	Icatu com Catuaí	Procafé	4909
Barra do Choça-BA	Catucuí Vermelho 20/15	Icatu com Catuaí	Procafé	4910
Barra do Choça-BA	Catucuí Vermelho 24/137	Icatu com Catuaí	Procafé	4911
Barra do Choça-BA	Catucuí Vermelho 36/6 (Cova 365)	Icatu com Catuaí	Procafé	4912
Viçosa-MG	Caturra CIFC 19/1			
Viçosa-MG	IBC-Palma - 2	Catimor UFV 353 com Catuaí Vermelho IAC 81	Procafé	4998
Barra do Choça-BA	IBC-Palma - 2	Catimor UFV 353 com Catuaí Vermelho IAC 81	Procafé	4998
Viçosa-MG	IPR 99	Villa Sarchi CIFC 971/10 e Híbrido de Timor CIFC 832/2	Iapar-Emater	9949
Barra do Choça-BA	Japy	Linhagem de Catucaí vermelho 19/8 cv. 380	Procafé	28891
Viçosa-MG	MGS Ametista	Catuaí Amarelo IAC 86 e Híbrido de Timor UFV 446-08	Epamig	36830
Viçosa-MG	MGS Aranãs	Icatu Vermelho IAC 3851-2 e Catimor UFV 1602-215	Epamig	33348
Viçosa-MG	MGS Catiguá 3	Catuaí Amarelo IAC 86 e Híbrido Timor UFV 440-10	Epamig	22098
Viçosa-MG	Paraíso MG H 419-1	Catuaí Amarelo IAC 30 e Híbrido Timor UFV 445-46	Epamig	15981
Viçosa-MG	Pau Brasil MG1	Catuaí Vermelho IAC 30 e Híbrido Timor UFV 442-34	Epamig	18634
Barra do Choça-BA	Sabiá tardio	Catimor 386 e Acaíá	Procafé	4992
Viçosa-MG	Sagarana			

* RNC – Registro Nacional de Cultivares

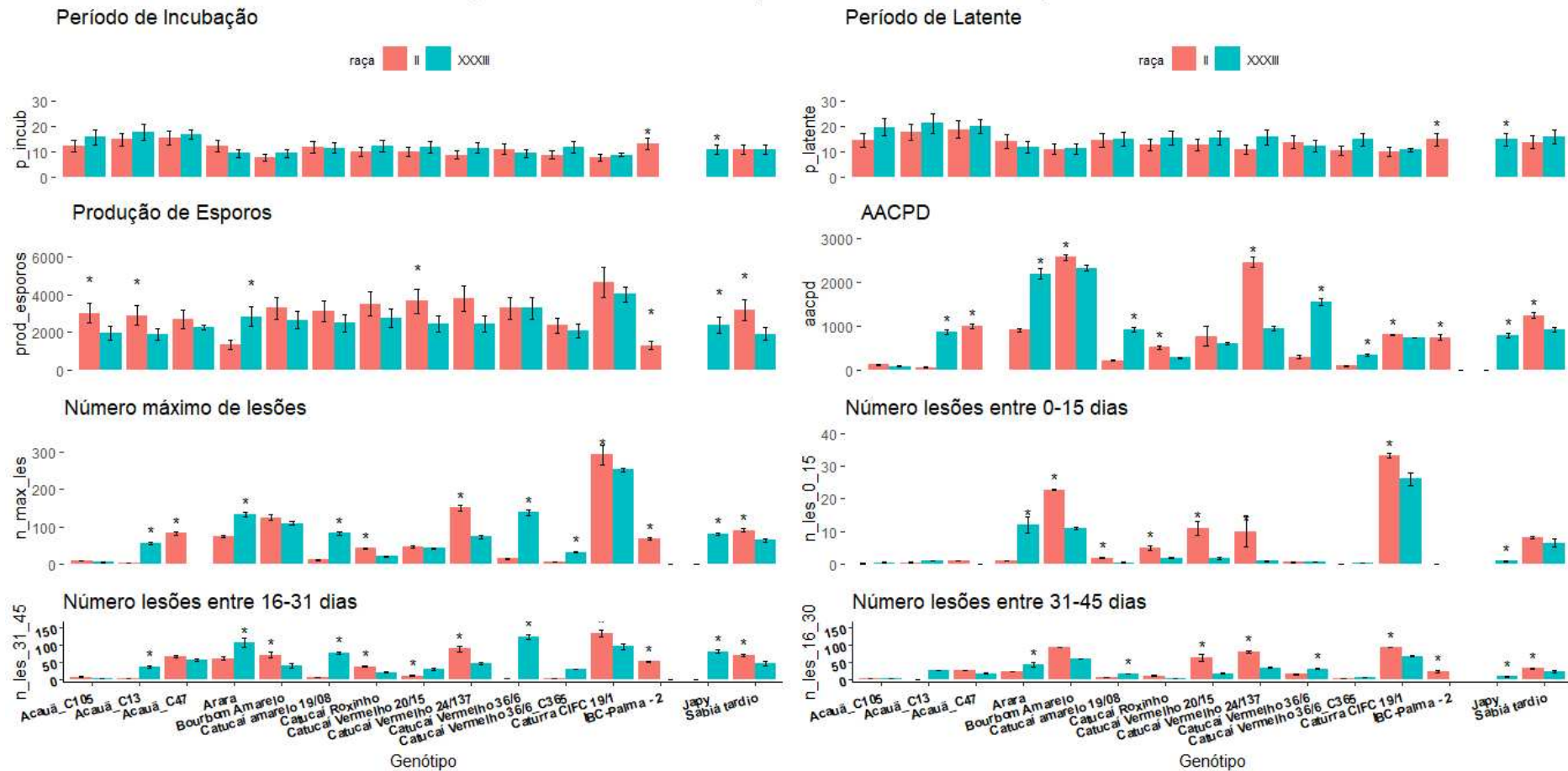
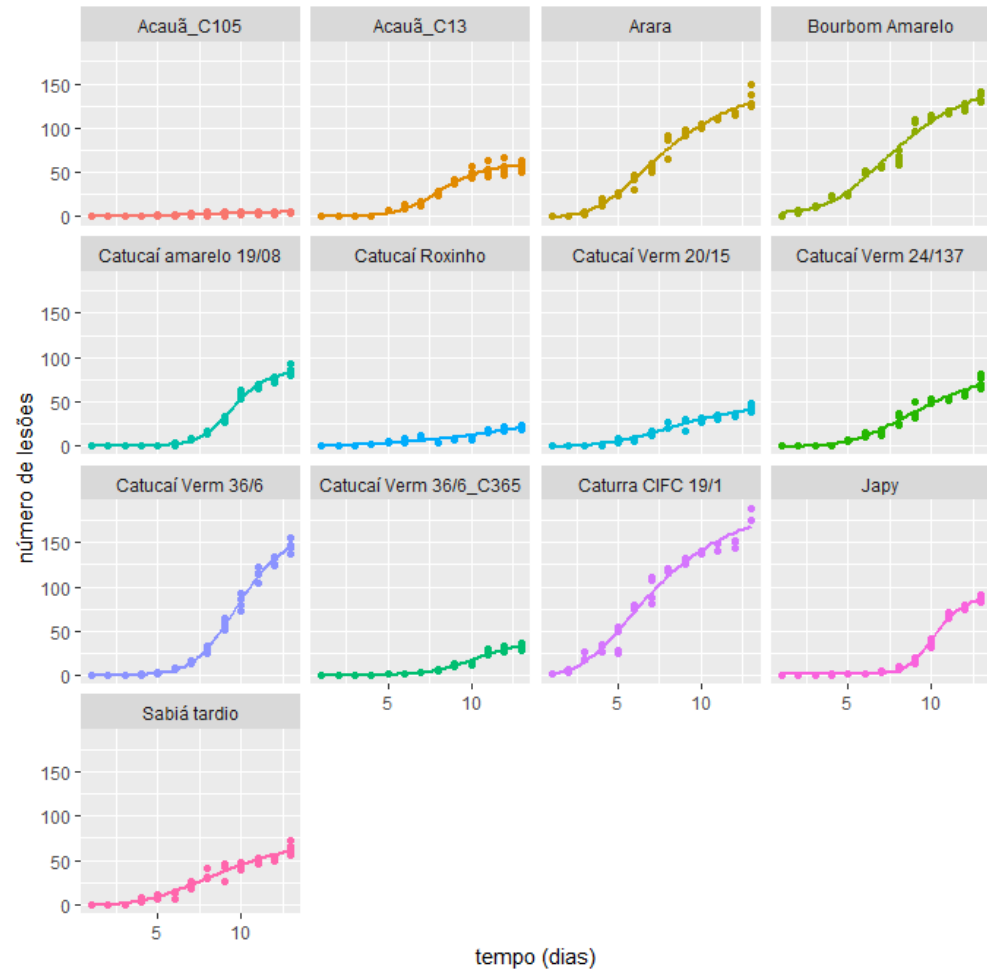


Figura 01- Componentes de resistência das cultivares de *C. arabica* obtidas para as raças II e XXXIII. Onde (*) indica que houve diferença significativa pelo teste de t ($p \leq 0,05$) entre as raças analisadas.



Regressão logística $f(x)=c+\{d-(c)\}/1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))$

• Acauã_C105	$-0,01 + \{ 6,24 - (-0,01) \} / 1 + \exp(-3,56 (\log(x) - \log(8,42)))$
• Acauã_C13	$0,9 + \{ 62,21 - (0,9) \} / 1 + \exp(-5,92 (\log(x) - \log(8,3)))$
• Arara	$-0,75 + \{ 156,16 - (-0,75) \} / 1 + \exp(-3,22 (\log(x) - \log(8,05)))$
• Bourbom Amarelo	$4,64 + \{ 166,39 - (4,64) \} / 1 + \exp(-3,28 (\log(x) - \log(8,43)))$
• Catucaí amarelo 19/08	$0,44 + \{ 88,29 - (0,44) \} / 1 + \exp(-8,88 (\log(x) - \log(9,54)))$
• Catucaí Roxinho	$0,25 + \{ 673,08 - (0,25) \} / 1 + \exp(-2,09 (\log(x) - \log(68,01)))$
• Catucaí Verm 20/15	$-0,55 + \{ 53,51 - (-0,55) \} / 1 + \exp(-3,37 (\log(x) - \log(9,24)))$
• Catucaí Verm 24/137	$-0,65 + \{ 89,56 - (-0,65) \} / 1 + \exp(-3,99 (\log(x) - \log(9,59)))$
• Catucaí Verm 36/6	$0,46 + \{ 169,7 - (0,46) \} / 1 + \exp(-6,75 (\log(x) - \log(10,01)))$
• Catucaí Verm 36/6_C365	$0,44 + \{ 41,64 - (0,44) \} / 1 + \exp(-6,78 (\log(x) - \log(10,6)))$
• Caturra CIFC 19/1	$1,08 + \{ 202,71 - (1,08) \} / 1 + \exp(-2,82 (\log(x) - \log(7,45)))$
• Japy	$1,26 + \{ 90,56 - (1,26) \} / 1 + \exp(-11,87 (\log(x) - \log(10,23)))$
• Sabiá tardio	$-0,64 + \{ 82,81 - (-0,64) \} / 1 + \exp(-3,21 (\log(x) - \log(9,46)))$

Figura 02- Curva de progresso com os valores médios das lesões causados pela raça XXXIII de *Hemileia vastatrix* em cultivares de café. A taxa de inclinação relativa (b); ponto de inflexão da curva logística (b). Não foi observado pústulas para as cultivares IPR 99, MGS Catiguá 3, Catiguá Amarelo, IBC-Palma2, MGS Aranãs, MGS Ametista, MGS Catiguá 3, PARAÍSO_MG_H 419-1, Pau Brasil MG1, Sagarana, Catiguá MG 2, e Acauã_C47.

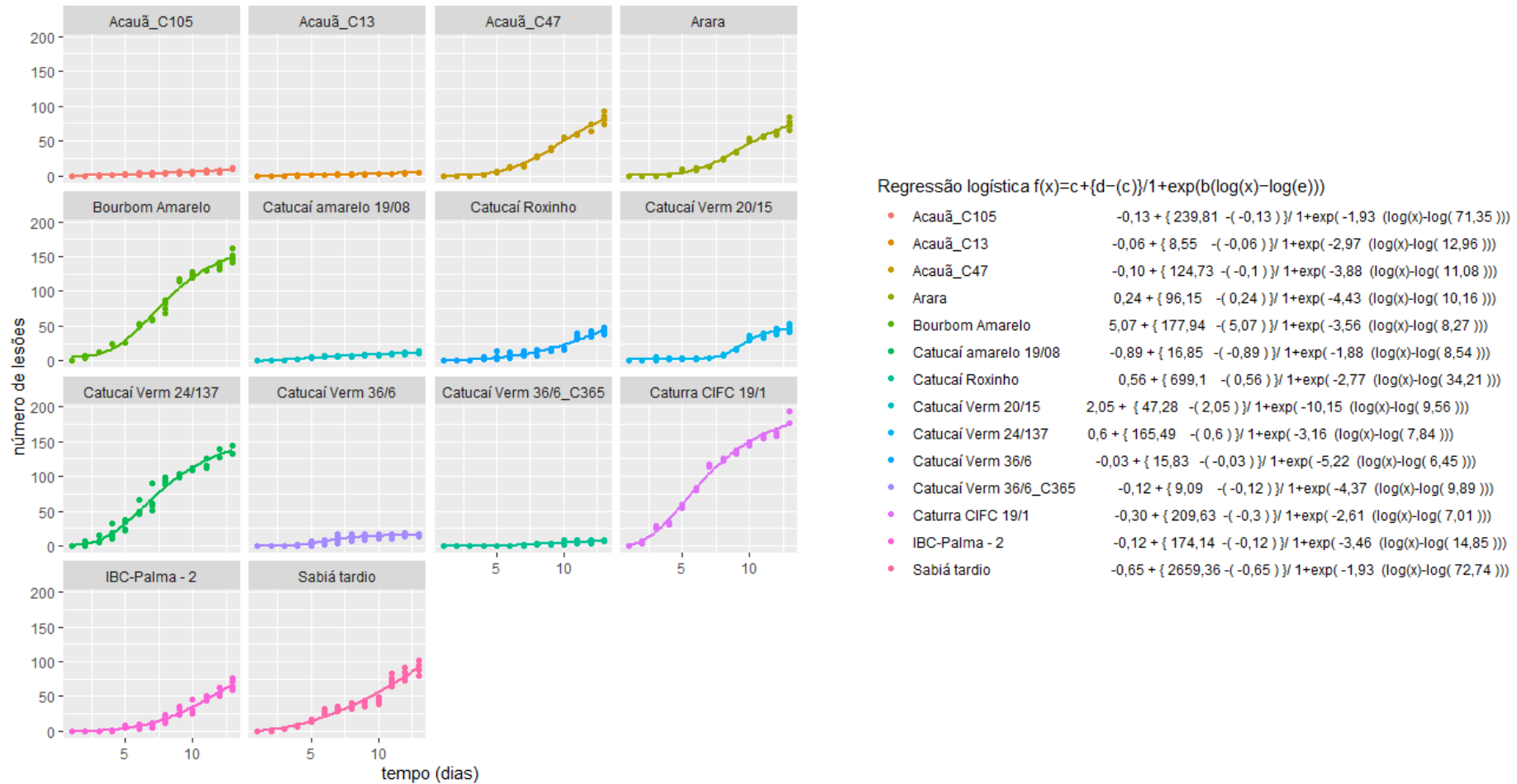


Figura 3 Curva de progresso com os valores médios das lesões causados pela raça II de *Hemileia vastatrix* em cultivares de café. A taxa de inclinação relativa (b); ponto de inflexão da curva logística (b). Não foi observado pústulas para as cultivares IPR 99, MGS Catiguá 3, Catiguá Amarelo, IBC-Palma2, MGS Aranãs, MGS Ametista, MGS Catiguá 3, PARAÍSO_MG_H 419-1, Pau Brasil MG1, Sagarana, Catiguá MG 2

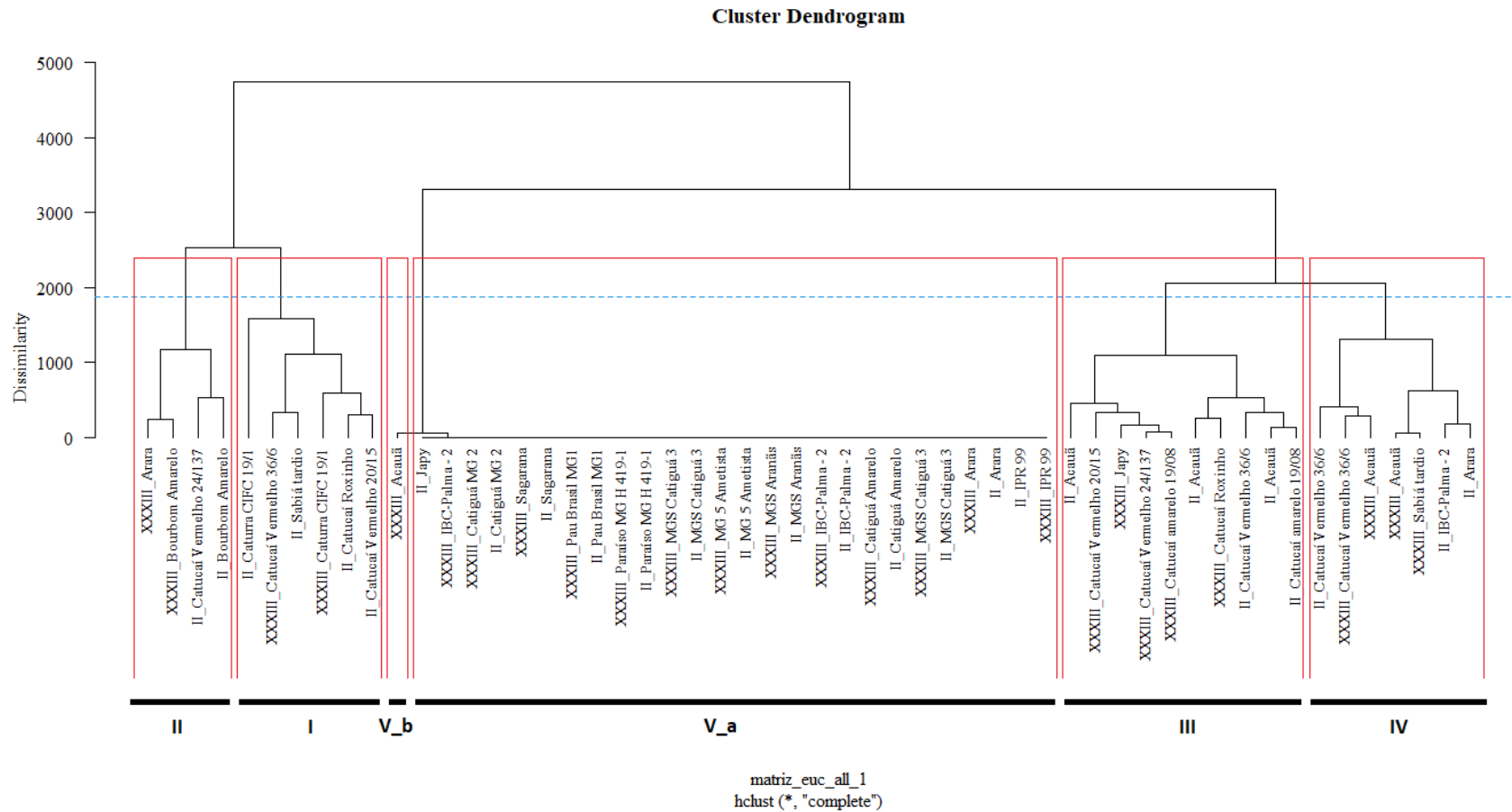


Figura 04- Dendrograma proveniente da análise de agrupamento para classificação dos genótipos considerando a estimativas dos seguintes componentes de resistência: número de lesões esporuladas, AACPD Número de lesões entre 0-15 dias após a inoculação, número de lesões entre 16-30 dias após a inoculação, número de lesões entre 31-45 dias após a inoculação, produção de esporos, b (taxa de inclinação relativa), e (ponto de inflexão da curva logística).

5.6. Referências

- ALMEIDA, D. P. CAIXETA, E. T. MOREIRA, K. F. DE OLIVEIRA, A. C. B. DE FREITAS, K. N. P. PEREIRA, A. A. ROSADO, R. D. S. ZAMBOLIM, L. CRUZ, C. D. Marker-assisted pyramiding of multiple disease resistance genes in coffee genotypes (*Coffea arabica*). **Agronomy**, v. 11, n. 9, 1 set. 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091763>
- ANDERSEN, E. J. ALI, S. BYAMUKAMA, E. YEN, Y. & NEPAL, M. P.. Disease resistance mechanisms in plants. **Genes**, v. 9, n. 7, 2018. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- AUCIQUE-PÉREZ, C. E., RESENDE, R. S., MARTINS, A. O., SILVEIRA, P. R., CAVALCANTI, J. H. F., VIEIRA, N. M., FERNIE, A. R., ARAÚJO, W. L., DAMATTA, F. M., & RODRIGUES, F. Á. How do wheat plants cope with *Pyricularia oryzae* infection? A physiological and metabolic approach. **Planta**, 252(2). 2020. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03428-9>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- BETTENCOURT, A.J. NORONHA-WAGNER, H. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. et Br - **Agronomia Lusitana** (Portugal) v. 31 p. 285-292, 1969
- CABRAL P. G. C. ZAMBOLIM E. M. ZAMBOLIM L. LELIS T. P. CAPUCHO A. S. & CAIXETA E. T. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes** 4(1) 129–130. 2009. <https://doi.org/10.1071/DN09052>
- 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.12411>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13314-012-0081-7>

- CARRÉ-MISSIO, V., RODRIGUES, F. Á., SCHURT, D. A., CARVALHO REZENDE, D., RIBAS MOREIRA, W., KORNDÖRFER, G. H., & ZAMBOLIM, L. Componentes epidemiológicos da ferrugem do cafeeiro afetados pela aplicação foliar de silicato de potássio. **Tropical Plant Pathology** (Vol. 37, Issue 1).
- CARRÉ-MISSIO, V., RODRIGUES, F. A., SCHURT, D. A., RESENDE, R. S., SOUZA, N. F. A., REZENDE, D. C., MOREIRA, W. R., & ZAMBOLIM, L. Effect of foliar-applied potassium silicate on coffee leaf infection by *Hemileia vastatrix*. **Annals of Applied Biology**, 164(3), 396–403 2014. <https://doi.org/10.1111/aab.12109>
- CÉU, M., SILVA, 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. **Braz. J. Plant Physiol** (Vol. 18, Issue 1) 2006
- CHANG, X., & NICK, P. Defence signalling triggered by Flg22 and Harpin is integrated into a different stilbene output in *Vitis* cells. **PLoS ONE**, 7(7) 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040446>
- CHAVES, G.M. CRUZ FILHO, J. CARVALHO, M.G. MATSUOKA, K. COELHO, D.T. & SHIMOYA, C. A ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). Revisão de literatura com observações e comentários sobre a enfermidade no Brasil. **Seiva**, 1970.
- FLOR H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **A. R. of Phytopathology V** 9:275-296 1971. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- 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**, 109(6), 1311–1317 2004. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1748-z>
- ROMERO G. G. G. ALVARADO A. G. CORTINA G. H. LIGARRETO M. G. GALEANO, N. F. & HERRERA P. J. C.. Partial resistance to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee (*Coffea arabica* L.): Genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. **Molecular Breeding**, v. 25, n. 4, p. 685–697, abr. 2010. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9368-6>
- ROMERO, G. VÁSQUEZ, L. M. LASHERMES, P. HERRERA, J. C. 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**, v. 133, n. 1, p. 121–129, fev. 2014.

- SCHURT, D. A., ARAUJO, L., CARRÉ-MISSIO, V., SOARES, N. F. F., & RODRIGUES, F. Á. Changes in the chemical composition of lignin in the leaves of coffee plants supplied with silicon and infected with *Hemileia vastatrix*. **Científica**, 44(3), 318. 2016. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n3p318-325>
- SOUSA, T. V. CAIXETA, E. T. ALKIMIM, E. R. OLIVEIRA, A. C. B. PEREIRA, A. A. SAKIYAMA, N. S. ZAMBOLIM, L. & RESENDE, M. D. V. Early selection enabled by the implementation of genomic selection in coffee arabica breeding. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. January, p. 1–12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01934>
- TALHINHAS, P. BATISTA, D. DINIZ, I. VIEIRA, A. SILVA, D. N. LOUREIRO, A. TAVARES, S. PEREIRA, A. P. AZINHEIRA, H. G. GUERRA-GUIMARÃES, L. VÁRZEA, V. & SILVA, M. DO CÉU. 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.
- VALE, F. X. R. DO; PARLEVLIET, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 577–589, 2001. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582001000300001>
- ZAMBOLIM L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology** v. 41 n. 1 p. 1–8 2016. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>
- ZAMBOLIM, L. de Souza Neto, P. N. Zambolim, E. M. Caixeta, E. T. Sakiyama, N. S. Ferrão, R. G. Components of resistance of conilon coffee that reduce the rate of leaf rust development. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 4, p. 389–400, 1 ago. 2016. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0425-4>
- ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E. T. An overview of physiological specialization of coffee leaf rust – new designation of pathotypes. **Int. Journal of Current Research**, 2021. <https://doi.org/10.24941/ijcr.40600.01.2021>