

Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem

Samuel Mazzinghy Alvarenga⁽¹⁾, Eveline Teixeira Caixeta⁽²⁾, Bárbara Hufnagel⁽¹⁾, Flávia Thiebaut⁽¹⁾, Eunize Maciel-Zambolim⁽³⁾, Laércio Zambolim⁽³⁾ e Ney Sussumu Sakiyama⁽⁴⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Viçosa (UFV), Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Avenida P.H. Rolfs, s/nº, CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: samalvarenga@gmail.com, barbarahufnagel@gmail.com, flaviabqi@yahoo.com.br ⁽²⁾Embrapa Café, Parque Estação Biológica, s/nº, Avenida W3 Norte, Edifício Sede, CEP 70770-901 Brasília, DF. E-mail: eveline.caixeta@embrapa.br ⁽³⁾UFV, Departamento de Fitopatologia. E-mail: eunize@ufv.br, zambolim@ufv.br ⁽⁴⁾UFV, Departamento de Fitotecnia. E-mail: sakiyama@ufv.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores moleculares relacionados à resistência do cafeeiro (*Coffea arabica*) à ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Foram identificadas sequências de DNA potencialmente envolvidas na resistência do cafeeiro a doenças, por meio de análise “in silico”, a partir das informações geradas pelo Projeto Brasileiro do Genoma Café. A partir das sequências mineradas, foram desenhados 59 pares de iniciadores para amplificá-las. Os 59 iniciadores foram testados em 12 cafeeiros resistentes e 12 susceptíveis a *H. vastatrix*. Vinte e sete iniciadores resultaram em bandas únicas e bem definidas, enquanto um deles amplificou fragmento de DNA em todos os cafeeiros resistentes, mas não nos suscetíveis. Esse marcador molecular polimórfico amplificou uma região do DNA que corresponde a uma janela aberta de leitura parcial do genoma de *C. arabica* que codifica uma proteína de resistência a doenças. O marcador CARF 005 é capaz de diferenciar os cafeeiros analisados em resistentes e susceptíveis a *H. vastatrix*.

Termos para indexação: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, bioinformática, EST-PCR, genes de resistência, mineração de dados.

Molecular markers from coffee genome expressed sequences potentially involved in resistance to rust

Abstract – The objective of this work was to identify molecular markers related to the resistance of coffee (*Coffea arabica*) to rust (*Hemileia vastatrix*). DNA sequences potentially involved in coffee disease resistance were identified, using “in silico” analysis, from data obtained by the Brazilian coffee genome project. After data mining, 59 primer pairs were designed to amplify the sequences identified. The 59 primers were tested on 12 resistant and 12 susceptible coffee plants to *H. vastatrix*. Twenty-seven primers resulted in unique and well-defined bands, while one of these amplified a DNA fragment in all resistant plants, but not in the susceptible ones. This polymorphic molecular marker amplified a region of DNA that corresponds to a partial open reading frame of *C. arabica* genome that encodes a disease resistance protein. The marker CARF 005 can be used to differentiate between resistant and susceptible coffee plants to *H. vastatrix*.

Index terms: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, bioinformatics, EST-PCR, resistance genes, data mining.

Introdução

A principal doença do cafeeiro, a ferrugem alaranjada, é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br e ocorre em todas as regiões produtoras de café do mundo (Van der Vossen, 2005). Para minimizar os prejuízos causados, é necessário desenvolver estratégias de controle da ferrugem, o que inclui o melhoramento genético para obtenção de variedades resistentes. Neste contexto, o estudo e a caracterização de fatores genéticos de resistência ao fungo são importantes para ampliar os conhecimentos da interação planta-patógeno. Quanto maior o conhecimento dos

fatores que determinam a resistência, mais eficaz será o controle da doença (Silva et al., 2006).

O sequenciamento do genoma de plantas tem facilitado e acelerado a identificação de genes de interesse agrônomico, o que possibilita sua manipulação subsequente por meio de técnicas de genética molecular. O grande volume de informações de sequências de DNA disponibilizado tem permitido, também, o desenvolvimento de novos e eficientes marcadores moleculares. Entre eles, estão os marcadores funcionais EST-PCR (“expressed sequence tag-polymerase chain reaction”), gerados por meio de desenhos de iniciadores baseados em sequências

de ESTs. Esses marcadores são convenientes para a triagem de materiais vegetais desejáveis em programas de melhoramento e particularmente úteis para o mapeamento de QTLs (“quantitative trait loci”) (Hagras et al., 2005; Ayala-Navarrete et al., 2007, 2009; Shen Ohm, 2007; Lu et al., 2006). Por serem originados de regiões codificadoras, que são mais conservadas entre populações e espécies do que as não codificadoras, os marcadores EST-PCR podem ser utilizados entre espécies relacionadas e para o estudo de mapeamento comparativo (Rowland et al., 2003b; Sargent et al., 2007). Essa transportabilidade é especialmente útil para espécies que ainda não apresentam sequências de DNA disponíveis para análise. Além disso, os EST-PCR podem ser herdados codominantemente, o que permite a identificação dos dois alelos em locos heterozigotos de organismos diploides (Rowland et al., 2003a).

O sequenciamento do genoma funcional de *Coffea arabica* L., *C. canephora* Pierre ex A. Froehner e *C. racemosa* Lour. foi realizado por meio do Projeto Brasileiro do Genoma Café (Vieira et al., 2006). As 214.964 ESTs resultantes do sequenciamento foram armazenadas na base de dados de ESTs do Projeto (CafEST), e os clones sequenciados foram provenientes de 37 bibliotecas de cDNA. Assim, essas ESTs representam milhares de genes expressos em diferentes órgãos do cafeeiro, obtidos em vários estágios de desenvolvimento da planta e submetidos a condições de estresse biótico e abiótico.

Para identificar genes relacionados ao mecanismo de defesa do cafeeiro a doenças, Alvarenga et al. (2010) realizaram mineração de dados no CafEST. Análises “in silico” revelaram que os produtos de 11.300 ESTs identificadas apresentaram alto nível de similaridade com as proteínas envolvidas no processo de defesa de plantas a doenças.

O objetivo deste trabalho foi identificar, entre sequências previamente identificadas por Alvarenga et al. (2010), as envolvidas na resistência do cafeeiro à ferrugem, bem como, a partir delas, obter marcadores EST-PCR.

Material e Métodos

O conjunto de sequências utilizadas para o desenvolvimento de marcadores foi constituído pelas sequências previamente obtidas por Alvarenga et al. (2010) e por nova mineração de dados, realizada no presente trabalho.

A mineração das sequências foi realizada pela análise das ESTs do CafEST, por meio de ferramentas de bioinformática disponíveis na plataforma de bioinformática do CafEST (Laboratório de Genômica e Expressão, 2011). Foram utilizadas duas estratégias de mineração: “electronic northern” e sequências publicadas.

Com a ferramenta “electronic northern” (Carazzolle et al., 2007), foram agrupadas as 214.964 ESTs provenientes das 37 bibliotecas de cDNA do CafEST (Vieira et al., 2006). A percentagem normalizada de ESTs das bibliotecas que constituem cada um dos “contigs” foi descrita. Em seguida, foram minerados os agrupamentos constituídos por pelo menos uma EST da biblioteca RM1. Esta biblioteca foi construída a partir de folhas de *C. arabica* S288/23 (CIFC 33/1) inoculadas com *H. vastatrix* raça II e infectadas com bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*). O sequenciamento da biblioteca foi realizado com o pool de material genético extraído a um, dois e quatro dias após a inoculação. Portanto, essa biblioteca é uma fonte potencial de sequências envolvidas no processo de resistência da planta contra doenças.

Sequências publicadas, já disponíveis em bancos de dados públicos, que codificam genes de cafeeiros relacionados à resistência a patógenos (Chen et al., 2003; Fernandez et al., 2004; Lin et al., 2005; Ganesh et al., 2006), também foram usadas na mineração. Foi utilizada a ferramenta “search Blast local” do CafEST, para realizar uma busca por similaridade entre as sequências publicadas e as do CafEST.

Para verificar a sua anotação, as ESTs mineradas foram, posteriormente, comparadas ao banco de dados NR (“non-redundant protein sequences”) do National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio do programa BlastX (Altschul et al., 1990).

As sequências mineradas no presente trabalho, bem como as obtidas por Alvarenga et al. (2010), foram submetidas à análise para identificar aquelas que apresentam maior possibilidade de estarem envolvidas no processo de resistência do cafeeiro a patógenos. A análise foi baseada na anotação de cada sequência, tendo-se observado o organismo homólogo, a função potencial da sequência, o “e-value” menor ou igual a 10^{-20} , o score igual ou maior que 100 e, para os “contigs”, a presença de ESTs provenientes da biblioteca RM1.

A partir das sequências selecionadas, foram desenhados pares de iniciadores com o programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). As condições utilizadas foram: produto de PCR com tamanho

de 200 a 600 pb; tamanho do iniciador de 18 a 24 pb; “melting temperature” (TM) de 55 a 60°C; e percentagem de CG de 45 a 55. Para os demais parâmetros, foram utilizados os valores pré-definidos pelo programa. A estabilidade dos iniciadores foi verificada com uso do programa PrimerSelect 6.1 (DNASar, Madison, WI, EUA). A especificidade dos iniciadores foi determinada pela comparação da sequência de cada iniciador com o banco de dados NR/NT de nucleotídeos do NCBI, por meio do programa Blastn (Altschul et al., 1990).

Para a avaliação dos marcadores moleculares, foram utilizados 24 genótipos de cafeeiro do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa e da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Desses, foram selecionados 12 genótipos utilizados como fontes de resistência a *H. vastatrix*, nos programas de melhoramento, e 12 genótipos suscetíveis a esse fungo (Tabela 1).

Tabela 1. Genótipos utilizados para o teste dos iniciadores obtidos a partir das ESTs potencialmente envolvidas com a resistência do cafeeiro à ferrugem.

| Código | Genótipo | Descrição |
|-----------------------------------|--------------------------------|---|
| Indivíduos suscetíveis à ferrugem | | |
| 1 | UFV 570 | Bourbon Amarelo da China |
| 2 | UFV 2945 | Típica da China |
| 3 | UFV 557-06 | Triploide (<i>C. arabica</i> x <i>C. racemosa</i>) |
| 4 | UFV 2145-79 | Catuai Vermelho IAC 81 |
| 5 | UFV 2154-345 | Catuai Amarelo IAC 86 |
| 6 | UFV 2143-193 | Catuai Amarelo IAC 30 |
| 7 | UFV 2143-235 | Catuai Amarelo IAC 30 |
| 8 | UFV 2148-57 | Catuai Amarelo IAC 64 |
| 9 | UFV 2164-193 | Mundo Novo IAC 515-3 |
| 10 | UFV 2190-100 | Mundo Novo IAC 464-18 |
| 11 | Caturra 812 | Caturra Amarelo |
| 12 | <i>Coffea dewevrei excelsa</i> | <i>Coffea dewevrei excelsa</i> CIFC 168/12 ou UFV 595 |
| Indivíduos resistentes à ferrugem | | |
| 13 | UFV 440-22 | Híbrido de Timor |
| 14 | UFV 443-3 | Híbrido de Timor |
| 15 | UFV 445-46 | Híbrido de Timor |
| 16 | CIFC 832/1 | Híbrido de Timor |
| 17 | CIFC 832/2 | Híbrido de Timor |
| 18 | HT 438-52 | Híbrido de Timor |
| 19 | HT 446-08 | Híbrido de Timor |
| 20 | CIFC 33-1 | S288-23 |
| 21 | CIFC 1343/269 | CIFC 1343-269 |
| 22 | CIFC 4106 | Híbrido de Timor |
| 23 | CIFC H 420-10 | Mundo Novo x HW 26/14 ⁽¹⁾ |
| 24 | CIFC H 147-1 | S 353 4/5 x S 4 Agaro ⁽²⁾ |

⁽¹⁾Mundo Novo (CIFC 1535/33) x HW 26/14 (Caturra Vermelho CIFC 19/1 x HT CIFC 832/1). ⁽²⁾S 353 4/5 (CIFC 34/13) x S 4 Agaro (CIFC 110/5)

Folhas jovens de cada um desses cafeeiros foram coletadas, armazenadas em ultrafreezer a -80°C e liofilizadas. O DNA foi extraído conforme Diniz et al. (2005). Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado a 4°C. Para a amplificação, o DNA foi diluído em TE (Tris HCl 10 mmol L⁻¹, EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,0) para atingir a concentração final de 10 ng µL⁻¹.

A reação de PCR foi realizada em 20 µL de solução contendo 30 ng de DNA, 0,8 unidade de *Taq* DNA polimerase, tampão 1x, 1 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 60 µmol L⁻¹ de cada dNTP e 0,7 µmol L⁻¹ de cada iniciador. Para a amplificação, utilizou-se o procedimento “touchdown PCR”, que consistiu em: etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguida de cinco ciclos com etapa de desnaturação a 94°C por 30 s, etapa de anelamento por 20 s e extensão a 72°C por 40 s. A temperatura de anelamento foi de 65 a 60°C, tendo-se reduzido 1°C a cada ciclo. Após os cinco ciclos, procederam-se mais 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento de 60°C por 20 s e extensão de 72°C por 40 s. Após os ciclos, foi realizada extensão final de 72°C por 7 min.

Os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 1,2%, os quais foram corados com brometo de etídio, visualizados em transiluminador sob luz UV e fotodocumentados. Os iniciadores que apresentaram perfil de bandas monomórficas em agarose foram posteriormente submetidos à eletroforese em géis desnaturantes de poliácridamida a 6%, os quais foram corados com nitrato de prata a 4% e visualizados em transiluminador sob luz branca. As imagens obtidas foram digitalizadas de acordo com Brito et al. (2010).

Resultados e Discussão

Foram obtidos 2.206 grupamentos que continham pelo menos uma EST da biblioteca RM1, por meio da ferramenta “electronic northern”, disponível na plataforma de bioinformática do CafEST. Desse total, 602 correspondem a “singlets” ou a “contigs” formados exclusivamente por ESTs da biblioteca RM1, 21 formados por 99 a 75% de ESTs da biblioteca RM1 e 213 por 74 a 50%. Como essas sequências são de genes expressos no momento da infecção da planta por bicho-mineiro ou ferrugem, é provável que elas

tenham função no processo de infecção e no mecanismo de defesa da planta contra esses estresses bióticos. De fato, vários grupamentos minerados apresentaram similaridade com proteínas reconhecidas relacionadas a esse processo como, por exemplo, proteína de resistência com domínio NBS, proteína quinase, proteína de resposta de defesa, proteínas de defesa contra fungos, proteínas envolvidas com apoptose, proteínas de resposta a estímulo de ácido jasmônico e a estresse oxidativo, proteína de ligação ao DNA, entre outras.

A partir das sequências publicadas (Chen et al., 2003; Fernandez et al., 2004; Lin et al., 2005; Ganesh et al., 2006), foram identificadas 66 sequências do CafEST relacionadas à resistência do cafeeiro a doenças.

No presente trabalho, foram identificadas 2.272 sequências relacionadas à defesa do cafeeiro a doenças. A partir dessas sequências e das 11.300 obtidas por Alvarenga et al. (2010), foram selecionadas 62, com maior possibilidade de estarem envolvidas no processo de resistência do cafeeiro a patógenos. Em seguida, foram desenhados os iniciadores que amplificam essas sequências. Após a análise de estabilidade dos iniciadores desenhados, foram sintetizados 59 pares, que foram denominados de CARF 001 a CARF 059 (Tabela 2).

Diferentes concentrações dos componentes da reação de PCR e condições de amplificação foram testados, e os 59 pares de iniciadores foram analisados em cafeeiros resistentes e susceptíveis à ferrugem. Desses, 20 não amplificaram nenhum fragmento de DNA. Como os iniciadores foram desenhados a partir de sequências de ESTs, é possível que, quando testados em DNA genômico, a presença de “introns” muito longos tenha sido o motivo da não amplificação. Os 39 pares de iniciadores restantes amplificaram bandas bem definidas, e 38 iniciadores foram monomórficos tanto em gel de agarose (Figura 1) quanto em poliacrilamida.

Apenas o marcador CARF 005 resultou em fragmentos polimórficos detectáveis diretamente em gel de agarose, tendo sido capaz de diferenciar indivíduos resistentes e susceptíveis à ferrugem do cafeeiro (Figura 2). Todos os cafeeiros resistentes apresentaram o fragmento de 400 pb, enquanto nenhum susceptível apresentou a banda, com a exceção de *C. excelsa*.

O fragmento amplificado pelo iniciador CARF 005 foi sequenciado para confirmar a sua anotação

[gi|24459841|emb|CAC82597.1| “disease resistance like protein” (*Coffea arabica*)]. A sequência do fragmento amplificado pelo iniciador CARF 005 foi comparada ao banco de dados de nucleotídeos do NCBI, por meio do programa Blast (Megablast). O resultado do alinhamento é indicativo de que o fragmento corresponde a um janelado aberto de leitura (ORF, “open reading frame”) parcial de *C. arabica* (código de acesso emb|AJ298884.1) que codifica uma proteína de resistência a doenças, com 97% de identidade, score igual a 287 e “e-value” de $2,4e^{-74}$.

A sequência nucleotídica foi convertida em sequência de aminoácidos para análise em bancos de dados de proteínas. A pesquisa nos bancos InterPro, UniProtKB/TrEMBL, Pfam e Prints revelou similaridade da sequência com a proteína de resistência a doenças (códigos de acesso IPR000767, Q8GSU7, PF00931 e PR00364, respectivamente), com domínios conservados NB-ARC (IPR002182) e LRR (IPR011713).

Vários tipos de proteínas contendo o domínio NB-ARC estão envolvidos no processo de apoptose. O domínio NB-ARC é formado por três subdomínios: uma ligação a nucleotídeo (NB, “nucleotide binding”), uma extensão C-terminal que forma uma estrutura de quatro hélices (ARC1) e uma hélice enovelada (ARC2) (Tameling et al., 2006). Mutações no domínio NB-ARC podem comprometer ou até mesmo eliminar a função de resistência das proteínas, como mostrado em estudos realizados com as proteínas N (tabaco), RPS2 e RPM1 (*Arabidopsis*) (Dinesh-Kumar et al., 2000; Tao et al., 2000; Tornero et al., 2002).

De acordo com Parniske et al. (1997), o domínio LRR pode facilitar a interação da proteína R com o seu fator Avr (elicitor) relacionado e pode fornecer diferentes especificidades de reconhecimento para fatores Avr alterados. De fato, em vários sistemas planta-patógeno, a variação da sequência na região LRR tem mostrado ser responsável por diferentes especificidades de reconhecimento ou de resistência (Parniske et al., 1997; Thomas et al., 1997; Botella et al., 1998; Wang et al., 1998; Ellis et al., 1999).

Segundo os termos do Gene Ontology Consortium (Ashburner et al., 2000), a sequência amplificada pelo CARF 005 participa de processos biológicos, como defesa (defense response, GO:0006952) e apoptose (apoptosis, GO:0006915), e apresenta função molecular de ligação a ATP (ATP binding, GO:0005524).

Tabela 2. Iniciadores obtidos a partir das seqüências ESTs mineradas.

| Iniciador | “Blast” | “Score” | “e-value” | “Forward” | “Reverse” |
|-------------------------|---|---------|-----------|-----------------------|------------------------|
| CARF 001 ⁽⁺⁾ | gi 24459841 emb CAC82597.1 disease resistance-like protein [<i>Coffea arabica</i>] | 259 | 2.00E-67 | CAAGAAACAATGGCTGAGG | CAATAGAGTCGGTCGGTCTG |
| CARF 002 ⁽⁺⁾ | gi 15225780 ref NP_180241.1 leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 296 | 1.00E-78 | GGGTCCAAAGTGTGTAGG | CATCGTCTGTTCCACTCTG |
| CARF 003 ⁽⁺⁾ | gi 42602161 gb AAS21681.1 receptor-like kinase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 102 | 1.00E-20 | CGTCCCACGAGAAGATGATAC | TGAGTTGCCGAAGAAGTTG |
| CARF 004 ⁽⁺⁾ | gi 15226721 ref NP_179220.1 leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 131 | 4.00E-13 | TGCCAAACCTTACTGCTTTC | GCTGTTTACTTCCATTTC |
| CARF 005 ⁽⁺⁾ | gi 24459841 emb CAC82597.1 disease resistance-like protein [<i>Coffea arabica</i>] | 260 | 2.00E-68 | GGACATCAACACCAACCTC | ATCCCTACCATCCACTTCAAC |
| CARF 006 ⁽⁺⁾ | gi 30689664 ref NP_195056.2 disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 652 | 0 | GTCCCTATTCTGCCACTTTG | CAGCCCTTCTTCTTCTTCTG |
| CARF 007 ⁽⁺⁾ | gi 4835586 dbj BAA77677.1 acidic chitinase [<i>Glycine max</i>] | 268 | 2.00E-70 | ACTGTTCGGGATACAACACAC | GAAGAGCCAGGACTACATTC |
| CARF 008 ⁽⁺⁾ | gi 34907232 ref NP_914963.1 putative disease resistance protein I2 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] | 108 | 1.00E-16 | TGAGCGATTTACTGTCTGTTG | TTCAGAGACGCAAGGTTTC |
| CARF 009 ⁽⁻⁾ | gi 15225286 ref NP_180201.1 receptor-related protein kinase, ERECTA [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 180 | 2.00E-60 | AGTTTGAGCGGAGAAATACC | CAATAGGCTGCTGGTAATGTAG |
| CARF 010 ⁽⁻⁾ | gi 12331298 emb CAC24711.1 cytochrome P450 [<i>Solanum tuberosum</i>] | 208 | 1.00E-52 | TTCCTTACCTTCACTTTC | GCTTACTCTCCAAATGCTG |
| CARF 011 ⁽⁺⁾ | gi 24459849 emb CAC82600.1 disease resistance-like protein [<i>Coffea canephora</i>] | 164 | 2.00E-39 | AGAAGATGCTCAACCCAGAC | CCCATACCAACCACTGAAAC |
| CARF 012 ⁽⁺⁾ | gi 30689664 ref NP_195056.2 disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 652 | 0 | AGAAGTGGAAGGAGATGCTG | TATTGATTCGAGAGGGATG |
| CARF 013 ⁽⁺⁾ | gi 50899184 ref XP_450380.1 putative disease related protein 2 [<i>Oryza sativa</i>] | 138 | 1.00E-65 | AGAAGGCACTGGTAAGTTGG | GTAACGAATGACCGAAGGTG |
| CARF 014 ⁽⁺⁾ | gi 28555894 emb CAD45029.1 NBS-LRR disease resistance protein homologue [<i>Hordeum vulgare</i>] | 109 | 3.00E-11 | AGTCTGGGAGTAAATGGACAG | GGTTTCAAGGGACACAAGG |
| CARF 015 ⁽⁺⁾ | gi 5880843 gb AAD54934.1 chitinase precursor [<i>Petroselinum crispum</i>] | 243 | 1.00E-111 | AAAGAGTTTCTGGGTAGTGG | AATCTGGGTTGCGTAGGAG |
| CARF 016 ⁽⁻⁾ | gi 34484310 gb AAQ72788.1 hypersensitive-induced response protein [<i>Cucumis sativus</i>] | 266 | 4.00E-70 | ATCCACTTGTCTGCCTTC | TATCCACAATGAGCGTCTG |
| CARF 017 ⁽⁺⁾ | gi 116328 sp P17541 acidic endochitinase precursor [<i>Cucumis sativus</i>] | 162 | 7.00E-39 | CCTGTTGTGATGCTTCTC | TAAGTCGTGTTCCGCTGTG |
| CARF 018 ⁽⁺⁾ | gi 12331298 emb CAC24711.1 cytochrome P450 [<i>Solanum tuberosum</i>] | 209 | 6.00E-53 | ACCCAGAACTACCACCATC | CGCATTGTCTCCAGTAATC |
| CARF 019 ⁽⁺⁾ | gi 16974114 emb CAC95155.1 putative resistance protein [<i>Solanum lycopersicon</i>] | 253 | 2.00E-66 | ATCCACTGCCACTTCTATC | ACCACGGCTCATTGTAAGTC |
| CARF 020 ⁽⁺⁾ | gi 21617980 gb AAM67030.1 putative RING zinc finger protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 106 | 6.00E-15 | CTCCTTACATCCTCCTCAC | TTCGTCTACTTCCAGGTTTC |
| CARF 021 ⁽⁻⁾ | gi 30687274 ref NP_850285.1 protein kinase family [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 128 | 1.00E-18 | GCAGTCCACCACAAGTTTC | ACCACAAGGAGGGTTCTGAC |
| CARF 022 ⁽⁺⁾ | gi 18855060 gb AAL79752.1 putative protein kinase [<i>Oryza sativa</i>] | 126 | 2.00E-29 | ATTGCTGGGCTGTTCTACAC | ATTCCCTCTCTCTTCGTC |
| CARF 023 ⁽⁻⁾ | gi 4240031 dbj BAA74802.1 DNA binding zinc finger protein [<i>Pisum sativum</i>] | 112 | 3.00E-15 | GGGAAAGGTGATGAATGTG | AAAGTGAATCCTCCGACAG |
| CARF 024 ⁽⁺⁾ | gi 31324528 gb AAP47579.1 receptor kinase Lecrk [<i>Gossypium hirsutum</i>] | 257 | 2.00E-67 | TGCCTTCTTCTAATCCTG | TATGCTTGCTGTCCATC |
| CARF 025 ⁽⁺⁾ | gi 11358841 pir serine/threonine-protein kinase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 115 | 1.00E-11 | TGCCATTTCTGAGTGTG | TGGGAGTGATGATTGACTG |
| CARF 026 ⁽⁺⁾ | gb ABO78298.1 glycosyl transferase, family 48 [<i>Medicago truncatula</i>] | 380 | 4.00E-104 | GCAGTGTTCCTCGCTTG | GCCACATCCTTACCTTTAC |
| CARF 027 ⁽⁻⁾ | gi 15221833 ref NP_173302.1 protein kinase-related [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 269 | 3.00E-71 | GAAGAAGGTGCGGTTTGAC | ACTCGGGATGTAAGAGGTTG |
| CARF 028 ⁽⁺⁾ | gi 15231381 ref NP_187364.1 membrane protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 141 | 2.00E-32 | CTAACCACCACCTTCAATC | AAACACCACCATCCACAAC |
| CARF 029 ⁽⁻⁾ | gi 29124139 gb AAO65880.1 putative DNA-binding protein [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] | 141 | 5.00E-32 | ACTTAGGAGGGAATGGGAAC | GGGCTGAGAGTTGAGATAGG |
| CARF 030 ⁽⁺⁾ | gi 2792155 emb CAA11226.1 chalcone reductase [<i>Sesbania rostrata</i>] | 105 | 7.00E-52 | ATGTTGGTTGGCAGCAGAG | TTTCTTCTTGGTGAGTTCC |
| CARF 031 ⁽⁻⁾ | gi 30683822 ref NP_850115.1 protein kinase family [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 179 | 2.00E-49 | ATGTGGTCCCTTTGCTTG | CAGTTGCGATTTCCATCC |
| CARF 032 ⁽⁻⁾ | gi 30683822 ref NP_850115.1 protein kinase family [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 241 | 3.00E-62 | CCATCTCAAGGACGGTAAAG | TCGGAGCAAGTAGCCAAAG |

Continua...

Tabela 2. Continuação.

| Iniciador | “Blast” | “Score” | “e-value” | “Forward” | “Reverse” |
|-----------------------------|---|---------|-----------|------------------------|--------------------------|
| CARF 033 ⁽¹⁾ (+) | ref NP_189017.1 leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 363 | 9.00E-99 | TCTGCCAACCATCCAAG | CAAATGTTCCAGCCAACC |
| CARF 034 ⁽¹⁾ (+) | gi 92874399 gb ABE82675.1 tyrosine protein kinase, active site [<i>Medicago truncatula</i>] | 100 | 2.00E-19 | TGTCAGCATCATCATCAACC | TCAAGTGCCATAAGTTCTCC |
| CARF 035 ⁽¹⁾ (-) | gi 30686115 ref NP_850618.1 GATA zinc finger protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 105 | 3.00E-11 | AGTGAAGATGGAGGTTGGAG | CCTGAGTGTATTATGGTTAGTAGG |
| CARF 036 ⁽²⁾ (-) | gi 24459853 emb CAC82602.1 disease resistance-like protein [<i>Coffea arabica</i>] | 142 | 5.00E-33 | CCGTCTGGTTTCAATCGTC | ATCTCTGGCAATCTCTCTG |
| CARF 037 ⁽²⁾ (-) | gi 24459845 emb CAC82610.1 disease resistance-like protein [<i>Coffea arabica</i>] | 161 | 2.00E-58 | CCATCGCATTCTTTGGAG | GGAGGGATTGGTTGTTTG |
| CARF 038 ⁽²⁾ (-) | gi 7488989 pir disease resistance protein Prf [<i>Solanum lycopersicon</i>] | 163 | 4.00E-39 | TCCCGTCTCTCTCTCTTG | TCCAGGCAGATGAAGTTTG |
| CARF 039 ⁽²⁾ (+) | gi 27817976 dbj BAC55740.1 putative disease resistance gene homolog [<i>Oryza sativa</i>] | 142 | 7.00E-33 | AAAGAGCAGGACTTACGAC | CTCCACCTAAGCAAAGACAAC |
| CARF 040 ⁽²⁾ (+) | gi 3451147 emb CAA09110.1 chitinase [<i>Hevea brasiliensis</i>] | 266 | 4.00E-70 | GGATACAGCACAGCAGAGAG | AGCAGCCAGGACTACATTTC |
| CARF 041 ⁽²⁾ (-) | gi 15242291 ref NP_197045.1 cyclic nucleotide-regulated ion channel (CNGC2) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 142 | 7.00E-63 | ACTATGAACGCCAGAGGTG | GGGTCTCTCCCTTGTATC |
| CARF 042 ⁽²⁾ (+) | gi 15230534 ref NP_187864.1 heat shock protein hsp70 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 425 | 1.00E-118 | TACTCCACTGTCCCTTGGTC | TCGTATCCACCTTCTTCTGG |
| CARF 043 ⁽²⁾ (+) | gi 3451147 emb CAA09110.1 beclin 1-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 258 | 1.00E-67 | GACATTGCCACAACACAGAC | GGGAAAGCATCAGTTAGCAC |
| CARF 044 ⁽²⁾ (-) | gi 11066033 gb AAG28426.1 cytosolic aconitase [<i>Nicotiana tabacum</i>] | 409 | 1.00E-120 | CGGTTGACATTGACTTTGAG | GAGCCCTGTTTGTAGGAC |
| CARF 045 ⁽²⁾ (-) | gi 30013657 gb AAP03871.1 oxygen evolving complex 33 kDa photosystem II protein [<i>Nicotiana tabacum</i>] | 373 | 1.00E-113 | ACTTTGTAAGGGCGATTGAG | TCATCAAGGGTGTAGGTTAGG |
| CARF 046 ⁽²⁾ (-) | gi 584861 sp P37118 cytochrome P450 [<i>Solanum melogena</i>] | 296 | 2.00E-79 | CTGGAGGGTGTGATAGAAGG | TGTGTGCTCTTTGGAACATC |
| CARF 047 ⁽²⁾ (+) | gi 15021761 gb AAK77908.1 AAA-metalloprotease FtsH [<i>Pisum sativum</i>] | 298 | 6.00E-80 | CACTGTTGCTTCTGGGTTT | TTCACGCTCATATTACCTC |
| CARF 048 ⁽²⁾ (-) | gi 6934298 gb AAF31705.1 heat-shock protein 80 [<i>Euphorbia esula</i>] | 236 | 3.00E-61 | ATCCTGTGAATGCGGTTG | ACCCTGCTGTTGGTTACTG |
| CARF 049 ⁽²⁾ (+) | gi 13752562 gb AAK38727.1 importin alpha 2 [<i>Capsicum annum</i>] | 479 | 1.00E-134 | TGGGCTCTCTCTATCTCTC | CCTGAATCTGCTCTTATTCTC |
| CARF 050 ⁽²⁾ (+) | gi 15232308 ref NP_188696.1 non-race specific disease resistance protein (NDR1) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 135 | 5.00E-31 | GCCTGATGCCACTTTGTTC | AGCCTACACCTTTGTCTCTC |
| CARF 051 ⁽²⁾ (+) | gi 15553476 gb AAL01886.1 chitinase 3-like protein precursor [<i>Trichosanthes kirilowii</i>] | 164 | 2.00E-39 | CCTGTTGTTGATTGCTTCTC | TAAGTCGTGTTTCCGCTGTG |
| CARF 052 ⁽²⁾ (+) | gi 15553476 gb AAL01886.1 chitinase 3-like protein precursor [<i>Trichosanthes kirilowii</i>] | 181 | 2.00E-44 | GAGAGCAGGGTCAGGAATAG | GAAGATGCGGAAGAAGTGG |
| CARF 053 ⁽²⁾ (+) | gi 1076693 pir S51678 chitinase (EC 3.2.1.14) class I [<i>Sambucus nigra</i>] | 379 | 1.00E-104 | AGCGGTGTAATAATGGTG | TCTCTGGCTACAAGTTCAGG |
| CARF 054 ⁽²⁾ (+) | gi 1345787 sp P48387 chalcone synthase [<i>Camellia sinensis</i>] | 470 | 1.00E-131 | GGCTGAGAACAAACAAGGTG | AAGAATGAACACGACACAGG |
| CARF 055 ⁽²⁾ (+) | gi 12229619 sp Q9ZRS4 chalcone synthase [<i>Catharanthus roseus</i>] | 187 | 2.00E-46 | GCCTGTGCTCTGTTTCTTC | GGTCATTCAACCAAGCAAG |
| CARF 056 ⁽²⁾ (-) | gi 7433144 pir T07101 lipoxigenase (EC 1.13.11.12) [<i>Solanum lycopersicon</i>] | 293 | 5.00E-79 | CCTAATCGTCCAACGTGAG | CATCTCGTGGTATGGTATCTG |
| CARF 057 ⁽²⁾ (+) | gi 25044823 gb AAM28275.1 germin-like protein [<i>Ananas comosus</i>] | 107 | 2.00E-28 | TCTGTGTTGCGGATTTGAG | TTGAAGGCTGTTGTAAGCAC |
| CARF 058 ⁽²⁾ (-) | gi 15241939 ref NP_201080.1 hypersensitive-induced response protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 186 | 3.00E-46 | GGTAAGTTTCAGGATGTGCTTG | GATTGAGTTTGAACACTGG |
| CARF 059 ⁽²⁾ (+) | gi 7438249 pir T03803 tumor-related protein [<i>Nicotiana tabacum</i>] | 146 | 5.00E-34 | ACTACATCGGGACCACCTTC | CCTTCAACTCCGTCAGTCAG |

⁽¹⁾Iniciadores obtidos por meio da estratégia “electronic northern”. ⁽²⁾Iniciadores obtidos por meio da estratégia palavras-chave. ⁽³⁾Iniciadores obtidos por meio da estratégia sequências publicadas. (+), iniciadores que funcionaram; e (-), iniciadores que não funcionaram.

Vários estudos relatam a identificação de genes de cafeeiros relacionados à resistência a patógenos com uso de técnicas moleculares (Chen et al., 2003; Fernandez et al., 2004; Lin et al., 2005; Ganesh et al., 2006; Guzzo et al., 2009). No presente trabalho, o CARF 005, um marcador derivado de EST, foi capaz de diferenciar

indivíduos resistentes e susceptíveis à ferrugem do cafeeiro e, portanto, pode ser testado em populações segregantes contendo diferentes genes de resistência. Essa análise permitirá verificar a ligação desse marcador, obtido a partir das sequências mineradas, com os diferentes genes relacionados à resistência do cafeeiro à ferrugem.

Em relação aos 26 pares de iniciadores que não apresentaram polimorfismo, como o CARF 028 (Figura 1), os fragmentos podem ter apresentado polimorfismos de um único nucleotídeo ao longo da sequência e, por isso, não puderam ser observados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Essa diferença, provavelmente é resultado do padrão

de expressão diferente desses genes entre indivíduos resistentes e susceptíveis, pode ser verificada por meio de análises de enzima de restrição e por meio de sequenciamento para detecção de SNPs (“single nucleotide polymorphisms”). Para a verificação da expressão diferencial, podem ser realizadas análises de RT-PCR e ensaios de macroarranjo.

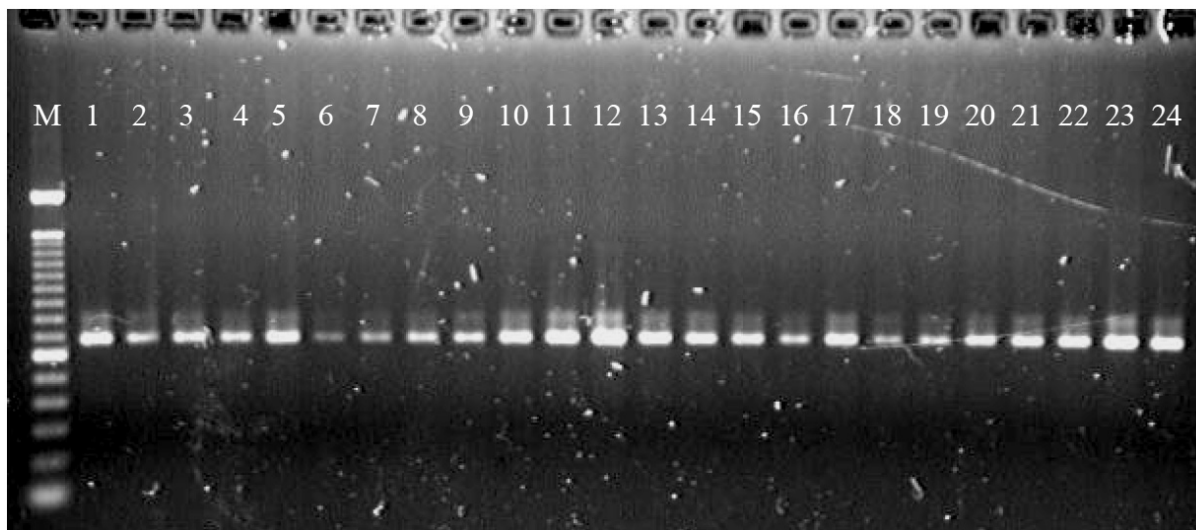


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de produtos de amplificação de DNA genômico de cafeeiros suscetíveis e resistentes à ferrugem, com uso do iniciador CARF 028. M, marcador de peso molecular de 100 pb. Bandas 1–12, genótipos de cafeeiro susceptíveis e 13–24, genótipos de cafeeiro resistentes.

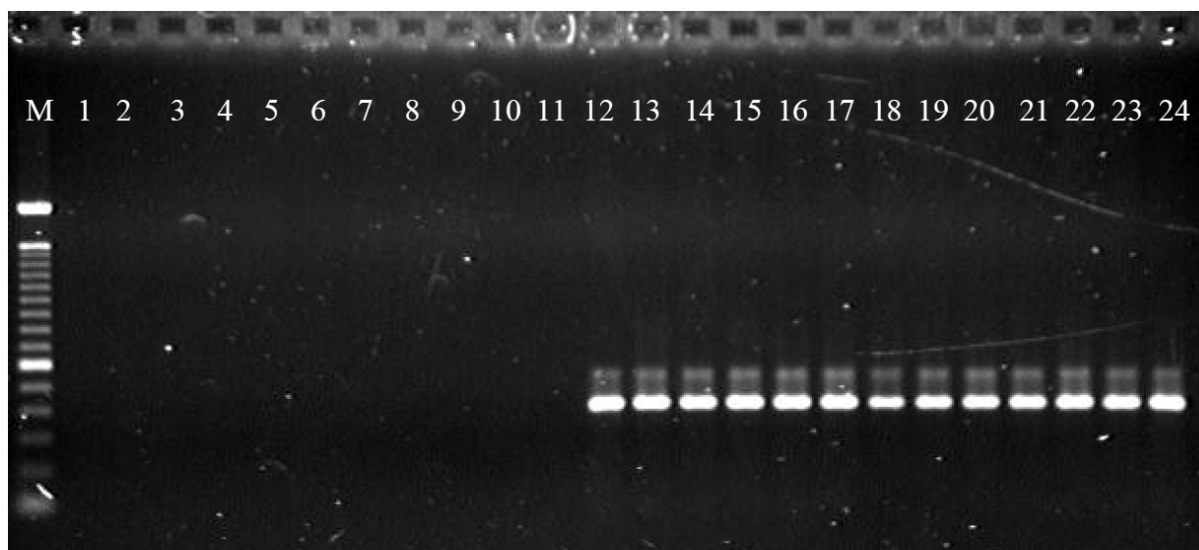


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose de produtos de amplificação de DNA genômico de cafeeiros suscetíveis e resistentes à ferrugem, com uso do iniciador CARF 005. M, marcador de peso molecular de 100 pb. Bandas 1–12, genótipos de cafeeiro susceptíveis e 13–24, genótipos de cafeeiro resistentes.

Conclusões

1. Das sequências do CafEST, 2.272 mineradas estão relacionadas à defesa do cafeeiro a doenças.

2. O marcador CARF 005, desenvolvido a partir das ESTs mineradas, é capaz de diferenciar os cafeeiros analisados em resistentes e susceptíveis a *Hemileia vastatrix*.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e à Financiadora de Estudos e Projetos, pelo apoio financeiro; aos Drs. Antônio Alves Pereira e Antonio Carlos Baião de Oliveira, por informações e disponibilização dos genótipos utilizados no trabalho.

Referências

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- ALVARENGA, S.M.; CAIXETA, E.T.; HUFNAGEL, B.; THIEBAUT, F.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S. *In silico* identification of coffee genome expressed sequences potentially associated with resistance to diseases. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, p.795-806, 2010.
- ASHBURNER, M.; BALL, C.A.; BLAKE, J.A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J.M.; DAVIS, A.P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S.S.; EPPIG, J.T.; HARRIS, M.A.; HILL, D.P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J.C.; RICHARDSON, J.E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G.M.; SHERLOCK, G. Gene ontology: tool for unification of biology. **Nature Genetics**, v.25, p.25-29, 2000.
- AYALA-NAVARRETE, L.; BARIANA, H.S.; SINGH, R.P.; GIBSON, J.M.; MECHANICOS, A.A.; LARKIN, P.J. Trigenomic chromosomes by recombination of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* translocations in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.116, p.63-75, 2007.
- AYALA-NAVARRETE, L.; TOURTON, E.; MECHANICOS, A.; LARKIN, P. Comparison of *Thinopyrum intermedium* derivatives carrying barley yellow dwarf virus resistance in wheat. **Genome**, v.52, p.537-546, 2009.
- BOTELLA, M.A.; PARKER, J.E.; FROST, L.N.; BITTNER-EDDY, P.D.; BEYNON, J.L.; DANIELS, M.J.; HOLUB, E.B.; JONES, J.D.G. Three genes of the Arabidopsis RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. **Plant Cell**, v.10, p.1847-1860, 1998.
- BRITO, G.G. de; CAIXETA, E.T.; GALLINA, A.P.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M.E. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica**, v.173, p.255-264, 2010.
- CARAZZOLLE, M.F.; FORMIGHIERI, E.F.; DIGIAMPIETRI, L.A.; ARAÚJO, M.R.R.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, G.A.G. Gene Projects: a genome web tool for ongoing mining and annotation applied to CitEST. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.1030-1036, 2007.
- CHEN, Z.J.; RIBEIRO, A.; SILVA, M.C.; SANTOS, P.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; GOUVEIA, M.; FERNANDEZ, D.; RODRIGUES JÚNIOR, C.J. Heat shock-induced susceptibility of green coffee leaves and berries to *Colletotrichum gloeosporioides* and its association to PR and hsp70 gene expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.63, p.181-190, 2003.
- LABORATÓRIO DE GENÔMICA E EXPRESSÃO. **Coffee Genome Project**. Disponível em: <<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>>. Acesso em: 15 set. 2011.
- DINESH-KUMAR, S.P.; THAM, W.; BAKER, B.J. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p.14789-14794, 2000.
- DINIZ, L.E.C.; SAKIYAMA, N.S.; LASHERMES, P.; CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; ZAMBOLIM, E.M.; LOUREIRO, M.E.; PEREIRA, A.A.; ZAMBOLIM, L. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, p.387-393, 2005.
- ELLIS, J.G.; LAWRENCE, G.J.; LUCK, J.E.; DODDS, P.N. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene for gene specificity. **Plant Cell**, v.11, p.495-506, 1999.
- FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BON, M.C.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.527-536, 2004.
- GANESH, D.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.C.; ALARY, R.; LECOULS, A.C.; FERNANDEZ, D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, v.170, p.1045-1051, 2006.
- GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, v.157, p.625-638, 2009.
- HAGRAS, A.A.; KISHII, M.; SATO, K.; TANAKA, H.; TSUJIMOTO, H. Extended application of barley EST markers for the analysis of alien chromosomes added to wheat genetic background. **Breeding Science**, v.55, p.335-341, 2005.
- LIN, C.; MUELLER, L.A.; CARTHY, J.M.; CROUZILLAT, D.; PÉTIARD, V.; TANKSLEY, S.D. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.114-130, 2005.

- LU, H.J.; FELLERS, J.P.; FRIESEN, T.L.; MEINHARDT, S.W.; FARIS, J.D. Genomic analysis and marker development for the Tsn1 locus in wheat using bin-mapped ESTs and Xanking BAC contigs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.1132-1142, 2006.
- PARNISKE, M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; GOLSTEIN, C.; THOMAS, C.M.; JONES, D.A.; HARRISON, K.; WULFF, B.B.H.; JONES, J.D.G. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. **Cell**, v.91, p.821-832, 1997.
- ROWLAND, L.J.; DHANARAJ, A.L.; POLASHOCK, J.J.; ARORA, R. Utility of Blueberry derived EST-PCR. **HortScience**, v.38, p.1428-1432, 2003a.
- ROWLAND, L.J.; MEHRA, S.; DHANARAJ, A.L.; OGDEN, O.L.; SLOVIN, J.P. Development of EST-PCR markers for DNA fingerprinting and genetic relationship studies in blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.128, p.682-690, 2003b.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general uses and for biologist programmers. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S.A. (Ed.). **Bioinformatics: methods and protocols**. Totowa: Humana, 2000. p.365-386. (Methods in molecular biology, 132).
- SARGENT, D.J.; RYS, A.; NIER, S.; SIMPSON, D.W.; TOBUTT, K.R. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. **Theoretical and Applied Genetics**, v.114, p.373-384, 2007.
- SHEN, X.R.; OHM, H. Molecular mapping of Thinopyrum-derived Fusarium head blight resistance in common wheat. **Molecular Breeding**, v.20, p.131-140, 2007.
- SILVA, M.C.; VÁRZEA, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; AZINHEIRA, H.G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A.S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.119-147, 2006.
- TAMELING, W.I.L.; VOSSEN, J.H.; ALBRECHT, M.; LENGAUER, T.; BERDEN, J.A.; HARING, M.A.; CORNELISSEN, B.J.C.; TAKKEN, F.L.W. Mutations in the NBARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. **Plant Physiology**, v.140, p.1233-1245, 2006.
- TAO, Y.; YUAN, F.; LEISTER, R.T.; AUSUBEL, F.M.; KATAGIRI, F. Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene RPS2. **Plant Cell**, v.12, p.2541-2554, 2000.
- THOMAS, C.M.; JONES, D.A.; PARNISKE, M.; HARRISON, K.; BALINT-KURTI, P.J.; HATZIXANTHIS, K.; JONES, J.D.G. Characterization of the tomato Cf-4 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in Cf-4 and Cf-9. **Plant Cell**, v.9, p.2209-2224, 1997.
- TORNERO, P.; CHAO, R.A.; LUTHIN, W.N.; GOFF, S.A.; DANGL, J.L. Large-scale structure-function analysis of the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. **Plant Cell**, v.14, p.435-450, 2002.
- VAN DER VOSSEN, H.A.M. State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: ZAMBOLIM, L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V.M.P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa: UFV, 2005. p.1-30.
- VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.H. de A.; METHA, Â.; OLIVEIRA, A.C. de; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. de B.; MONTE, D. de C.; GIGLIOTTI, É.; KIMURA, E.T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; ALMEIDA, E.R.P. de; JORGE, É.C.; ALBUQUERQUE, É.V.S.; SILVA, F.R. da; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H.E.; DORRY, H.F.A.; CARRER, H.; ABREU, I.N.; BATISTA, J.A.N.; TEIXEIRA, J.B.; KITAJIMA, J.P.; XAVIER, K.G.; LIMA, L.M. de; CAMARGO, L.E.A. de; PEREIRA, L.F.P.; COUTINHO, L.L.; LEMOS, M.V.F.; ROMANO, M.R.; MACHADO, M.A.; COSTA, M.M. do C.; SÁ, M.F.G. de; GOLDMAN, M.H.S.; FERRO, M.I.T.; TINOCO, M.L.P.; OLIVEIRA, M.C.; SLUYS, M.-A.V.; SHIMIZU, M.M.; MALUF, M.P.; EIRA, M.T.S. da; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P.D.S.C.; OLIVEIRA, R.L.B.C. de; HARAKAVA, R.; BALBAO, S.F.; TSAI, S.M.; MAURO, S.M.Z. di; SANTOS, S.N.; SIQUEIRA, W.J.; COSTA, G.G.L.; FORMIGHIERI, E.F.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.G. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.95-108, 2006.
- WANG, G.-L.; RUAN, D.-L.; SONG, W.-Y.; SIDERIS, S.; CHEN, L.; PI, L.-Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Z.; FAUQUET, C.; GAUT, B.S.; WHALEN, M.C.; RONALD, P.C. *Xa21D* encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. **Plant Cell**, v.10, p.765-779, 1998.

Recebido em 9 de maio de 2011 e aprovado em 12 de agosto de 2011