

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

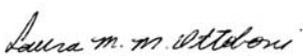
INSTITUTO DE BIOLOGIA

TÂNIA MÁRCIA DE QUEIROZ

**“Identificação e caracterização de cDNAs expressos
diferencialmente e detecção de alterações metabólicas em folhas de
cafeeiro inoculadas com *Hemileia vastatrix*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
TÂNIA MÁRCIA DE QUEIROZ
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.


Orientadora: Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Q32i	<p>Queiroz, Tânia Márcia de Identificação e caracterização de cDNAs expressos diferencialmente e detecção de alterações metabólicas em folhas de cafeeiro inoculadas com <i>Hemileia vastatrix</i> / Tânia Márcia de Queiroz. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Expressão gênica. 2. <i>Hemileia vastatrix</i>. 3. Café – Doenças e pragas. 4. Infravermelho. 5. Fungos-da-ferrugem. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
-------------	---

Título em inglês: Identification and characterization of cDNAs differentially expressed and detection of metabolic alterations in coffee leaves inoculated with *Hemileia vastatrix*.

Palavras-chave em inglês: Gene expression; *Hemileia vastatrix*; Coffee – Diseases and pests; Infrared; Rust fungi.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni, Oliveiro Guerreiro Filho, José Camillo Novello, Marília Gaspar Maís, Márcio José da Silva.

Data da defesa: 06/06/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

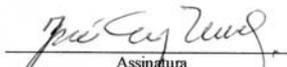
Campinas, 06 de junho de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (Orientadora)


Assinatura

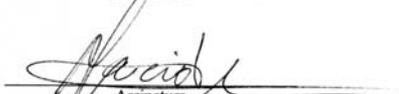
Prof. Dr. José Camillo Novello


Assinatura

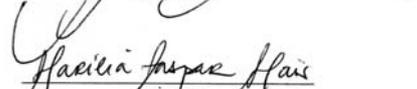
Dr. Oliveira Guerreiro Filho

Assinatura

Dr. Márcio José da Silva


Assinatura

Dra. Marília Gaspar Maïs


Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira


Assinatura

Dra. Edi Lúcia Sartorato

Assinatura

Dr. Antônio Carlos Baião de Oliveira

Assinatura

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, pela orientação
- À amiga Aline Dias Brandão, pela ajuda na execução desse trabalho
- Aos pesquisadores do IAC: Dra. Mírian Peres Maluf, Dr. Oliveiro Guerreiro Filho, Masako Toma Braghini, Milene Silvestrini, Adalgisa Soares de Oliveira, Cristina de Gaspari-Pezzopane
- Aos pesquisadores do Instituto de Botânica de São Paulo: Dra. Luce M. B. Torres e Dra. Marília Gaspar Maïs
- Ao Dr. Ronei Jesus Poppi e Alessandra Borin, do Instituto de Química da UNICAMP
- Ao Dr. Marcelo L. Ribeiro, da Universidade São Francisco
- À CAPES, pelo apoio financeiro
- Aos membros da Banca Examinadora
- Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade

ÍNDICE

Resumo	11
Abstract	12
Introdução	13
A cultura do cafeeiro.....	13
Ferrugem do cafeeiro.....	14
Interações entre patógeno e hospedeiro.....	17
DRIFTS	19
Objetivo.....	21
Materiais e Métodos	22
1. Coleta de uredosporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	22
2. Coleta de folhas de cafeeiro	22
3. Inoculação de folhas de cafeeiro com uredosporos de <i>H. vastatrix</i>	22
4. Isolamento de RNA e tratamento com DNase.....	23
5 <i>Display</i> diferencial de mRNA.....	23
6. Síntese de cDNA	24
7. PCR a partir do cDNA e eletroforese das amostras amplificadas	24
8. Isolamento, eluição e reamplificação das bandas diferenciais	25
9. Clonagem dos cDNAs	26
9.1. Reação de ligação	26
9.2. Transformação bacteriana.....	26
9.3. Isolamento de DNA plasmidial	26
10. Seqüenciamento.....	27
11. Análise das seqüências	28
12. Confirmação da expressão dos cDNAs por PCR em tempo real	28
12.1. Coleta de folhas de cafeeiro.....	28
12.2. Inoculação de folhas de cafeeiro com uredosporos de <i>H. vastatrix</i>	28
12.3. Isolamento do RNA e tratamento com DNase	28
12.4. Síntese de cDNA.....	29

12.5. PCR em tempo real	29
13. DRIFTS	30
13.1.Determinação da reflexão do espectro na região do infravermelho médio	32
13.2 Análise dos dados	33
Resultados e discussão	34
Identificação de cDNAs expressos diferencialmente em folhas de cafeeiro inoculadas com <i>H. vastatrix</i>	34
DRIFTS	54
Análise de componentes principais	57
Efeito das interações e comparação de médias pelo Teste de Tukey.....	64
Conclusões	78
Considerações finais.....	79
Referências bibliográficas	80
Anexo	91
Declaração	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Designação dos tratamentos representados por diferentes intervalos de amostragem após a inoculação de folhas do cultivar Icatu Vermelho com <i>H. vastatrix</i>	24
Tabela 2. Seqüências dos <i>primers</i> usados em PCR em tempo real.....	29
Tabela 3. Designação por letras de cada intervalo de amostragem após a inoculação das folhas do cultivar Icatu Vermelho e Mundo Novo com <i>H. vastatrix</i>	31
Tabela 4. Picos de reflectância e alterações das ligações químicas que ocorreram em folhas de <i>C. arábica</i>	57
Tabela 5. Resultado da análise de variância comparando os efeitos de cultivar, tempo, inóculo e as interações cultivar x tempo (CxT), cultivar x inóculo (CxI), tempo x inóculo (TxI) e cultivar x tempo x inóculo (CxTxI).....	65
Tabela 6. Efeito médio das variáveis A, B, C, D, E, F, correspondentes a picos no espectro de infravermelho médio, obtidos para os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo.....	66
Tabela 7. Efeito médio das variáveis A, B, C, D, E, F, correspondentes às leituras no espectro de infravermelho médio, obtidas com amostragens coletadas após diferentes tempos de inoculação com esporos de <i>H. vastatrix</i>	67
Tabela 8. Efeito médio das variáveis A, B, C, D, E, F, correspondentes às leituras no espectro de infravermelho médio, obtidas a partir da inoculação de esporos de <i>H. vastatrix</i> em folhas de cafeeiros.....	67
Tabela 9. Efeito médio da interação entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo e o tempo após a inoculação de esporos de <i>H. vastatrix</i>	68
Tabela 10. Efeito médio da interação entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo e presença ou ausência de inóculo de esporos de <i>H. vastatrix</i> nas folhas.....	69
Tabela 11. Efeito médio da interação entre presença ou ausência de inóculo e o tempo após a inoculação de esporos de <i>H. vastatrix</i> nas folhas.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Display diferencial de mRNA das amostras A, B, C, D, H, I, J de folhas de cafeeiro cultivar Icatu Vermelho.....	35
Figura 2. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-FB1-111-B01-BG.F e a seqüência de aminoácidos de uma anexina de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
Figura 3. Expressão relativa do cDNA GC2 na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo <i>H. vastatrix</i> , no intervalo de 1 hora após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.....	37
Figura 4. Comparação da seqüência de aminoácidos entre CA00-XX-LV5-086-C06-EP.F do Genoma Café com uma proteína M do fotossistema II de <i>Triticum aestivum</i>	38
Figura 5. Expressão relativa do cDNA GD3 na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo <i>H. vastatrix</i> , no intervalo de 1 hora após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.....	39
Figura 6. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos CA00-XX-RM1-026-G12-MC.F e a seqüência de aminoácidos de uma pirofosfatase próton-inorgânica vacuolar de <i>Pyrus communis</i>	41
Figura 7. Expressão relativa do cDNA GH1X na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo <i>H. vastatrix</i> , no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.....	41
Figura 8. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-SH2-070-F03-EM.F do Genoma Café e a seqüência de aminoácidos de um Citocromo P450 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
Figura 9. Expressão relativa do cDNA GH4 na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo <i>H. vastatrix</i> , no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.....	43
Figura 10. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos CA00-XX-CL2-075-G02-BF.F e a seqüência de aminoácidos de uma proteinase carboxil terminal de <i>A. thaliana</i>	45

Figura 11. Expressão relativa do cDNA GI1 na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo <i>H. vastatrix</i> , no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.....	46
Figura 12. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos CA00-XX-CL2-075-G02-BF.F do Genoma Café com uma HSP70 de <i>Nicotiana tabacum</i>	47
Figura 13. Expressão relativa do cDNA GI2 na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo <i>H. vastatrix</i> , no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.....	48
Figura 14. Comparação entre seqüência deduzida de aminoácidos CA00-XX-IA2-004-E02-EC.F do Genoma Café com uma quinase C de <i>A. thaliana</i>	49
Figura 15. Expressão relativa do cDNA GI9 na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo <i>H. vastatrix</i> , no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.....	51
Figura 16. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-CS1-088-H04-RF.F do Genoma Café com a proteína FIS1 de <i>Linum usitatissimum</i>	52
Figura 17. Expressão relativa do cDNA CI4 na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo <i>H. vastatrix</i> , no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.....	53
Figura 18. Espectro de reflectância difusa de infravermelho médio obtido de folhas de <i>Coffea arabica</i> cultivares Icatu Vermelho (IV) e Mundo Novo (MN).....	55
Figura 19. Espectro de reflectância difusa de infravermelho médio obtido de folhas de <i>Coffea arabica</i> cultivares Icatu Vermelho (IV) e Mundo Novo (MN) na região entre os números de onda entre 800 a 1700 cm^{-1}	56
Figura 20. Análise dos componentes principais para <i>Coffea arabica</i> cultivar Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) à 1 hora após a inoculação.....	59
Figura 21. Análise dos componentes principais para <i>Coffea arabica</i> cultivares Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) às 24 horas após a inoculação.....	60
Figura 22. Análise dos componentes principais para <i>Coffea arabica</i> cultivar Icatu	

Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) às 48 horas após a inoculação.....61

Figura 23. Análise dos componentes principais para *Coffea arabica* cultivar Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) às 96 horas após a inoculação.....62

Figura 24. Análise dos componentes principais para *Coffea arabica* cultivar Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) às 168 horas após a inoculação.....63

Figura 25. Interação do efeito dos cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo. A) Folha inteira sem inóculo utilizada como controle; B) Metade da folha inoculada com esporos de *H. vastatrix*; C) Metade da folha não inoculada com esporos do fungo. Avaliações realizadas em 1, 24, 48, 96 e 168 horas após a inoculação de esporos, em três regiões do espectro de infravermelho (A, B, C).....76

Figura 26. Interação do efeito dos cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo. A) Folha inteira sem inóculo utilizada como controle; B) Metade da folha inoculada com esporos de *H. vastatrix*; C) Metade da folha não inoculada com esporos do fungo. Avaliações realizadas em 1, 24, 48, 96 e 168 horas após a inoculação de esporos, em três regiões do espectro de infravermelho (D, E, F).....77

RESUMO

A ferrugem alaranjada, cujo agente causal é o fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br., tem sido um dos principais problemas da cultura do cafeeiro em todas as regiões do mundo. Esta doença pode causar prejuízos de até 50% da produção. O fungo ataca todas as variedades de café, porém *Coffea canephora* apresenta cultivares resistentes, enquanto a maioria dos cultivares comerciais dentro da espécie *Coffea arabica* é suscetível à doença. Nesse trabalho foi feita a identificação e a caracterização de genes expressos diferencialmente em *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho – IAC 4045 (resistente ao agente da ferrugem). Para isso, foi utilizada a técnica de *display* diferencial de mRNA. A comparação entre os padrões de cDNAs nos géis permitiu o isolamento de cDNAs com expressão diferencial nos intervalos de 1 hora e 24 horas após a inoculação com o fungo. Alguns desses cDNAs foram clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do Genoma Café, sendo que oito cDNAs tiveram sua expressão confirmada e apresentaram similaridade com uma anexina, uma proteína M do fotossistema II, uma pirofosfatase próton-inorgânica vacuolar, um Citocromo P450, uma proteinase carboxil-terminal, uma proteína *heat shock* - HSP70, uma quinase C e uma proteína FIS1. Além da análise da identificação de genes com expressão diferencial, foi feita também uma análise das diferenças metabólicas em folhas de *C. arabica* cv. Icatu Vermelho - IAC 4045 e Mundo Novo - IAC 501 inoculadas com *H. vastatrix*. A técnica utilizada nas análises foi DRIFTS (*diffuse reflectance infrared Fourier transform spectrometry* ou espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier). Foram observados picos de reflectância proeminentes em regiões de números de onda 1075 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} . A análise de componentes principais demonstrou que houve uma discriminação entre Icatu Vermelho e Mundo Novo 48 horas após a inoculação e o teste de Tukey mostrou que para as regiões 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} houve uma diferença significativa entre os cultivares a 5% de probabilidade.

ABSTRACT

The orange rust, caused by fungus *H. vastatrix* Berk & Br., has been the major problem of the coffee culture in all regions of the world. This disease can cause 50% damage in the plantation. The fungus attack all the coffee varieties, but *C. canephora* present resistant cultivars while the majority of the comercial cultivars into *C. arabica* is susceptible to disease. This experiment has the purpose of the identification and characterization of the differentially expressed cDNAs in *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho (resistant to rust fungus). For this has been utilized mRNA differential display technique. The comparation between cDNAs in the display gels allowed the cDNAs isolation with differential expression in the intervals of 1 hour and 24 hours after inoculation of leaves with fungus. Some cDNAs were cloned and sequenced. The sequences were compared in Coffee Genome data bank and eight cDNAs had the expression confirmed and present similarity with a annexin, photosystem II M protein, a vacuolar proton inorganic pyrophosphatase, a cytochrome P450 family, a carboxyl-terminal protease, a heat shock 70 kDa protein, and a FIS1 protein. Beyond differential expression of the genes analysis, we also analysed the metabolic differences in *C. arabica* cultivars Icatu Vermelho (IAC 4045) and Mundo Novo (IAC 501) leaves inoculated with *H. vastatrix*. The technique utilized was DRIFTS (diffuse reflectance infrared Fourier transform spectrometry). Principal Component Analysis demonstrate there were a discrimination between Icatu Vermelho and Mundo Novo 48 hours after inoculation and Tukey Test showed to the regions 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} there were significative difference between cultivars to 5% of probability.

INTRODUÇÃO

A cultura do cafeeiro

O cafeeiro, planta da família Rubiaceae, é classificado em dois gêneros, *Coffea* e *Psilanthus*. Todas as espécies do gênero *Coffea* são nativas de regiões tropicais da África e ilhas do Oceano Índico, enquanto as espécies do gênero *Psilanthus*, são originárias da África, Ásia e Oceania (Cros *et al.*, 1988). O gênero *Coffea* compreende duas espécies de importância econômica: *C. arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre (café robusta), que perfazem um total de 70% e 30%, respectivamente, do café comercializado mundialmente (Fazuoli *et al.*, 2002; Matiello *et al.*, 2002). As espécies *C. liberica* (café libérica) e *C. racemosa* (café racemosa) são cultivadas em pequena escala em alguns países da África e consumidos apenas localmente (Mazzafera *et al.*, 1991).

As espécies do gênero *Coffea* são diplóides ($2n = 2x = 22$ cromossomos), exceto *C. arabica* que é tetraplóide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) (Krug *et al.*, 1939). Embora mostrem considerável variação na morfologia, tamanho e adaptação ecológica, as espécies do gênero *Coffea* hibridizam-se e produzem híbridos relativamente férteis. A espécie *C. arabica* multiplica-se por autofecundação e *C. canephora*, exclusivamente por fecundação cruzada (Conagin & Mendes, 1961). A espécie *C. arabica* é nativa de uma região restrita, localizada no sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, localizada entre 1000 e 2000 metros de altitude, e *C. canephora* tem distribuição geográfica bem ampla, ocorrendo em uma faixa de região ocidental, central-tropical e subtropical do continente africano. O cafeeiro não tolera variações muito amplas de temperatura, sendo que as médias abaixo de 16°C e acima de 24°C não são adequadas, e o ótimo está compreendido entre 18°C e 21°C (Fazuoli, 1986).

O café foi introduzido no Brasil em 1727, originário de plantações da Guiana Francesa. O pé de café frutifica em média após dois anos do plantio, exigindo tratamentos constantes nesse intervalo. A brota do café depende do clima e da altitude do cultivo. A flor dá um fruto de cor vermelha ou amarela, de 10 a 15 milímetros de diâmetro, com dois grãos geminados de cor esverdeada.

O café arábica é mais aceito por possuir melhor sabor e aroma que o café robusta. Por outro lado, o café robusta apresenta outros aspectos que fazem dele um competidor do café arábica tais como, menor custo de produção, alta produtividade e maior rendimento (Mendes *et al.*, 2001).

O agronegócio café no Estado de São Paulo movimentava cerca de 5 bilhões de reais, anualmente, e gera 500 mil empregos, que envolvem a produção de insumos para a cultura, exportação, consumo do tradicional cafezinho e todas as etapas intermediárias com os seus efeitos multiplicadores, representados pelas atividades ligadas à agroindústria e ao setor de serviços. O cultivo do café no Brasil integra importante complexo agro-industrial-exportador que ainda hoje faz do país o principal produtor e exportador, embora sofrendo concorrência de outros países produtores tradicionais, como Colômbia, Guatemala, México e Costa do Marfim, e menos tradicionais, como o Vietnã, segundo maior produtor e exportador mundial. A acirrada concorrência internacional e o fato do café exportado em grãos ter características de *commodity* (produto vendido a granel, sem diferenciação de marca, origem ou qualidade decorrentes de uma procedência determinada ou de produtor distinto), exigem o desenvolvimento de estratégias comerciais e mercadológicas para diferenciar o produto brasileiro. O café é o primeiro produto em importância no mercado de *commodities* (Berbert *et al.*, 2001).

Ferrugem do cafeeiro

Dentre as doenças que ocorrem no cafeeiro, a ferrugem é uma das mais importantes, podendo causar prejuízos de 35 a 50% para a cafeicultura (Zambolim *et al.*, 2002). A ferrugem alaranjada, descrita no Sri Lanka em 1868 por Berkeley, tem como agente causal o fungo *H. vastatrix* Berk & Br. Esta doença tem sido o principal problema da cultura do café em todas as regiões do mundo onde é cultivado. No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez na Bahia em 1970, espalhando-se rapidamente para a América Central em 1976 e para a Colômbia em 1983 (Carvalho *et al.*, 1989).

O fungo *H. vastatrix* pertence à ordem Uredinales, família Pucciniaceae, classe Basidiomycetes. Este fungo biotrófico apresenta ciclo de vida incompleto pois até o momento, as fases de picnio e écio são desconhecidas. O fungo produz dois tipos de esporos morfologicamente

diferentes e com função distinta. O primeiro, mais comum, é chamado uredosporo ou urediniosporo. Em condições normais, os uredosporos permanecem unidos por uma mucilagem e, em contato com a água, libertam-se com facilidade. O segundo tipo é o teliosporo, formado eventualmente em lesões velhas. A fonte de inóculo é constituída pelas lesões em folhas infectadas onde são produzidos os uredosporos. Cada pústula produz ao redor de 150.000 uredosporos que podem sobreviver sob condições secas por um período de seis semanas. O período de produção de uredosporos em uma mesma lesão pode ser superior a três meses. Assim, uma lesão produzida numa estação vegetativa pode servir de fonte de inóculo para o início da estação vegetativa seguinte. A disseminação ocorre pela ação do vento, pelas gotas de chuva, pelo homem, durante a execução de tratamentos culturais, por insetos e animais que entram em contato com plantas infectadas (Moraes, 1983). Depois de disseminados, os uredosporos que caem na face inferior das folhas germinam em um período de 6 a 8 horas em condições de alta umidade e temperatura entre 21 a 25°C (Martins, 1988). Os sintomas iniciais surgem entre 7 a 15 dias após a penetração, variando em função da temperatura, suscetibilidade da planta e idade do órgão afetado.

A ferrugem do cafeeiro é uma doença foliar que, inicialmente causa manchas cloróticas translúcidas com 1-3 mm de diâmetro, observadas na face abaxial do limbo foliar. Em poucos dias, essas manchas crescem, atingindo 1-2 cm de diâmetro. Na face abaxial, desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração alaranjada formadas por uredosporos do patógeno. Ocasionalmente, o fungo pode atacar a extremidade do ramo em desenvolvimento e frutos verdes (Godoy *et al.*, 1997). Na plantação, o sintoma mais evidente é a desfolha das plantas. A desfolha ocorrida antes do florescimento interfere no desenvolvimento dos botões florais e na frutificação. A perda das folhas durante o desenvolvimento dos frutos leva à formação de grãos anormais e frutos com lojas vazias, afetando sensivelmente a produção (Matiello *et al.*, 2002).

O controle químico da ferrugem tem se mostrado eficaz através da utilização de fungicidas protetores cúpricos ou fungicidas sistêmicos do grupo dos triazóis (Matiello *et al.*, 2002; Zambolim *et al.*, 2002), porém a melhor alternativa de controle é o desenvolvimento de cultivares portadores de resistência genética, visando a eliminação total ou parcial do controle químico (Fazuoli *et al.*, 2002). Além da alternativa genética, destacam-se estratégias de cultivo para que haja a diminuição da quantidade de inóculo do fungo dentro da lavoura.

Existem mais de quarenta raças fisiológicas de *H. vastatrix* que atacam os cafeeiros, sendo que no Brasil são encontradas cerca de oito raças virulentas. Entre estas, a raça II predomina nos cafeeiros brasileiros. A raça II é geralmente a primeira a aparecer e representa 58% de todos os isolados testados para virulência em 32 países, seguido pela raça I (14%), raça III (9%) e raça XV (4%) (Van Der Vossen, 2001).

Flor & Comstock (1971) demonstraram que em algumas interações, hospedeiro e patógeno possuem genes complementares, de modo que um alelo de resistência do hospedeiro só vai ser expresso se no patógeno existir um alelo de avirulência. Em contrapartida, um alelo de virulência só vai ser expresso se no hospedeiro houver um alelo de suscetibilidade. A resistência vertical (o hospedeiro resiste somente a algumas raças do patógeno) é a melhor evidência de um sistema gene para gene em ação. Na interação ferrugem-cafeeiro, o mesmo cultivar pode ser resistente a algumas raças do fungo e suscetível a outras. A resistência na planta é controlada por um gene *R* (gene de resistência), o qual corresponde a um gene *avr* (gene de avirulência) no patógeno. O produto da interação dos genes *avr* e *R* resultam na ativação da indução da resposta de defesa, numa clássica interação gene-a-gene (De Wit, 1992).

Estudos citológicos e bioquímicos demonstraram que alguns cultivares de café apresentam uma reação de hipersensibilidade (HR) a algumas raças de *H. vastarix*. A reação de hipersensibilidade é uma forma extrema de sensibilidade da planta ao fungo, de modo que um contato com este resulta na morte repentina de células ao redor do local de infecção, culminando na parada do crescimento e do desenvolvimento do patógeno. Portanto a reação de hipersensibilidade é considerada como uma resposta de resistência, uma vez que há maior produção de calose, deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular na célula infectada, o que limita o crescimento do haustório (Silva *et al.*, 2002).

A produção de variedades resistentes foi alcançada por meio de hibridação interespecífica (*C. canephora* x *C. arabica*), tendo como exemplo o cultivar Icatu, que tem apresentado boas características de resistência à ferrugem e vigor elevado (Godoy *et al.*, 1997). O cultivar Icatu Vermelho é derivado do cruzamento entre as espécies *C. arabica* cultivar Bourbon Vermelho e *C. canephora* cultivar Robusta, com dois retrocruzamentos com *C. arabica* cultivar Mundo Novo (Fazuoli, 1991). Cultivares como o Catucaí, resultante do cruzamento natural entre Catuaí e Icatu e o Catimor, resultante do cruzamento entre o Caturra Vermelho e o Híbrido de Timor, têm

apresentado também boa resistência à ferrugem (Godoy *et al.*, 1997). A maioria dos cultivares de *C. arabica* é aparentada e caracterizada por baixa diversidade genética em função do reduzido número de plantas que deu origem ao cultivo no Brasil e aos métodos de melhoramento empregados, especialmente o genealógico. Assim, a transferência de genes de resistência de espécies diplóides para *C. arabica* (tetraplóide) tem sido uma constante nos programas de melhoramento (Anthony *et al.*, 2002).

A resistência à ferrugem é condicionada primariamente por um número de genes principais (genes S_H) e os genótipos de cafeeiro são classificados em grupos de resistência de acordo com sua interação com raças fisiológicas do patógeno (Van Der Vossen, 2001). Nove genes de resistência (S_{H1} a S_{H9}) foram identificados, S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} em *C. arabica*, S_{H3} é provavelmente originário de *C. liberica* e S_{H6} a S_{H9} em *C. canephora*. Dois fatores de resistência monogênicos que parecem diferir de S_{H1} a S_{H9} , foram detectados no Brasil, um em *C. canephora* cultivar Kouilou e um em Icatu (Kushalappa & Eskes, 1989). Guzzo *et al.* (2002) isolaram, através de hibridização subtrativa, genes com funções relacionadas à defesa a ferrugem no cultivar Mundo Novo, após tratamento com o indutor de resistência BTH (acibenzolar-S-methyl). Foram identificados genes envolvidos na produção de espécies oxigênio reativas (ROS), genes envolvidos na resposta de hipersensibilidade e estresse, genes antimicrobianos (gene para quitinase e para β -1,3-glucanase) e genes envolvidos na síntese de fitoalexina, compostos fenólicos e lignina, entre outros.

Interações entre patógeno e hospedeiro

A ação predatória de insetos, parasitária de nematóides e as infecções causadas por microrganismos patogênicos (vírus, fungos, bactérias), são exemplos de fatores de origem biológica que desencadeiam alterações fisiológicas nas células vegetais (Dangl, 1998). As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas, devido ao estresse causado por patógenos, têm sido intensamente estudadas com o objetivo de se obter variedades resistentes (Cordeiro *et al.*, 2000). Assim sendo, um dos objetivos do estudo da interação planta-patógeno visa à compreensão do mecanismo específico de reconhecimento genético entre a planta e o patógeno e suas conseqüências (Dangl, 1995).

A resistência de plantas contra doenças está associada a um conjunto de respostas de defesa ativadas pelo hospedeiro após o contato com agentes patogênicos. A ativação dessas respostas em plantas depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença de patógenos através de mecanismos de percepção e transdução de sinais, que envolvem alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas. Como consequência desse processo, ocorre a ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal, com a expressão subsequente de genes de defesa. A resistência é frequentemente manifestada como uma resposta de hipersensibilidade, que resulta na morte celular no local de penetração do patógeno. Outras respostas de resistência podem incluir alterações estruturais, síntese de metabólitos secundários e a produção de uma ampla variedade de moléculas de defesa, tais como proteínas antimicrobianas (Schenk *et al.*, 2000). Tem sido associado à expressão de resistência do cafeeiro à *H. vastatrix* o aumento da atividade de enzimas como lipoxigenase (Rojas *et al.*, 1993), peroxidase (Silva *et al.*, 2000), fenilalanina amônia liase (Silva *et al.*, 2002), quitinases e β -1,3-glucanases (Maxemiuc-Naccache *et al.*, 1992; Guzzo & Martins, 1996).

A interação entre a planta e o patógeno pode ser dividida em dois tipos básicos: a interação compatível e a incompatível. Na interação compatível o patógeno invade o tecido vegetal, multiplica-se e provoca doença na planta. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, encontra as defesas da planta. Estas são rapidamente ativadas, impedindo a multiplicação do patógeno e produzindo resistência. Primeiramente ocorre o reconhecimento genético entre a planta e o patógeno, a segunda fase é um processo de transdução de sinal e a terceira, uma ativação de genes de resistência. Os mecanismos de resistência relacionados com a interação incompatível envolvem dois processos: resposta de hipersensibilidade (HR) e resistência sistêmica adquirida (SAR – “Systemic Acquired Resistance”). A primeira é uma resposta rápida induzida no vegetal e leva à morte de células ao redor do local de infecção do patógeno. Desta maneira, acredita-se que a planta impede a multiplicação do patógeno nas células infestadas, limitando e interrompendo o processo da disseminação da infecção. A segunda, é uma resposta que consiste na produção de um estado de imunização temporária da planta a uma subsequente infecção patogênica. Esta resistência está relacionada com uma ativação coordenada de genes de defesa em sítios distantes do local da

infecção. Durante a reação de hipersensibilidade, alguns genes são ativados, havendo o estabelecimento de um meio altamente anti-microbiano ao redor de células infectadas (Sticher *et al.*, 1997; Hammerschmidt *et al.*, 2001). Genes de defesa contra diferentes patógenos têm sido associados com a reação de hipersensibilidade, incluindo os genes envolvidos na biossíntese de fitoalexinas, produção de proteínas relacionadas com a patogênese e deposição de lignina (Snyder & Nicholson, 1990). Alguns genes de resistência codificam para proteínas receptoras que se ligam à membrana plasmática. Estas proteínas são responsáveis pela especificidade do mecanismo de reconhecimento entre a planta e o patógeno, gerando a transdução de sinal inicial e induzindo a resposta de defesa e resistência (Cordeiro *et al.*, 2000).

O isolamento de novos genes, envolvidos na resistência a patógenos e pragas é um desafio que abre novas perspectivas na obtenção de plantas resistentes. Muitos grupos de pesquisa, através de diferentes estratégias, vêm atuando com este objetivo. Técnicas como hibridização diferencial, hibridização subtrativa, *display* diferencial de mRNA, clonagem de genes via PCR (RT-PCR e RACE-PCR), clonagem baseada em perda de função por inserção (*transposon tagging*) e *chromosome walking*, entre outras, têm sido utilizadas na identificação de genes de resistência (Cordeiro *et al.*, 2000).

DRIFTS

A técnica de DRIFTS (*diffuse reflectance infrared Fourier transform spectrometry* ou espectroscopia no infravermelho por refletância difusa com transformada de Fourier) detecta transições entre diferentes níveis de energia vibracional. Quase todos os compostos que têm ligações covalentes absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho, mas para propósitos químicos, só interessa a porção vibracional do espectro infravermelho, a qual inclui radiações com comprimento de onda entre 2,5 a 25 μm (ou número de onda entre 4000 a 400 cm^{-1}). Uma determinada molécula absorve somente algumas frequências de radiação infravermelha, a qual causa estiramento e deformação das ligações (Pavia *et al.*, 1996) assim, tanto o comprimento das ligações quanto os ângulos podem sofrer alterações (Atkins, 1999). Os espectrômetros modernos, especialmente os que operam no infravermelho, adotam quase sempre as técnicas de transformada de Fourier para a detecção e análise da

radiação espectral. Para isso, os aparelhos contêm o interferômetro de Michelson, um dispositivo que analisa as frequências presentes em um sinal composto (Atkins, 1999). A principal vantagem de equipamentos com transformada de Fourier é o aumento da sensibilidade e velocidade na aquisição do espectro (Downey, 1998).

Os materiais biológicos são problemáticos para a obtenção de espectro na região do infravermelho médio, pois geralmente são opacos e têm significativa quantidade de água. Uma alternativa é o uso de acessórios que permitem espectros de reflectância difusa (DRIFTS), fotoacústica (PAS) e reflexão total atenuada (ATR), os quais facilitam a análise desses materiais (Downey, 1998). A reflectância difusa (DRIFTS) pode ser obtida de amostras sólidas sem qualquer preparação prévia e permite determinações diretas de espectrometria de infravermelho (Monsoor *et al.*, 2001; Souillac *et al.*, 2002). Os grupos funcionais de moléculas absorvem em uma região entre 5000 e 1500 cm^{-1} ; ligações duplas e triplas apresentam números de onda mais altos do que ligações simples. A região entre 1700 e 1000 cm^{-1} (*fingerprint region*) é significativa para deformação, dobramento e vibrações de ligações químicas e pode ser específica para uma determinada substância (Schmitt & Flemming, 1998; Johnson *et al.*, 2003). O *fingerprint* metabólico pode detectar se mudanças estão ocorrendo em resposta a um determinado fator (Gidman *et al.*, 2003) e envolve a obtenção de informação suficiente para elucidar alterações metabólicas, sem contudo detalhar vias bioquímicas (Fiehn, 2001; Gidman *et al.*, 2003).

A técnica de infravermelho tem sido bem sucedida na diferenciação de compostos químicos originados em resposta a estresse salino em *Arabidopsis thaliana* (Yang & Yen, 2002) e tomate (Johnson *et al.*, 2003); estresse por metal (Kamnev *et al.*, 2002); interferência planta-planta (Gidman *et al.*, 2003); polissacarídeos da parede celular de plantas sob estresse hídrico e mecânico (Wilson *et al.*, 2000); infecção de *Fusarium* em milho (Kos *et al.*, 2003) e qualidade de fermentação de silagem (Johnson *et al.*, 2004).

Nesse trabalho espera-se a expressão diferencial de genes envolvidos na defesa ou resistência do cultivar Icatu Vermelho – IAC 4045 à raça II de *H. vastatrix* e diferenças na detecção de alterações metabólicas entre os cultivares Icatu Vermelho (IAC 4045), resistente à raça II de *H. vastatrix* e Mundo Novo (IAC 501), suscetível à ferrugem, em quais compostos químicos essas alterações serão detectadas e se esses compostos podem ser relacionados à resistência dessas plantas ao patógeno.

OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização de genes expressos diferencialmente e a análise de alterações metabólicas em folhas de cafeeiro cultivar Icatu Vermelho – IAC 4045 (resistente) e Mundo Novo – IAC 501 (suscetível) inoculadas com *H. vastatrix* (raça II).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Coleta de uredosporos de *H. vastatrix*

Uredosporos de *H. vastatrix* (raça II) foram coletados de folhas de cafeeiro suscetíveis, pertencentes ao banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas.

2. Coleta de folhas de cafeeiro

Nos experimentos foi utilizado o cultivar Icatu Vermelho (IAC 4045) de *C. arabica*. Esse cultivar é derivado de um cruzamento interespecífico de *C. arabica* cultivar Bourbon Vermelho ($2n = 4x = 44$) e *C. canephora* cultivar Robusta ($2n = 2x = 22$) realizado pelo Programa de Melhoramento do Centro de Café do Instituto Agronômico de Campinas e faz parte do Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea*, mantido pelo Instituto Agronômico.

Foram coletadas folhas totalmente expandidas do segundo par de folhas, contadas a partir do ápice. Após a coleta, as folhas foram mantidas em caixas contendo espuma saturada em água, à temperatura de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

3. Inoculação de folhas de cafeeiro com uredosporos de *H. vastatrix*

Os uredosporos do fungo foram pesados e ressuspensos em água destilada, para uma concentração final de 1,2 mg.ml⁻¹. A inoculação foi feita em uma das metades da folha (metades separadas pela nervura central). A suspensão de uredosporos foi pincelada sobre metade da superfície abaxial de folhas destacadas das plantas. As folhas foram mantidas em caixas contendo espuma embebida em água. As caixas foram fechadas com placas de vidro e mantidas no escuro até o terceiro dia após a inoculação, quando foram então mantidas sob fotoperíodo de 12 horas luz/escuro. Folhas individuais foram retiradas das caixas nos intervalos de tempo de 1 hora e 24 horas após a inoculação. As folhas foram lavadas com álcool 70% e água destilada e estéril. As folhas foram cortadas ao meio para separar as

metades inoculada e não inoculada. Cada metade foi acondicionada separadamente e imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até o isolamento do RNA.

4. Isolamento de RNA e tratamento com DNase

O RNA foi isolado segundo metodologia descrita por Precott & Martin (1987) com algumas modificações. Para o isolamento de RNA, o tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 20 mM pH 8,0, β -mercaptoetanol 50 mM, PVP (2%) e Guanidina-HCl 8,0 M. A seguir, foi realizada extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) e outra com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). O RNA foi precipitado com 0,2 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2,0 volumes de etanol absoluto a -80°C por 2 horas. Após centrifugação (10.000 rpm), foi removido o sobrenadante e o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em água DEPC.

O RNA foi tratado com DNase através da adição de 0,5 μL de RNA *guard* (37,8 U/ μL , Amersham Biosciences), 5 μL de MgCl_2 15 mM, 1 μL de DNase (10 U/ μL), H_2O q.s.p. 100 μL . A reação foi mantida a 37°C por 1 hora. Foram adicionados 100 μL de água e então, realizada uma extração com fenol: clorofórmio (3:1, v/v). O RNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto. Após centrifugação (10.000 rpm), o RNA foi ressuscitado em água DEPC e quantificado em gel de agarose 1%. A concentração foi ajustada para 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5. Display diferencial de mRNA

RNA foi isolado das amostras A, B, C, D, H, I, J (tabela 1). A partir desses RNAs foram sintetizados cDNAs com os *primers* ancoradores T_{12}VC e T_{12}VG (onde o V pode ser A, C ou G).

Tabela 1. Designação dos tratamentos representados por diferentes intervalos de amostragem após a inoculação de folhas do cultivar Icatu Vermelho com *H. vastatrix*.

A	Folha controle, destacada da planta e imediatamente congelada em nitrogênio líquido (momento zero).
B	Folha controle, mantida por 1 hora em espuma embebida em água e congelada em nitrogênio líquido após esse período.
C	Metade da folha inoculada e mantida por 1 hora em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
D	Metade não inoculada da folha e mantida por 1 hora em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
H	Folha controle, mantida por 24 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após este período.
I	Metade da folha inoculada e mantida por 24 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após este período.
J	Metade não inoculada da folha e mantida por 24 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após este período.

6. Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit *ready-to-go* RT-PCR *beads* (Amersham Biosciences). Para isso, foram adicionados a cada *bead* 44 μL de água DEPC. Após 5 minutos de incubação no gelo foram adicionados 1 μL de RNA ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) e 5 μL do *primer* T₁₂VC ou T₁₂VG (10 μM). A reação foi incubada a 42°C por 30 minutos. A transcriptase reversa foi inativada a 95°C por 5 minutos. As reações foram armazenadas a -20°C.

7. PCR a partir do cDNA e eletroforese das amostras amplificadas

Os *primers* ancoradores (T₁₂VC e T₁₂VG) e o *primer* arbitrário OPL-19 (GAGTGGTGAC - Operon Technologies Inc.) foram utilizados nas ampliações dos cDNAs em um termociclador (Perkin Elmer 2400 ou MJ Research PTC 100). As reações, feitas em duplicata, foram compostas por 2 μL do cDNA, 2 μL do *primer* ancorador (10 μM), 2 μL do *primer* arbitrário (10 μM), 0,5 μL de [α -³³P] dATP e 14 μL da mistura: 2 μL de tampão de amplificação 10x (Invitrogen), 0,5 μL de MgCl₂ 50 mM, 2 μL de dNTP (20 μM de cada um), 8,7

μL de água e 0,3 μL de *Taq* polimerase (5 U/ μL , Invitrogen). As condições de amplificação foram: 94°C (3 minutos), seguido de 40 ciclos de 94°C (30 segundos), 40°C (2 minutos) e 72°C (30 segundos). A extensão final foi de 72°C por 30 minutos.

Após a amplificação, 7 μL do produto de cada reação de PCR foram misturados com 5 μL do tampão: formamida deionizada 95% (v/v), EDTA 10 mM, pH 8,0, xileno cianol 0,09% e azul de bromofenol 0,09% (Xu *et al.*, 1997). As amostras foram incubadas a 80°C por 4 minutos e 12 μL foram aplicados no gel denaturante de acrilamida (6%). A corrida foi a 1320 V por aproximadamente 4 horas e 30 minutos. Após a corrida, o gel foi transferido para papel Whatman 3 MM e seco a vácuo. Os produtos de amplificação foram visualizados através de exposição a filme de raio-X (Hyperfilm, Amersham Biosciences).

8. Isolamento, eluição e reamplificação das bandas diferenciais

Após ser revelado, o filme de raio-X foi posicionado sobre o gel, na mesma posição em que foi exposto e as bandas diferenciais foram cortadas do gel. O DNA das bandas diferenciais foi eluído em 200 μL de água por 15 minutos a 95°C. A seguir, o DNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto, durante a noite a -20°C. Após centrifugação, o DNA foi ressuscitado em 10 μL de água.

O DNA eluído (4,0 μL) foi amplificado novamente. Para isso, foram adicionados: Tris-HCl 2 mM, pH 8,3, KCl 5 mM, MgCl₂ 4 mM, 1 μM do *primer* arbitrário OPL-19, 1 μM do *primer* ancorador T₁₂VC ou T₁₂VG; 0,8 μL de dNTP (20 μM de cada um) e 2,5 U de *Taq* polimerase (Invitrogen). O volume final da reação foi de 40 μL . As condições de amplificação foram as mesmas do item 7. O produto das reações de amplificação foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook *et al.*, 1989).

9. Clonagem dos cDNAs

9.1. Reação de ligação

A clonagem dos cDNAs foi realizada com auxílio do Kit pGEM-T *Easy* (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. Foi utilizado 3 μL de inserto, 5 μL de tampão de ligação 10X, 1 μL de vetor pGEM-T e 1 μL de enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada durante 3 horas a 25°C, ou durante a noite a 4°C.

9.2. Transformação bacteriana

A reação de ligação foi misturada com 100 μL de células competentes (DH5 α) em fluxo laminar. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e em seguida a 42°C por 90 segundos. Após esse período, as amostras foram incubadas em gelo durante 5 minutos. Foram adicionados 700 μL de meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) e a reação foi incubada a 37°C durante 1 hora. As amostras foram plaqueadas em meio LB sólido contendo X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 0,8 mg/placa) e ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas foram mantidas a 37°C durante a noite.

As colônias brancas foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para todas as colônias isoladas foi feita cultura permanente (750 μL de inóculo e 250 μL de glicerol estéril). As culturas permanentes foram armazenadas a -80°C.

9.3. Isolamento de DNA plasmidial

Para isolamento de DNA plasmidial, as colônias foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina e incubadas a 37°C durante a noite. As culturas foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas durante 2 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 μL de solução P1 (Tris-HCl 25mM, pH 7,4, EDTA 10 mM, pH 8,0 e Glicose (glicose 50 mM). A seguir foram adicionados 200 μL de

solução P2 (NaOH 0,2 M e SDS 1 %). As amostras foram agitadas por inversão e 150 µL de solução P3 (acetato de potássio 3 M pH 5,2) foram adicionados. As amostras foram centrifugadas durante 3 minutos e o sobrenadante (400 µL) foi transferido para um tubo novo, onde foram adicionados 720 µL de etanol absoluto. Após incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos, as amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o DNA plasmidial foi lavado com etanol 70% (800 µL). O DNA foi ressuspensionado em 40 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 mM pH 8,0) contendo 4 µL de RNase (10mg/mL).

O DNA plasmidial foi digerido com *EcoRI*. A reação de digestão foi incubada por 2 horas a 37°C. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). Três clones de cada fragmento foram selecionados para seqüenciamento. O DNA plasmidial desses clones foi isolado com o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), de acordo com instruções do fabricante.

10. Seqüenciamento

Nas reações de seqüenciamento foi utilizado o kit DNA *Sequencing Big Dye*TM (Applied Biosystems). As reações foram constituídas por 400 ng de DNA, 1 µL de *primer* (5 µM direto ou reverso) e 2 µL de *mix Big Dye*. Para as amplificações foram realizados 25 ciclos de 95°C (10 segundos), 50°C (5 segundos) e 60°C (4 minutos). Após a amplificação, o DNA foi precipitado com 80 µL de isopropanol 75%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente. Foram adicionados 180 µL de etanol 70% e após centrifugação o sobrenadante foi descartado e 180 µL de etanol absoluto foram adicionados. Após centrifugação por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente. O DNA foi mantido a -20°C até o momento do seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático ABI PRISMTM 377 (Applied Biosystems).

11. Análise das seqüências

O alinhamento das seqüências foi feito através do serviço BCM *Search Launcher* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) no sub-programa Clustal W (v. 1.82). As seqüências foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do Genoma Café e NCBI (Nacional Center of Biotechnology Information), utilizando o serviço BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/BLAST/) no sub-programa BLASTX (v. 2.2.6).

12. Confirmação da expressão dos cDNAs por PCR em tempo real

12.1. Coleta de folhas de cafeeiro

A coleta das folhas foi realizada como descrito no item 1, apenas com a diferença de que foram utilizadas cinco folhas de diferentes plantas para cada intervalo de tempo (1 hora e 24 horas).

12.2. Inoculação de folhas de cafeeiro com uredosporos de *H. vastatrix*

A inoculação das folhas foi feita como descrito no item 2. Após congelamento em nitrogênio líquido, as folhas foram maceradas até a obtenção de um pó fino, o qual foi liofilizado. O pó obtido das folhas foi armazenado a -20°C.

12.3. Isolamento do RNA e tratamento com DNase

Foi feita uma mistura do pó liofilizado de diferentes folhas para obtenção de uma amostra representativa de cinco repetições. A metodologia utilizada para o isolamento de RNA foi a mesma descrita no item 5 com a diferença de que foram utilizados 40 mg de pó de folhas liofilizadas.

12.4. Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit ThermoScript RT-PCR Systems (Invitrogen). Para isso, foram adicionados 500 ng de RNA tratado com DNase, 1 µL de oligo-dT, 2 µL de dNTP mix (10 mM) e água q.s.p. 12 µL. A mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e colocada logo em seguida em gelo. Foram acrescentados à mistura: 4 µL de tampão de reação (5X), 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de RNase OUT (40 U/µL), 1 µL de água tratada com DEPC e 1 µL de ThermoScript RT (15 U/µL). A mistura foi incubada a 50°C por 60 minutos. A transcriptase reversa foi inativada a 85°C por 5 minutos. Foi adicionado 1 µL de RNase H e incubado a 37°C por 20 minutos. As reações foram armazenadas a -20°C.

12.5. PCR em tempo real

Os cDNAs obtidos a partir de *Display* diferencial de mRNA tiveram a expressão diferencial confirmada por PCR em tempo real. Para isso, *primers* específicos foram desenhados a partir da sequência de cada cDNA com o auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Esses *primers* são mostrados na tabela 2. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno.

Tabela 2. Sequências dos *primers* usados em PCR em tempo real.

cDNA	<i>Primer direto (5'-3')</i>	<i>Primer reverso (5'-3')</i>
Controle	5' AAAGATGGCAGATGGTGAGG3'	5' ACAATGCTTGGGAAAACAGC3'
GC2	5' GACGTTGCTGTGTGGAAAGA3'	5' ATGCTAAAAGCATCCCAAGC3'
GD3	5' TCCATAACCGAATTCCAACC3'	5' GAAAGGCGAGGGTAGGTTA3'
GD4	5' GCCCCTGTAATCCATGTGAC3'	5' CATGACACAAGCTGAAAACG3'
GH1X	5' TTTTGTGACGAGTCGATGGTG3'	5' CGACCATGCTATTGCTCTCA3'
GH4	5' CTCCAACGCCACAATGTTTA3'	5' AAGACCCTAAGCCATGCAA3'
GI1	5' TGAGCTTGATGGAAGGAGGT3'	5' ATGGCCATCACGTTGAAGTT3'
GI2	5' CAAAACTGATGGCAGACA3'	5' TGGCCTTCAGGATTATTGCG3'
GI6	5' TTCTCGCAAGCCTTTTTGTT3'	5' TGATCTTTCGTTCTGCAGCTT3'
GI9	5' GGTGGGGATGATTTTTAGG3'	5' TGCAAGCTCCTAAGTTGACG3'
CI4	5' ATTTGGCTATGCTGGTTTGG3'	5' TGCATGAAAACATGGTCAAAG3'

A reação de PCR em tempo real foi realizada em um iCycler IQ™ (Bio-Rad) e o C_t (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do *Real-Time Detection System Software*, versão 3.0 (Bio-Rad). O C_t de uma reação é determinado, principalmente, pela quantidade de cDNA molde presente no começo da reação de amplificação.

Para um volume final de 50 μ L a reação foi preparada como descrito a seguir: 25 μ L de *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 10 μ M de cada *primer* e 10 μ L de cDNA total (100 ng). A amplificação foi feita como descrito a seguir: 2 minutos a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 59°C por 15 segundos, e uma extensão a 72°C por 30 segundos, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 segundos, iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado.

Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t foi usada para avaliação da expressão gênica. A expressão dos genes analisados foi normalizada de acordo com a expressão do gene da actina. A expressão gênica foi calculada utilizando a fórmula $2^{(Rt-Et)}/2^{(Rn-En)}$ (Livak & Schmittgen, 2001), onde Rt é o número de ciclos do gene de referência, observado em *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho, Et é o número de ciclos dos genes estudados, Rn é o número de ciclos do gene de referência observado na condição padrão, En é o número de ciclos dos genes experimentais observado em condição padrão.

13. DRIFTS

A coleta de uredosporos de *H. vastatrix* e a coleta de folhas de cafeeiro foram feitas como descrito nos itens 1 e 2, respectivamente. Nos experimentos foram utilizados os cultivares Icatu Vermelho - IAC 4045, resistente à raça II de *H. vastatrix* e Mundo Novo IAC - 501, suscetível à ferrugem.

A inoculação de folhas de cafeeiro com uredosporos de *H. vastatrix* foi feita como descrito no item 3. Folhas individuais foram retiradas das caixas nos períodos de 1, 24, 48, 96 e

168 horas após a inoculação (tabela 3). Foram usadas cinco folhas para cada intervalo de tempo. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, o qual foi liofilizado antes da obtenção do espectro de reflectância difusa na região do infravermelho médio.

Tabela 3. Designação dos tratamentos representados por diferentes intervalos de amostragem após a inoculação de folhas do cultivar Icatu Vermelho e Mundo Novo com *H. vastatrix*.

Folha controle, destacada da planta e imediatamente congelada em nitrogênio líquido (momento zero).
Folha controle, mantida por 1 hora em espuma embebida em água e congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha inoculada e mantida por 1 hora em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha não inoculada e mantida por 1 hora em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Folha controle, mantida por 24 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha inoculada e mantida por 24 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha não inoculada e mantida por 24 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Folha controle, mantida por 48 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha inoculada e mantida por 48 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha não inoculada e mantida por 48 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Folha controle, mantida por 96 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha inoculada e mantida por 96 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha não inoculada e mantida por 96 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Folha controle, mantida por 168 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha inoculada e mantida por 168 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.
Metade da folha não inoculada e mantida por 168 horas em espuma embebida em água, congelada em nitrogênio líquido após esse período.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos foram arranjos de modo fatorial 2 x 5 x 3 (dois cultivares, cinco períodos de tempo após a inoculação e três formas de inoculação (folha controle - ausência de inóculo e folha inoculada - metade da folha que recebeu o inóculo e metade da folha que não recebeu inóculo), conforme o seguinte modelo matemático: $Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{(ij)} + \alpha\gamma_{(ik)} + \beta\gamma_{(jk)} + \alpha\beta\gamma_{(ijk)} + e_{ijkl}$; sendo:

Y_{ijk} = Resposta do $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator cultivar (α), do $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator horas após a inoculação com o fungo (β), do $k^{\text{ésimo}}$ nível do fator presença do inóculo (γ), na $l^{\text{ésima}}$ repetição

μ = média do experimento

α_i = $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator cultivar (α)

β_j = $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator horas após a inoculação com o fungo (β)

γ_k = $k^{\text{ésimo}}$ nível do fator presença ou ausência do inóculo (γ)

$\alpha\beta_{(ij)}$ = efeito da interação entre o $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator cultivar (α) e o $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator horas após a inoculação com o fungo (β)

$\alpha\gamma_{(ik)}$ = efeito da interação entre o $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator cultivar (α) e o $k^{\text{ésimo}}$ nível do fator presença ou ausência do inóculo (γ)

$\beta\gamma_{(jk)}$ = efeito da interação entre o $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator horas após a inoculação com o fungo (β) e o $k^{\text{ésimo}}$ nível do fator presença ou ausência do inóculo (γ)

$\alpha\beta\gamma_{(ijk)}$ = efeito da interação entre o $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator cultivar (α), o $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator horas após a inoculação com o fungo (β) e o $k^{\text{ésimo}}$ nível do fator presença ou ausência do inóculo (γ)

e_{ijk} = efeito do erro na unidade experimental envolvendo o $i^{\text{ésimo}}$ nível do fator cultivar (α), o $j^{\text{ésimo}}$ nível do fator horas após a inoculação com o fungo (β) e o $k^{\text{ésimo}}$ nível do fator presença ou ausência do inóculo (γ)

13.1. Determinação da reflexão do espectro na região do infravermelho médio

O espectro foi obtido no Laboratório de Quimiometria em Química Analítica do Instituto de Química (UNICAMP). O aparelho utilizado foi um espectrômetro com transformada

de Fourier (ABB Bomem). O pó liofilizado das folhas foi colocado em poços em uma placa de alumínio para a obtenção do espectro de reflectância difusa na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFTS). Os espectros foram coletados entre os números de onda de 4000 a 650 cm^{-1} com a resolução de 8 cm^{-1} e 64 varreduras. Uma placa de alumínio foi usada como referência de reflectância. A determinação da reflectância do espectro foi feita em triplicata. O espectrômetro foi acoplado a um computador contendo o programa “IR Data Manager Program”. Os dados foram importados para o *software* Matlab (versão 6.5), o qual foi usado para o pré-tratamento com o MSC (*multiplicative scatter correction*).

13.2. Análise dos dados

Foi realizada análise de componentes principais e do efeito das interações entre cultivares, período de tempo após a inoculação de folhas com o fungo e presença ou ausência de inoculo. No estudo das interações significativas a 5% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. O *software* Statistica (versão 6.0) foi utilizado nas análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação de cDNAs expressos diferencialmente em folhas de cafeeiro inoculadas com *H. vastatrix*

A técnica de *display* diferencial de mRNA (Liang & Pardee, 1992) tem sido utilizada em plantas na identificação de genes expressos diferencialmente em resposta a estresse biótico e abiótico (Takemoto *et al.*, 2000; Collinge & Boller, 2001; Dunaeva & Adamska, 2001; Kim *et al.*, 2002, Evers *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2003; Bochu *et al.*, 2005). Nesse trabalho, a técnica de *display* diferencial de mRNA foi utilizada com o objetivo de isolar cDNAs com expressão diferencial em *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho inoculado com o fungo *H. vastatrix*. Para a realização dos experimentos foram utilizados os *primers* ancoradores T₁₂VC e T₁₂VG em combinação com o *primer* arbitrário OPL19 (Operon Technologies Inc.).

A comparação entre os padrões de cDNAs nos géis permitiu o isolamento de cDNAs com expressão diferencial nos intervalos de 1 hora e 24 horas após a inoculação com o fungo. Os cDNAs foram então clonados e seqüenciados e dezesseis deles apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados. São eles: GC2, GC3, GD1, GD3, GD4 (isolados no intervalo de 1 hora após a inoculação) e GH1X, GH4, GI1, GI2, GI3, GI4, GI5, GI6, GI9, CI4, CI6 (isolados no intervalo de 24 horas após a inoculação). O padrão de expressão desses cDNAs é mostrado na figura 1, onde a localização de cada um deles está indicada por seta. A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para a confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados. Oito cDNAs tiveram a expressão diferencial confirmada, são eles: GC2, GD3, GH1X, GH4, GI1, GI2, GI9 e CI4.

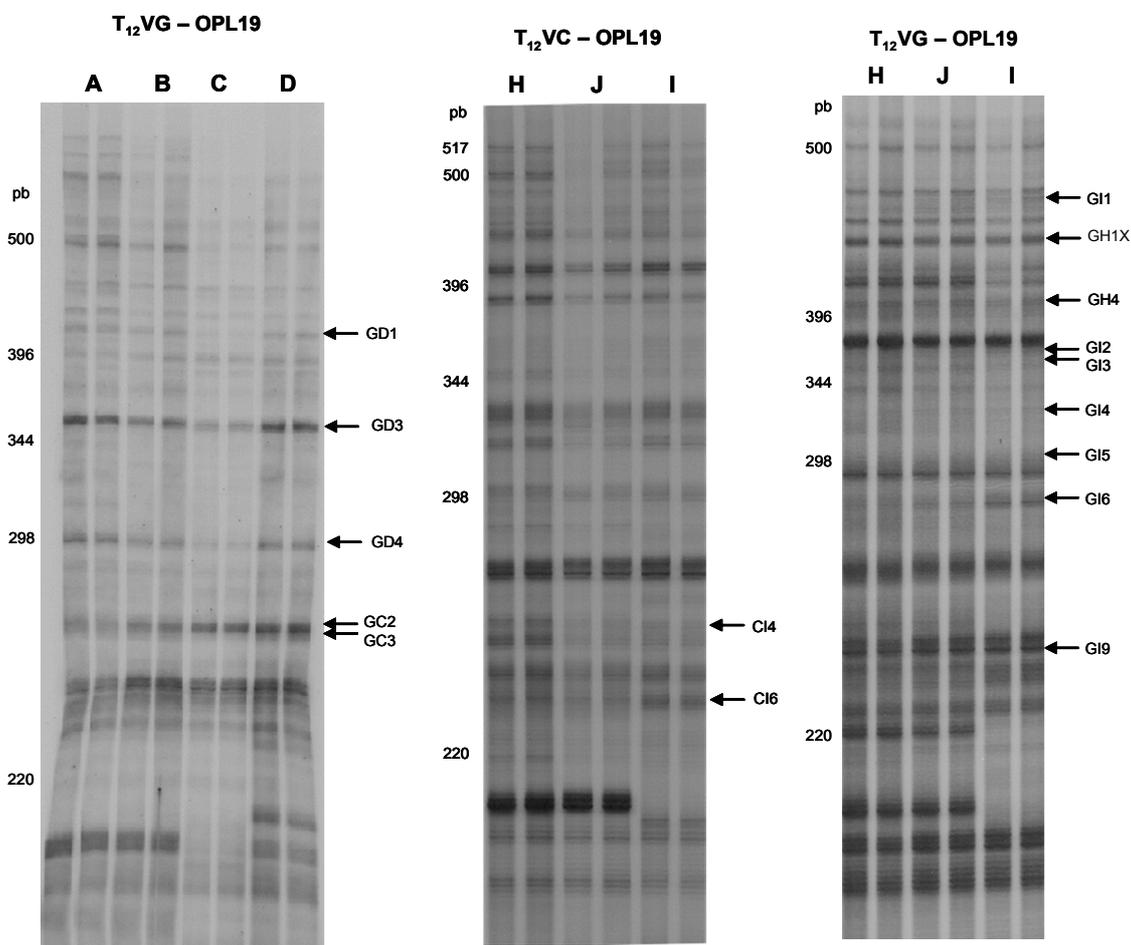


Figura 1. *Display* diferencial de mRNA das amostras A (folha controle no momento zero), B (folha controle no intervalo de 1 hora), C (metade da folha inoculada com o fungo, no intervalo de 1 hora após a inoculação), D (metade da folha não inoculada com o fungo, no intervalo de 1 hora após a inoculação), H (folha controle, intervalo de 24 horas), I (metade da folha inoculada, no intervalo de 24 horas após a inoculação), J (metade não inoculada da folha, intervalo de 24 horas após a inoculação) de folhas de cafeeiro cultivar Icatu Vermelho. Nos experimentos foram utilizados os *primers* ancoradores T₁₂VC ou T₁₂VG e o *primer* arbitrário OPL19. As setas indicam as bandas selecionadas para clonagem e seqüenciamento.

- **cDNA GC2**

O cDNA GC2 (256 pares de bases) apresentou 97% de identidade com a sequência CA00-XX-FB1-111-B01-BG.F (531 pares de bases) do Genoma Café. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos dessa sequência com sequências disponíveis em banco de dados apresentou 72% de identidade e 84% de similaridade com uma anexina (AnnAt3) de *Arabidopsis thaliana* (acesso AAF14580.1). A figura 2 mostra a comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-FB1-111-B01-BG.F e a anexina de *A. thaliana*.

```

Query: 529 LNAPEKHFAKVRASIIIGLTDEDFLTRAIVTRAEIDMMKVRGEYFNMHKSSFDFNAVIGD 350
      ++ PEKHFAKV+R SI G GTDED LTRAIVTRAEID+MKVRGEYFNM+ +S DNA+ GD
Sbjct: 245 IDTPEKHFAKVVRDSIEGFGTDEDSLTRAIVTRAEIDLKMKVRGEYFNMYNTSMDNAITGD 304

Query: 349 TSGHYKNFLMTLLGGKI 299
      SG YK+F++TLLG KI
Sbjct: 305 ISGDYKDFIITLLGSKI 321

```

Figura 2. Comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-FB1-111-B01-BG.F e a sequência de aminoácidos da anexina de *Arabidopsis thaliana*.

No gel de *display* diferencial a expressão do cDNA GC2 apresentou-se menos acentuada na folha controle, tornando-se mais acentuada nas metades da folha inoculada e não inoculada com o fungo. Esse resultado foi confirmado por PCR em tempo real (figura 3).

As anexinas pertencem à família das proteínas que se ligam à membrana e ao Ca^{2+} e são codificadas por oito genes (*AnnAt1-8*) em *Arabidopsis thaliana* (Cantero *et al.*, 2006). Estão presentes principalmente no citoplasma ou em membranas intracelulares (Kovács *et al.*, 1998). As anexinas apresentam numerosas funções em cada tipo de célula e participam de vários processos celulares essenciais, tais como tráfego da membrana, atividade de canal da membrana, metabolismo de fosfolípidos, sinalização mitótica e replicação do DNA, algumas anexinas podem funcionar diretamente como canais de cálcio e se ligam a fosfolípidos de uma forma dependente de Ca^{2+} (Clark & Roux, 1995). Evidências experimentais sugerem que as anexinas estão envolvidas em resposta a estresse oxidativo, agindo como uma peroxidase. Segundo Gorecka *et al.* (2005), estas proteínas agem como uma enzima antioxidante, eliminando H_2O_2 e protegendo as células de estresse oxidativo e apoptose. Ainda segundo esses autores, as anexinas

possuem um resíduo de histidina, o qual é conservado nas peroxidases de plantas e este resíduo pode estar envolvido na atividade de peroxidase dessas proteínas. Todas as anexinas têm uma estrutura repetitiva que compreende de quatro a oito repetições de um domínio conservado de 70-75 aminoácidos (Kovács *et al.*, 1998). Evidências sugerem que AnnAt1 esteja envolvida na resposta de plantas a estresse osmótico (Lee *et al.*, 2004). Cantero *et al.* (2006) utilizaram PCR em tempo real para estudar a expressão das anexinas de *A. thaliana* em diferentes situações de estresse abiótico. Esses autores observaram um aumento na expressão dos transcritos em plantas sob estresse salino e sugeriram que a função das anexinas seria ajudar na adaptação das plantas a altos níveis de sal e regular sistemas de transporte de Na⁺.

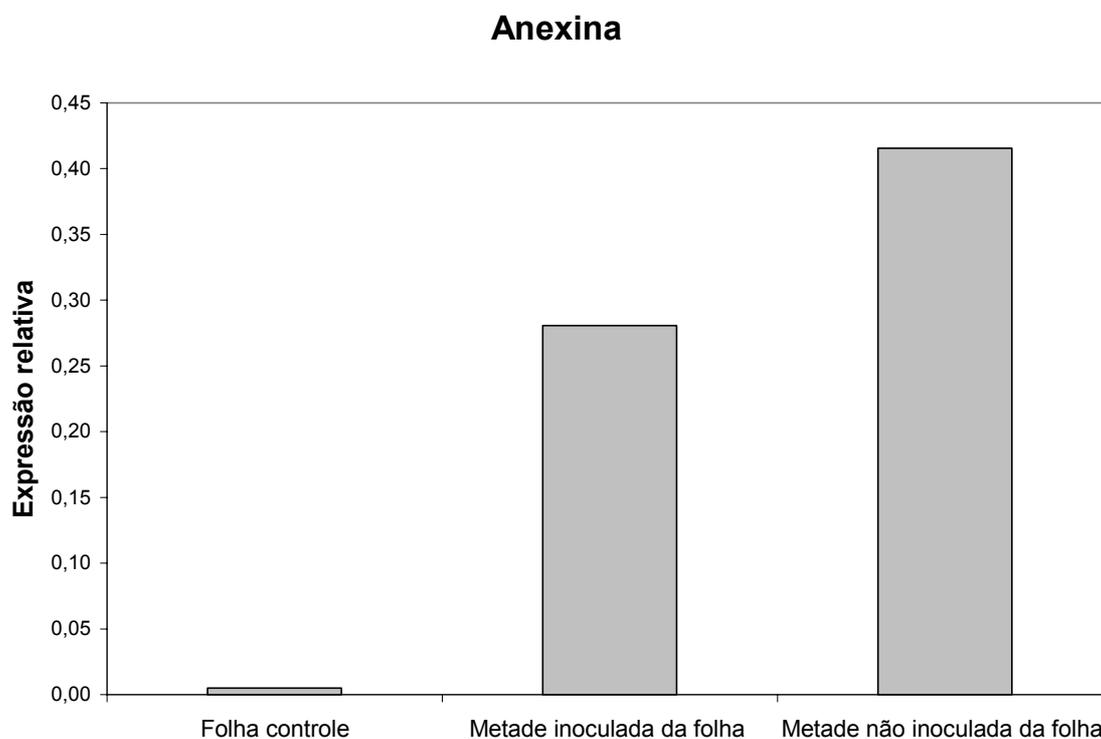


Figura 3. Expressão relativa do cDNA GC2 (que codifica uma anexina) na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo *H. vastatrix*, no intervalo de 1 hora após a inoculação em folha de Icatu Vermelho.

A expressão do cDNA GC2 foi maior na folha inoculada com o fungo, mais precisamente na metade da folha que não recebeu o inóculo. A presença do fungo provavelmente alterou o metabolismo, induzindo a produção de anexinas, as quais participam de vários processos celulares essenciais. Porém, como a expressão do cDNA GC2 foi maior na metade da folha que não recebeu o inóculo, pode-se inferir que este cDNA tenha maior expressão nos tecidos distantes dos locais de penetração do fungo. Os resultados mostram que além de estarem envolvidas na resposta a estresse abiótico (Cantero *et al.*, 2006), as anexinas também estão envolvidas na resposta a estresse biótico.

• cDNA GD3

O cDNA GD3, que possui 335 pares de bases, apresentou 97% de identidade com a seqüência CA00-XX-LV5-086-C06-EP.F (555 pares de bases) do Genoma Café. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos dessa seqüência com seqüências disponíveis em banco de dados apresentou 97% de identidade e 99% de similaridade com uma Proteína M do Fotossistema II de *Triticum aestivum* (acesso NP_114247.1). A figura 4 mostra a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-LV5-086-C06-EP.F e a Proteína M do Fotossistema II de *Triticum aestivum*.

```
Query: 224 MEVNILAFIATALFILVPTAFLLLIIVKTVSQNN 123
      MEVNILAFIATALFILVPT+FLLLIIVKTVSQNN
Sbjct: 1 MEVNILAFIATALFILVPTSFLLLIIVKTVSQNN 34
```

Figura 4. Comparação entre a seqüência de aminoácidos de CA00-XX-LV5-086-C06-EP.F e a seqüência de aminoácidos da proteína M do fotossistema II de *Triticum aestivum*.

No gel de *display* diferencial esse cDNA foi menos expresso na metade da folha inoculada com o fungo. Esse resultado foi confirmado por PCR em tempo real (figura 5).

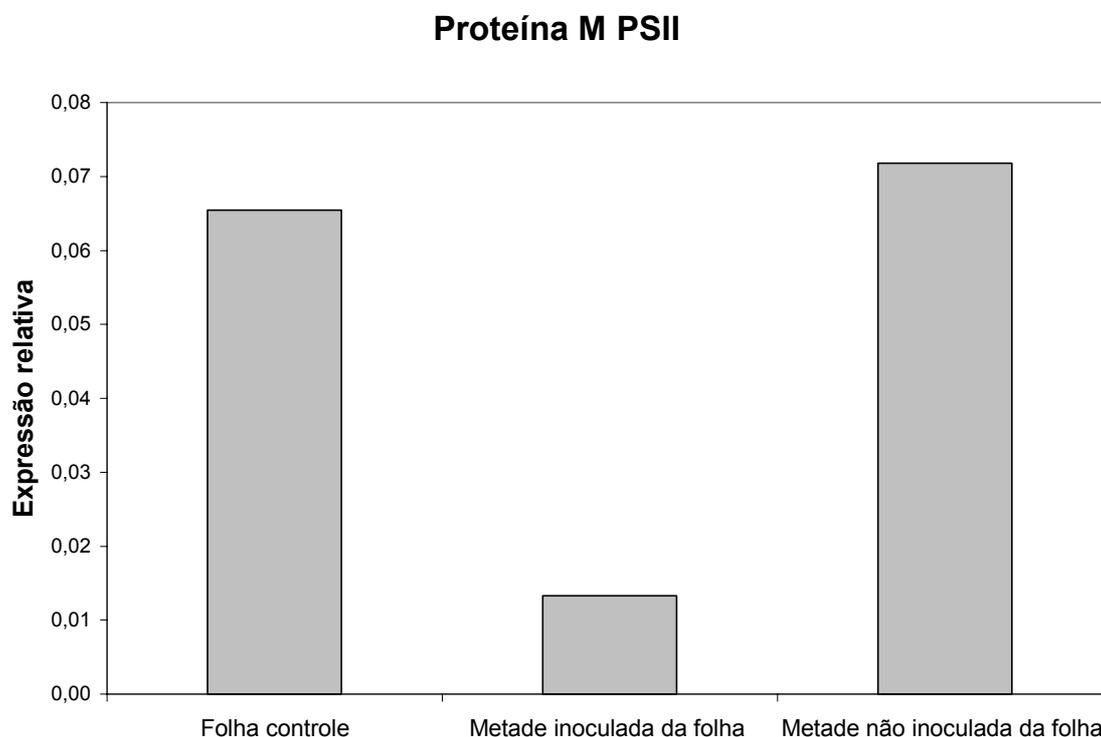


Figura 5. Expressão relativa do cDNA GD3 (que codifica uma proteína M do fotossistema II) na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo *H. vastatrix*, no intervalo de 1 hora após a inoculação em folha de Icatu Vermelho.

Há na literatura vários relatos relacionando fatores de estresse (estresse hídrico, salino, alta intensidade de luz, choque térmico, ataque de patógenos e herbívoros) com danos no fotossistema II. O fotossistema II catalisa a transferência de elétrons entre a água e a plastoquinona. Ele pode ser dividido em três partes funcionais: o centro de reação, as antenas periféricas e as proteínas regulatórias. No centro de reação é que ocorre a oxidação da água e o subproduto dessa reação de oxidação é o oxigênio molecular (Taiz & Zeiger, 2004). Assim, o fotossistema II tem mostrado ser muito sensível ao estresse hídrico, resultando em dano para os centros de reação (Lu & Zhang, 1999). Em experimento realizado com plantas de trigo submetidas a estresse hídrico houve uma modificação da fotoquímica do fotossistema II e essa modificação gerou um decréscimo na eficiência da captura de energia pelos centros de reação,

diminuindo o transporte de elétrons para compensar um decréscimo na assimilação de carbono devido ao fechamento dos estômatos (Lu & Zhang, 1999).

A análise da expressão gênica de folhas de *Nicotiana benthamiana* infectadas por *Phytophthora infestans* revelou uma acentuada expressão de genes relacionados com a fotossíntese, sugerindo uma relação entre fotossíntese e reação de hipersensibilidade (HR) (Matsumura *et al.*, 2003).

A expressão do cDNA GD3 diminuiu na metade da folha inoculada com o fungo. Houve uma repressão desse cDNA nos locais de penetração do patógeno. Como essa é uma proteína estrutural envolvida na fotossíntese, a presença do fungo pode estar comprometendo as membranas dos cloroplastos.

• cDNA GH1X

O cDNA GH1X, que possui 433 pares de bases, apresentou 98% de identidade com a seqüência CA00-XX-RM1-026-G12-MC.F (844 pares de bases) do Genoma Café. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos dessa seqüência com seqüências disponíveis em banco de dados apresentou 93% de identidade e 96% de similaridade com uma pirofosfatase próton-inorgânica vacuolar de *Pyrus communis* (acesso BAC41250.1). A figura 6 mostra a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-RM1-026-G12-MC.F e a seqüência de aminoácidos da pirofosfatase próton-inorgânica vacuolar de *Pyrus communis*.

No gel de *display* diferencial a expressão do cDNA apresentou-se mais acentuada na metade da folha não inoculada com o fungo. Esse resultado foi confirmado por PCR em tempo real (figura 7).

```

Query: 25  VRXSRAIKXMIPPGALVMLTPLIVGTFVETLSGVLAGSLVSGVQIAIASANTGGAWDN 204
+      +IK MIPPGALV+LTPLIVGTFVETLSGVLAGSLVSGVQIAIASANTGGAWDN
Sbjct: 634  ISTDASIKEMIPPGALVILTPLIVGTFVETLSGVLAGSLVSGVQIAIASANTGGAWDN 693

Query: 205  AKKYIEAGASEHARTLGPKGSEPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFA 384
          AKKYIEAGASEHARTLGPKGS+PHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFA
Sbjct: 694  AKKYIEAGASEHARTLGPKGSDPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSLNILIKLMAVESLVFA 753

Query: 385  PFFATHGGLLFKI 423
          PFFATHGGLLFKI
Sbjct: 754  PFFATHGGLLFKI 766

```

Figura 6. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos CA00-XX-RM1-026-G12-MC.F e a seqüência de aminoácidos da pirofosfatase próton-inorgânica vacuolar de *Pyrus communis*.

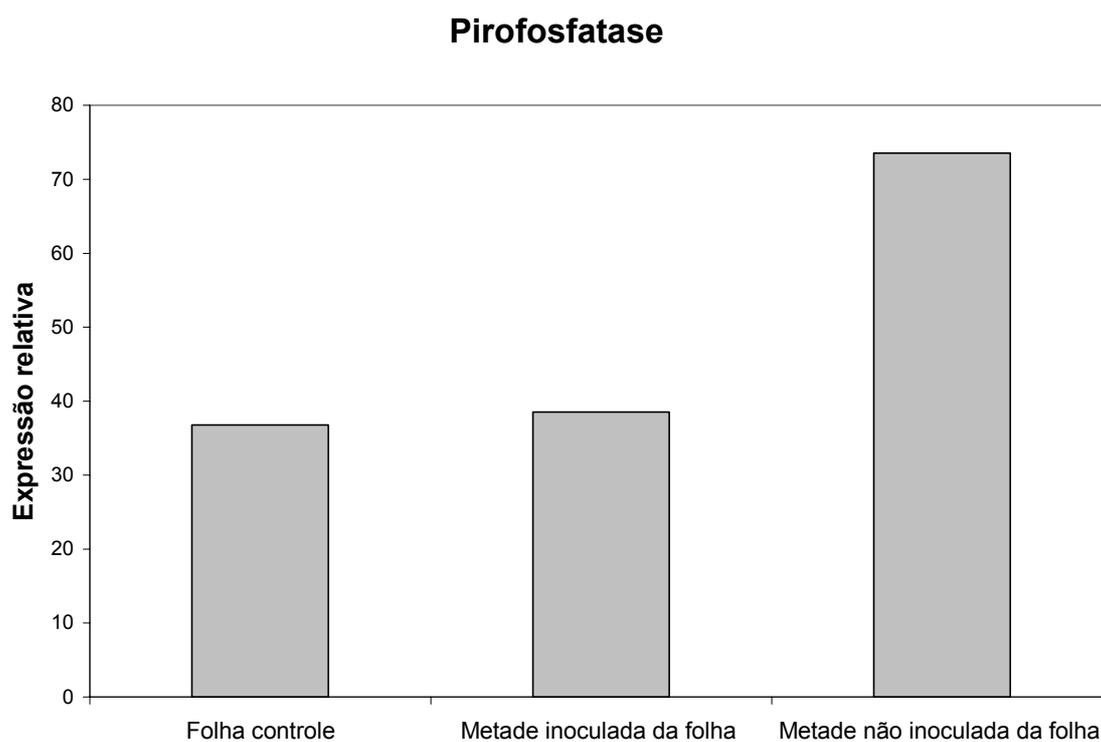


Figura 7. Expressão relativa do cDNA GH1X (que codifica uma pirofosfatase próton inorgânica vacuolar) na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo *H. vastatrix*, no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em folha de Icatu Vermelho.

Em plantas, o antiporte Na^+/H^+ transporta Na^+ do citoplasma para o vacúolo usando um gradiente eletroquímico H^+ gerado por duas bombas de prótons: uma pirofosfatase próton-inorgânica vacuolar e uma ATPase próton-vacuolar (Fukuda *et al.*, 2004). A adaptação de plantas ao estresse salino requer a homeostase celular de íons, a qual envolve a compartimentalização de Na^+ e Cl^- no vacúolo, evitando assim o acúmulo tóxico desses íons no citosol. A proteína pirofosfatase próton-inorgânica vacuolar realiza essa compartimentalização, contribuindo para o nível osmótico na célula (Gaxiola *et al.*, 2001). Foi verificado um aumento da expressão dessa proteína em resposta ao estresse pela seca e alta salinidade em trigo (Brini *et al.*, 2005) e aveia (Fukuda *et al.*, 2004).

Nas plantas, em diversas condições de estresse o pirofosfato pode assumir o papel do ATP atuando como doador de energia metabólica da célula (Stitt, 1998). Nesse caso, a pirofosfatase tem a função de catalisar a hidrólise do pirofosfato para prover as células de energia.

A expressão do cDNA GH1X foi mais acentuada na metade da folha não inoculada com o fungo, ou seja a maior expressão ocorreu nos locais distantes daqueles de penetração do patógeno. Nesse caso, houve um aumento da expressão do cDNA GH1X devido ao fungo.

• cDNA GH4

O cDNA GH4, que possui 406 pares de bases, apresentou 96% de identidade com a seqüência CA00-XX-SH2-070-F03-EM.F (805 pares de bases) do Genoma Café. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos dessa seqüência com seqüências disponíveis em banco de dados apresentou 55% de identidade e 71% de similaridade com um Citocromo P450 de *A. thaliana* (acesso NP_198460.1). A figura 8 mostra a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-SH2-070-F03-EM.F e a seqüência de aminoácidos de Citocromo P450 de *A. thaliana*.

No gel de *display* diferencial a expressão desse cDNA foi mais acentuada na folha controle, sendo que a expressão diminuiu nas metades da folha inoculada e não inoculada com o fungo. A expressão desse cDNA confirmou-se por PCR em tempo real (figura 9).

```

Query: 106 EICNNIVGLLVA SFDTTSCAATFVLKYLSELPHIYDKVYQEIMEIAESKGPDDLLSWEDI 285
      ++ + I+GLL+  DT S  TFV+ YL+E PH+Y +V QE  EI + K  + L WEDI
Sbjct: 276 DLADKIIGLLIGGHDTASIVCTFVVNYLAEFPHVYQRVLQEKEILKEKKEKEGLRWEDI 335

Query: 286 QKMTYSWNVGRSLRLTPPAQGAFREAKSDFDYAGFTIPKGWKTFW SVYSTHQNP EYFVN 465
      +KM YSWNV  E +R+ PP  G FREA  F + GF IPKGWK +WS  +TH NP+YF
Sbjct: 336 EKMRYSWNVACEVMRIVPPLSGTFREAI DHFSFKGFYIPKGWKLYWSATATHMNP DYFPE 395

Query: 466 PDVFDPSRFEGSGPAPFTFIPFGGGPRMCPGKEYARLEILVFMYNVVTKFKMEKLIPDE- 642
      P+ F+P+RFEGSGP P+T++PFGGGPRMCPGKEYARLEIL+FM+N+V +FK EK+ P+E
Sbjct: 396 PERFEPNRFEGSGPKPYTYVPFGGGPRMCPGKEYARLEILIFMHNLVNRFKWEKVFPNEN 455

Query: 643 KIINLASPTPVDGLPVRL 696
      KI+  P P  GLP+R+
Sbjct: 456 KIVVDLPIPKGLPIRI 473

```

Figura 8. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-SH2-070-F03-EM.F do Genoma Café e a seqüência de aminoácidos de um Citocromo P450 de *Arabidopsis thaliana*.

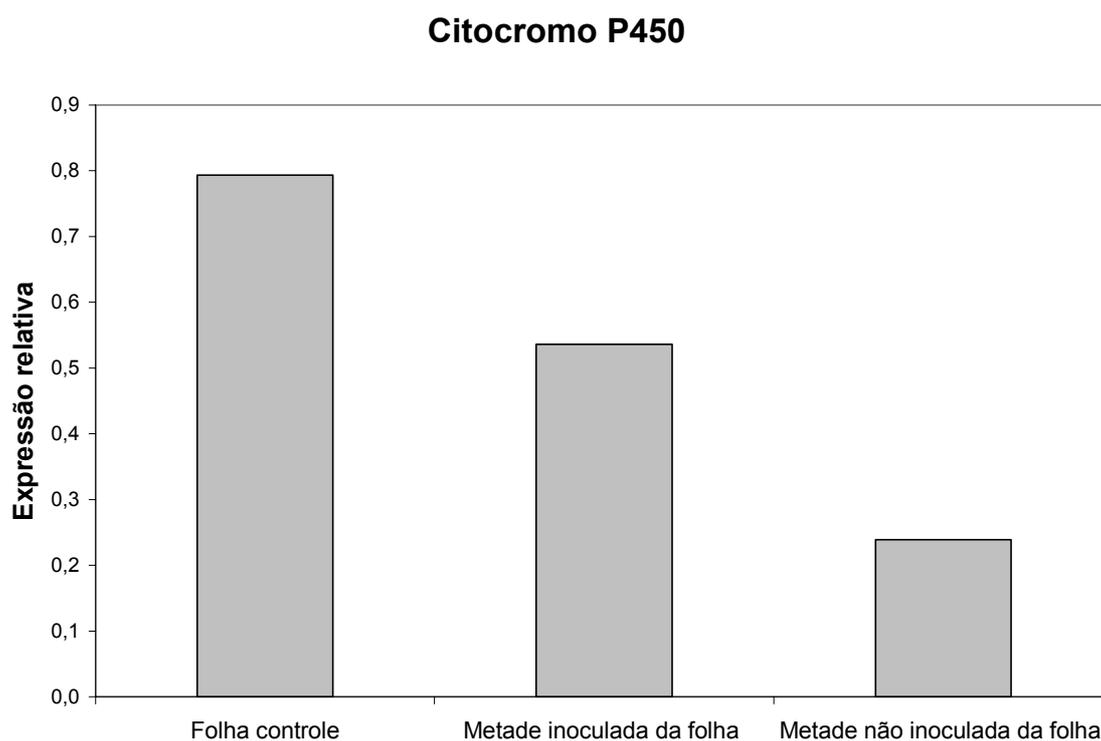


Figura 9. Expressão relativa do cDNA GH4 (que codifica um Citocromo P450) na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo *H. vastatrix*, no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em folha de Icatu Vermelho.

Os Citocromos P450 de plantas formam uma grande família de monooxigenases envolvidas na síntese de vários metabólitos secundários que incluem hormônios, esteróis, ácidos graxos, aleloquímicos de plantas (Smigocki & Wilson, 2004). Kandel *et al.* (2005) mostraram que as enzimas da família do citocromo P450 são capazes de hidroxilar ácidos graxos e estes estão envolvidos na resposta de plantas a estresse abiótico, bem como a ferimentos e ataques de insetos e patógenos. Os citocromos P450 regulam um importante sistema anti-oxidativo na planta. Segundo Sawada *et al.* (2006) o citocromo P450 catalisa a biossíntese de ácido salicílico sob condições de estresse. Os autores relataram que a atividade do Citocromo P450 foi induzida em plântulas de arroz em resposta a alta salinidade. Citocromos P450 são responsáveis pela produção de fitooxilipinas pela oxidação de ácidos graxos insaturados. As fitooxilipinas são produzidas em resposta a estresse (Blée, 2002). Experimentos revelaram que ocorreu aumento da expressão de cDNAs que codificam para Citocromo P450 em plantas em resposta ao ataque por fungos (Bong-Jun, 2003; Karlsson *et al.*, 2003). Segundo Dae-Kyun *et al.* (2005), monooxigenases P450 são enzimas importantes que geram terpenóides, os quais estão envolvidos na defesa de algumas plantas a herbívoros e patógenos. Smigocki & Wilson (2004) mostraram que a expressão de uma monooxigenase P450 foi induzida por ferimento mecânico e insetos mastigadores e sugerem um possível papel deste gene na defesa de plantas, pois a resposta foi sistêmica e ocorreu mais rapidamente ao ataque de insetos. Narusaka *et al.* (2004) observaram aumento de expressão de 29 genes de Citocromo P450 em resposta a hormônios (ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e ácido abscísico), patógenos (*Alternaria brassicicola* e *A. alternata*), estresse oxidativo (paraquat e Rosa de Bengala), estresse à luz UV, metais pesados, ferimento, estresse hídrico, alta salinidade e baixa temperatura. Glazebrook *et al.* (1997) relatou que a síntese de camalexina (uma fitoalexina de *A. thaliana*) é catalisada pelo Citocromo P450 em resposta ao fungo *Phytophthora infestans*.

Ao contrário do observado pelos autores citados acima, a expressão do cDNA GH4 diminuiu na presença de *H. vastatrix*, nesse caso a expressão desse cDNA foi reprimida na presença do patógeno. Como o Citocromo P450 está também envolvido no transporte dos elétrons nas membranas do cloroplasto (Watson *et al.*, 2001) e sua função pode estar relacionada a reações biossintéticas localizadas nessas membranas (Papenbrock & Grimm, 2001), uma hipótese para a diminuição da expressão desse cDNA na folha inoculada é a de que o fungo pode

estar comprometendo a funcionalidade das membranas dos cloroplastos, diminuindo a atividade do Citocromo P450.

• cDNA GII

O cDNA GII, que possui 465 pares de bases, apresentou 94% de identidade com a seqüência CA00-XX-CL2-075-G02-BF.F (662 pares de bases) do Genoma Café. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos dessa seqüência com seqüências disponíveis em banco de dados apresentou 56% de identidade e 67% de similaridade com uma proteinase carboxil terminal de *A. thaliana* (acesso NP_193484.1). A figura 10 mostra a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-CL2-075-G02-BF.F e a seqüência de aminoácidos da proteinase carboxil terminal de *A. thaliana*.

```

Query: 100 GDTEARDNVDTHFICFTCVNGQLYELDGRXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXAAKVIKMMMEKNP 279
          GDT A ++ DTHFIC CV G+LYELDGR+ DA KVI+KM+EKNP
Sbjct: 161 GDTPASEDADTHFICLACVEGELYELDGRKAGPI SHGASSPATLLKDATKVIKMMIEKNP 220

Query: 280 DSLNFNVMMAISKR 318
          SLNFN++AISKR
Sbjct: 221 GSLNFNLIASKR 233

```

Figura 10. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos CA00-XX-CL2-075-G02-BF.F e a seqüência de aminoácidos de uma proteinase carboxil terminal de *A. thaliana*.

No gel de *display* diferencial a expressão desse cDNA foi mais acentuada na metade não inoculada da folha. Esse resultado foi confirmado por PCR em tempo real (figura 11).

Essa proteinase foi relatada em folhas de espinafre e na cianobactéria *Synechocystis* sp. (Inagaki *et al.*, 1996; Inagaki *et al.*, 2001), é uma proteína monomérico-ativa de 42-45 kDa. Esta proteinase remove a extensão C-terminal de um precursor da proteína D1, a qual é uma subunidade integral do fotossistema II. Segundo Yamamoto *et al.* (2001), a proteína D1 é sintetizada como um precursor com a extensão C-terminal, esta parte da proteína é excisada logo após sua síntese pela protease carboxil-terminal, a qual localiza-se nos tilacóides. Este processo de

clivagem enzimática é essencial para o estabelecimento da funcionalidade fotossistema II para a oxidação da água.

O cDNA GI1 apresentou expressão mais acentuada na metade da folha não inoculada com o fungo, o que demonstra que a maior expressão ocorreu em locais distantes daqueles de penetração do patógeno. Como a proteinase carboxil-terminal é essencial para um bom funcionamento do fotossistema II, o que pode estar ocorrendo é que nos locais de infecção do patógeno, os cloroplastos podem estar com sua funcionalidade comprometida, de modo que ocorreu um aumento dessa proteína nos locais distantes dos sítios de infecção para compensar a perda da capacidade fotossintética da folha.

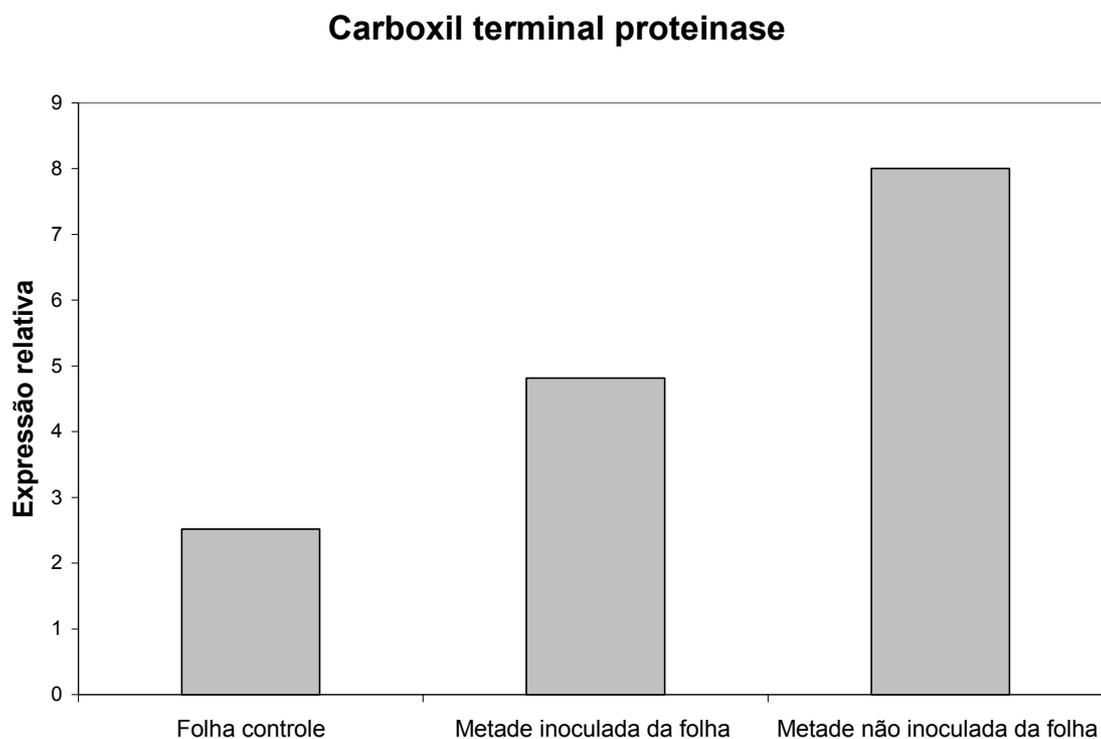


Figura 11. Expressão relativa do cDNA GI1 (que codifica uma proteinase carboxil terminal) na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo *H. vastatrix*, no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em folha de Icatu Vermelho.

- **cDNA GI2**

O cDNA GI2, que possui 358 pares de bases, apresentou 98% de identidade com a seqüência CA00-XX-LV8-067-B03-SB.F (624 pares de bases) do Genoma Café. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos dessa seqüência com seqüências disponíveis em banco de dados apresentou 96% de identidade e 97% de similaridade com uma HSP70 (Proteína de choque térmico de 70 kDa) de *Nicotiana tabacum* (acesso AAP04522.1). A figura 12 mostra a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-LV8-067-B03-SB.F e a seqüência de aminoácidos da HSP70 de *Nicotiana tabacum*.

```

Query: 54  EEHKKKVEAKNALENYAYNMRNTVKDEKIGSKLSPADKKKIEDAIDQAISWLDSNQLAEA 233
          EEHKKKVEAKNALENYAYNMRNT+KDEKIGSKLS  DKKKIEDAIDQAISWLDSNQLAEA
Sbjct: 536 EEHKKKVEAKNALENYAYNMRNTIKDEKIGSKLSSDDKKKIEDAIDQAISWLDSNQLAEA 595

Query: 234 DEFEDKMKELESICNPIIAKMYQ 302
          DEFEDKMKELESICNPIIAKMYQ
Sbjct: 596 DEFEDKMKELESICNPIIAKMYQ 618

```

Figura 12. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-LV8-067-B03-SB.F do Genoma Café com uma HSP70 de *Nicotiana tabacum*.

No gel de *display* diferencial a expressão desse cDNA foi mais acentuada na metade da folha que recebeu o inoculo do fungo. Esse resultado foi confirmado por PCR em tempo real (figura 13).

As proteínas HSP70 são expressas em altos níveis em condições de estresse. Segundo Schroda *et al.* (2001), estas proteínas podem facilitar o dobramento de proteínas recém sintetizadas, bem como corrigir o redobramento de polipeptídeos que, devido a estresse, assumem conformação incorreta.

Segundo Lee & Vierling (2000), as proteínas HSPs facilitam o crescimento e sobrevivência de plantas sob condições de severo estresse de temperatura. As HSPs permitem que temperaturas letais possam ser toleradas por curtos períodos. Segundo Zhang & Guy (2006) houve um aumento na atividade de HSP70 em espinafre submetido a baixas temperaturas (4°C e -4°C).

Em experimento realizado por Cheong *et al.* (2002) genes que codificam para HSPs em *Arabidopsis thaliana* foram ativados em resposta a estresse osmótico (3 horas após o tratamento), por ataque do fungo *Phytophthora parasitica* (48 horas após o tratamento), por vírus (24 horas após tratamento) e por estresse químico (2 horas após tratamento).

Segundo Havelda & Maule (2000), em cotilédones de *Cucurbita pepo* (abobrinha) infectados por CMV (*Cucumber Mosaic Virus*) houve aumento da atividade da proteína HSP70 em células próximas à infecção.

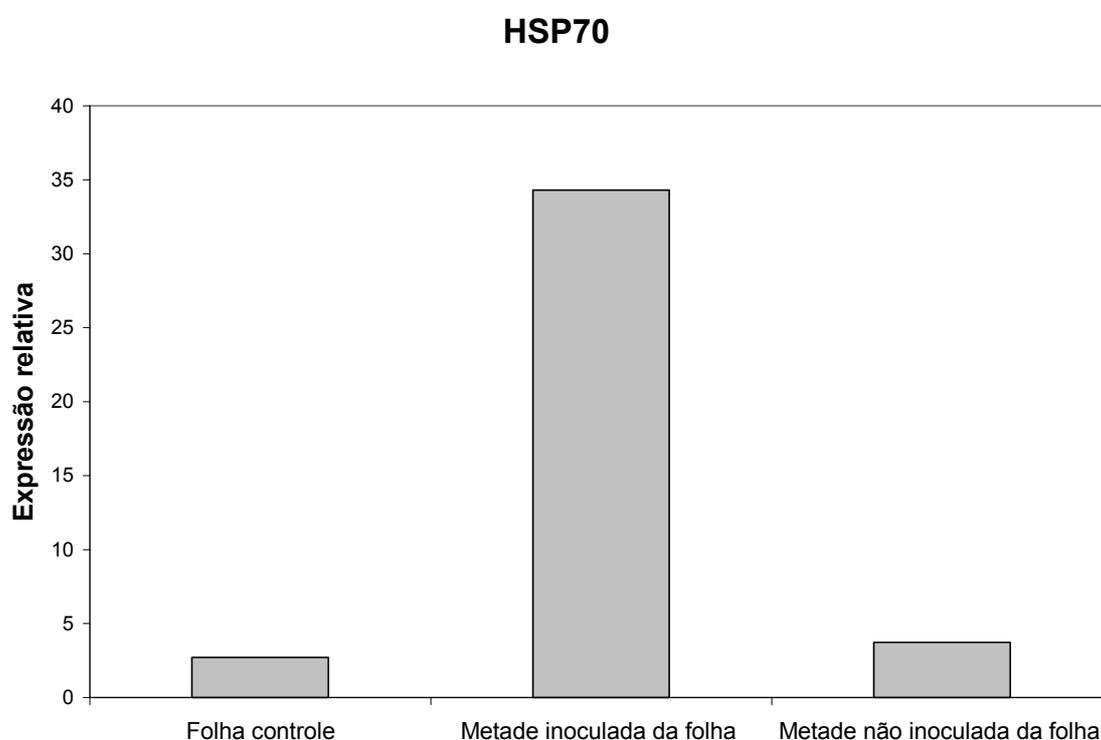


Figura 13. Expressão relativa do cDNA GI2 (que codifica uma HSP70) na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo *H. vastatrix*, no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em folha de Icatu Vermelho.

Chen *et al.* (2003) submeteram frutos verdes e folhas de café a um tratamento de choque térmico (55°C por 30 segundos) e os resultados revelaram que a expressão de genes *cahsp70* foi induzida 16 horas após o tratamento em frutos e 24 horas após o tratamento em folhas

e em ambos os casos, a expressão diminuiu 48 horas após tratamento. Fernandez *et al.* (2004) inocularam folhas de cafeeiro com *H. vastatrix* e observaram aumento da expressão do gene que codifica para HSP70 às 24 e 48 horas após a inoculação.

Yu & Setter (2003), usando *microarray* estudaram a expressão gênica de sementes de milho em desenvolvimento sob estresse hídrico e observaram que a classe de genes com maior expressão foi a das proteínas *heat shock*.

A expressão do cDNA GI2 foi mais acentuada na metade da folha que foi inoculada com o fungo, o que sugere que a proteína HSP70 está envolvida na resposta de defesa do cafeeiro à ferrugem alaranjada. A infecção pelo fungo pode ter ocasionado uma conformação incorreta de algumas proteínas e a HSP70, nesse caso, está sendo produzida em quantidade maior nos locais de infecção para corrigir a estrutura tridimensional desses polipeptídeos.

• cDNA GI9

O cDNA GI9, que possui 243 pares de bases, apresentou 92% de identidade com a seqüência CA00-XX-IA2-004-E02-EC.F (817 pares de bases) do Genoma Café. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos dessa seqüência com seqüências disponíveis em banco de dados apresentou 62% de identidade e 73% de similaridade com uma quinase que contém o domínio C2 de *Arabidopsis thaliana* (acesso NP_197783.2). A figura 14 mostra a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-IA2-004-E02-EC.F e a quinase de *Arabidopsis thaliana*.

```
Query: 73 DTKPLIGSARLRLIDVVDEAGLGRRVERKLELKRPSGRPHGKLQVQVSVRE 225
      +TKPLIGSA L L DV+D+ G G + L+LKRPSGRP GKL V V+VRE
Sbjct: 86 NTKPLIGSAHLSLRDVIDDVGFVPMKTLKLRPSGRPQGKLDVTVTVRE 136
```

Figura 14. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos CA00-XX-IA2-004-E02-EC.F do Genoma Café com uma quinase C de *A. thaliana*.

No gel de *display* diferencial a expressão desse cDNA apresentou-se mais acentuada nas metades da folha inoculada e não inoculada com o fungo. Esse resultado foi confirmado por PCR em tempo real (figura 15).

Algumas isoenzimas da proteína quinase C contém um domínio, conhecido como C2, com resíduo de 116 aminoácidos. O domínio C2 está envolvido na ligação fosfolipídica dependente de Ca^{2+} (<http://ca.expasy.org>).

A família de proteínas quinase C representa um grupo estruturalmente homólogo de proteínas similares em tamanho, estrutura e mecanismo de ativação. Elas participam de um dos maiores sistemas de transdução de sinal em resposta a estímulos externos por vários ligantes, incluindo hormônios e fatores de crescimento (Azzi *et al.*, 1992). A hidrólise de fosfolipídeos, que é iniciada por um estímulo externo, é um sinal que ativa a proteína quinase C (Nishizuka, 1992). A resposta das plantas ao ataque de fungos patogênicos é uma rede de eventos altamente coordenados envolvendo o reconhecimento de sinais que culminam na ativação proteínas como a quinase C (Bowles, 1990). Moléculas derivadas de fosfolipídeos funcionam como mensageiras na sinalização de resposta de plantas a patógenos e a enzima quinase C está envolvida em uma série de reações que promovem a conversão de fosfolipídeos em mensageiros secundários como o ácido jasmônico (Laxalt & Munnik, 2002).

A expressão do cDNA GI9 aumentou nas metades inoculada e não inoculada da folha com o fungo. A presença do fungo pode ter ativado a quinase C e iniciado uma conversão de fosfolipídeos da membrana plasmática em mensageiros secundários. Fernandez *et al.* (2004) também observaram um aumento da expressão do gene para quinase, 24 horas após a inoculação.

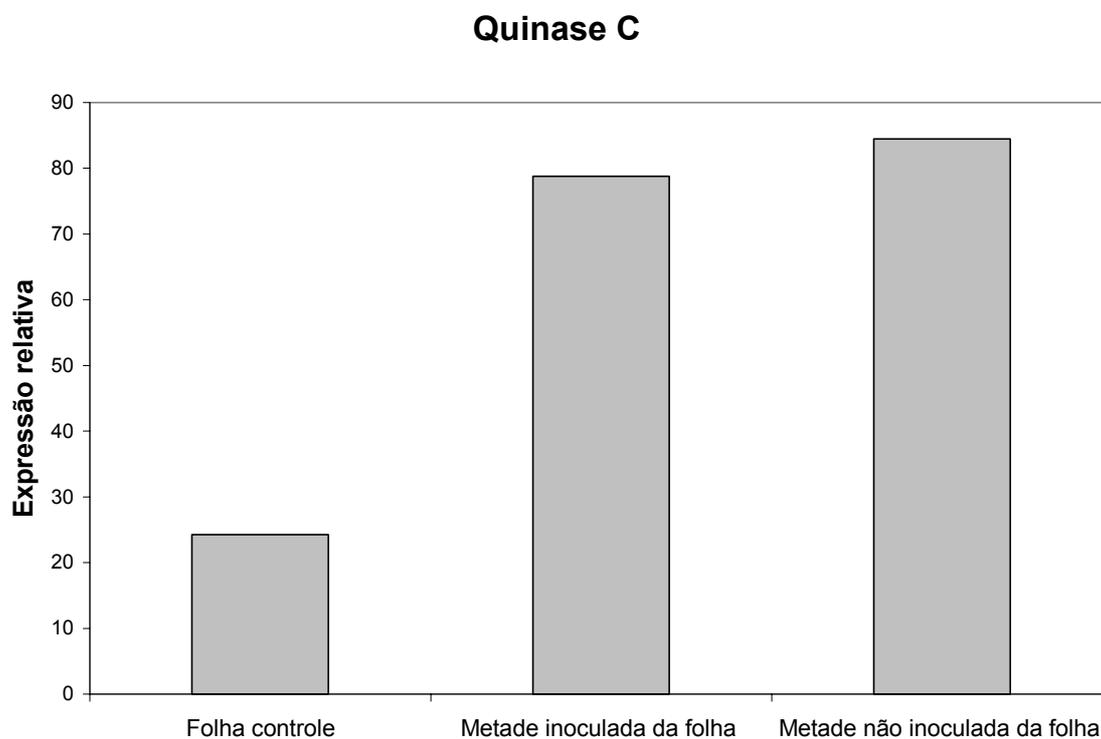


Figura 15. Expressão relativa do cDNA GI9 (que codifica uma quinase C) na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo *H. vastatrix*, no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em folha de Icatu Vermelho.

- **cDNA CI4**

O cDNA CI4, que possui 254 pares de bases, apresentou 97% de identidade com a sequência CA00-XX-CS1-088-H04-RF.F (442 pares de bases) do Genoma Café. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos dessa sequência com sequências disponíveis em banco de dados apresentou 82% de identidade e 95% de similaridade com a proteína FIS1 de *Linum usitatissimum* (acesso CAA60412.1). A figura 16 mostra a comparação entre a sequência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-CS1-088-H04-RF.F e a sequência de aminoácidos da FIS1 de *Linum usitatissimum*.

```

Query: 55  DPRGAGIGTPEAIKLVWSCHREIIYDVGPIARNWQIPRST 174
          DPRGAGIGTPEAIKLVWSCHREIIYD+GP++ +W+IP ST
Sbjct: 512 DPRGAGIGTPEAIKLVWSCHREIIYDIGPVSHHWEIPPST 551

```

Figura 16. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de CA00-XX-CS1-088-H04-RF.F do Genoma Café com a proteína FIS1 de *Linum usitatissimum*.

No gel de *display* diferencial a expressão desse cDNA apresentou-se mais acentuada na metade da folha inoculada com o fungo. Esse resultado foi confirmado por PCR em tempo real (figura 17).

A proteína FIS1 é sintetizada na interação entre ferrugem e linho (Roberts & Pryor, 1995). Segundo esses autores é possível que o gene *fis1* seja induzido na planta em resposta ao patógeno para facilitar uma relação biotrófica entre este e o hospedeiro. Ayliffe *et al.* (2002) relataram que a indução deste gene é altamente localizada nas células do mesófilo ao redor do local de infecção. Homólogos de *fis1* foram identificados em milho (*Zea mays*; *mis1*), aveia (*Hordeum vulgare*; *bis1*) e trigo (*Triticum aestivum*; *wis1*) (Ayliffe *et al.*, 2002). Em *Arabidopsis thaliana* o homólogo é uma Δ^1 -pirrolina-5 carboxilato desidrogenase, que está envolvida no catabolismo de prolina para glutamina (Deuschle *et al.*, 2001).

O cDNA CI4 teve expressão aumentada na metade inoculada da folha, pode-se dizer então que um homólogo da proteína FIS1 para cafeeiro tem sua produção aumentada nos locais de infecção do patógeno.

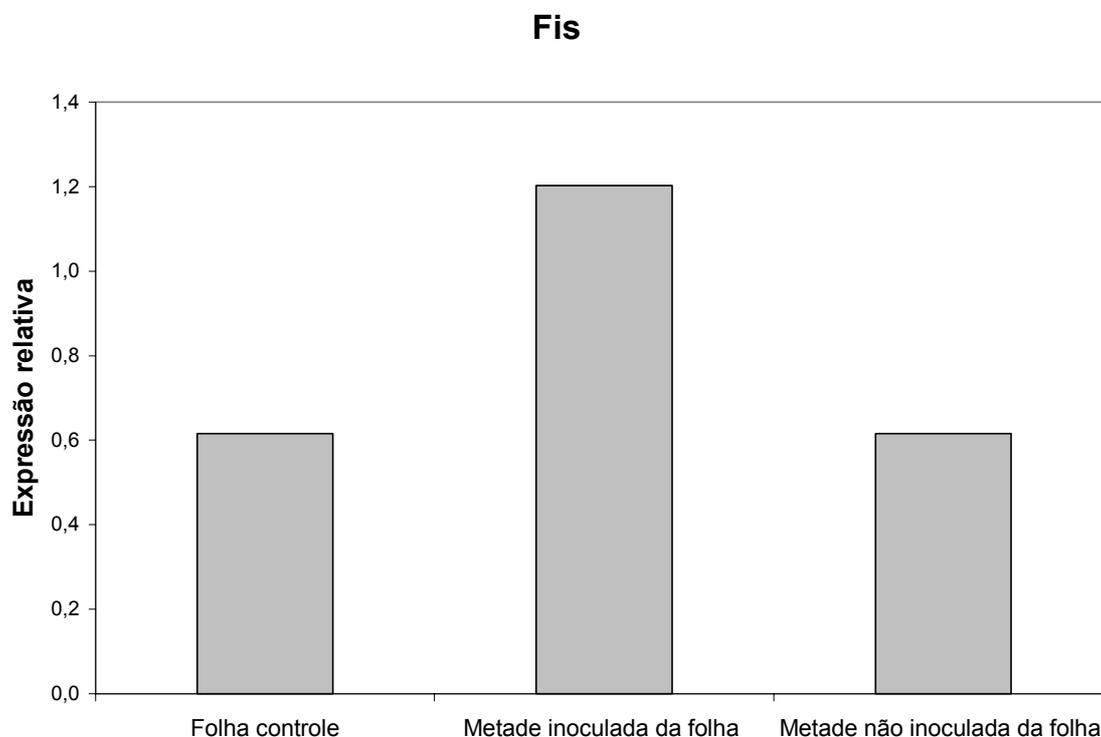


Figura 17. Expressão relativa do cDNA CI4 (que codifica uma proteína FIS1) na folha controle, metade inoculada e metade não inoculada da folha com o fungo *H. vastatrix*, no intervalo de tempo de 24 horas após a inoculação em cafeeiro Icatu Vermelho.

Com o advento da biotecnologia, os pesquisadores da área de melhoramento que visam à defesa/resistência de plantas a patógenos investigam proteínas envolvidas com fortalecimento da parede celular, lignificação, enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede fúngica e proteínas relacionadas a estresse em geral. Como perspectivas para experimentos futuros, a partir do conhecimento dos cDNAs encontrados nesse experimento, principalmente aqueles diretamente relacionados a estresse, como GC2, GH4, GI2, GI9 e CI4, podem ser levantadas outras hipóteses como a observação da expressão desses cDNAs em outros cultivares de café e por exemplo, como se comporta determinado cDNA em um cultivar suscetível e em outros cultivares resistentes além do Icatu Vermelho. Uma outra sugestão seria o seqüenciamento de

genes inteiros a partir desses cDNAs e se os genes codificariam para as as proteínas encontradas em outras espécies de interesse agrônômico.

DRIFTS

A técnica de espectroscopia de infravermelho, com transformada de Fourier é amplamente utilizada em experimentos que envolvem resistência de plantas a patógenos (Kos *et al.*, 2003; Pandey & Pitman, 2003; Martín *et al.*, 2005). A reflectância difusa ocorre em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado (moído). A energia radiante incidente penetra na amostra interagindo com as substâncias em seu interior e retorna à superfície após a absorção parcial e múltiplos espalhamentos. Na reflexão difusa a energia é atenuada depois de entrar em contato diversas vezes com as partículas da amostra, fornecendo muitas informações analíticas sobre a mesma. A luz difusa dá um espectro similar ao espectro de transmissão comum. As informações qualitativas estão relacionadas às energias absorvidas pelas moléculas em determinados comprimentos de onda específicos (Ferrarini, 2004).

Essa parte do trabalho teve por objetivo identificar alterações metabólicas ocorridas em folhas de cafeeiro cv. Icatu Vermelho – IAC 4045 e Mundo Novo – IAC 501, inoculadas com o fungo a raça II do fungo *H. vastatrix*. Para isso foram obtidos espectros das amostras nos períodos de tempo de 1, 24, 48, 96 e 168 horas após a inoculação com o fungo.

Os espectros de reflectância, obtidos em um espectrômetro ABB Bomem, foram coletados na região entre os números de onda de 4000 a 650 cm^{-1} , com a resolução de 8 cm^{-1} , sendo acumuladas 64 varreduras, para folhas dos cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo (figura 18).

A região do espectro, utilizada para as análises quimiométricas e estatísticas foi aquela entre os números de onda de 1700 a 1000 cm^{-1} pois essa é a região para a caracterização do *fingerprint* metabólico, ou seja, é a mais importante para detectar as alterações metabólicas entre os diferentes cultivares (Icatu Vermelho e Mundo Novo) e entre folhas inoculadas ou não com o fungo.

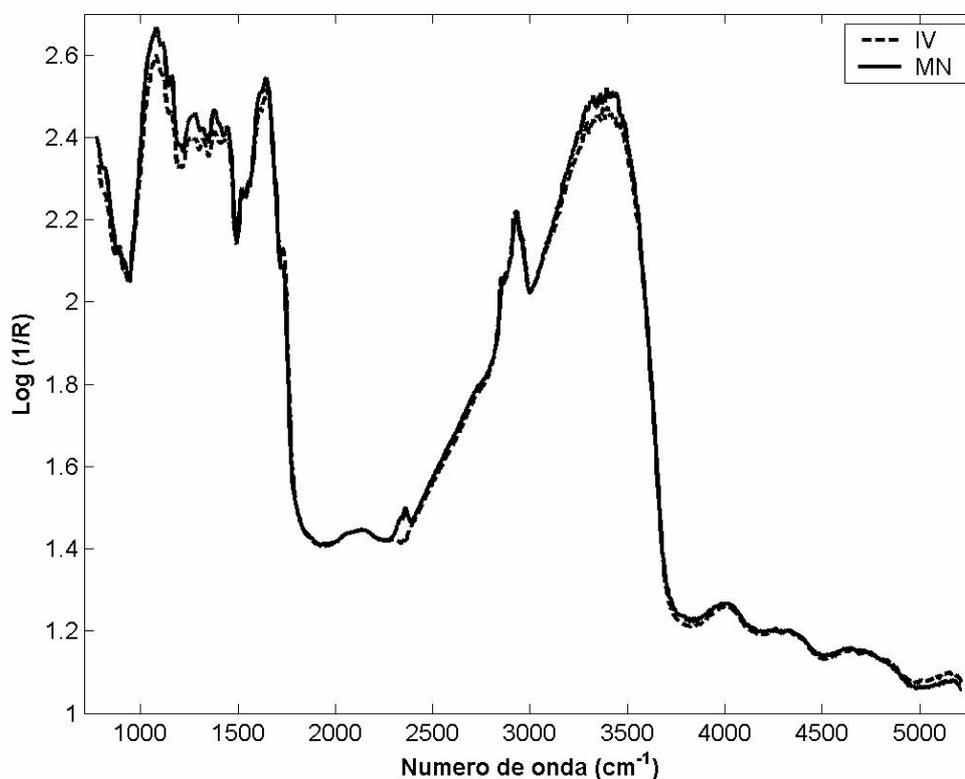


Figura 18. Espectro de reflectância difusa de infravermelho médio obtido de folhas de *C. arabica* cv. Icatu Vermelho (IV) e Mundo Novo (MN).

Na região do *fingerprint* metabólico foram observados picos proeminentes correspondentes aos números de onda 1075 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} as quais foram denominadas de regiões A, B, C, D, E e F, respectivamente. A figura 19 mostra os espectros de reflectância difusa de infravermelho médio obtidos de folhas de café cv. Icatu Vermelho e Mundo Novo na região entre os números de onda de 1700 a 800 cm^{-1} .

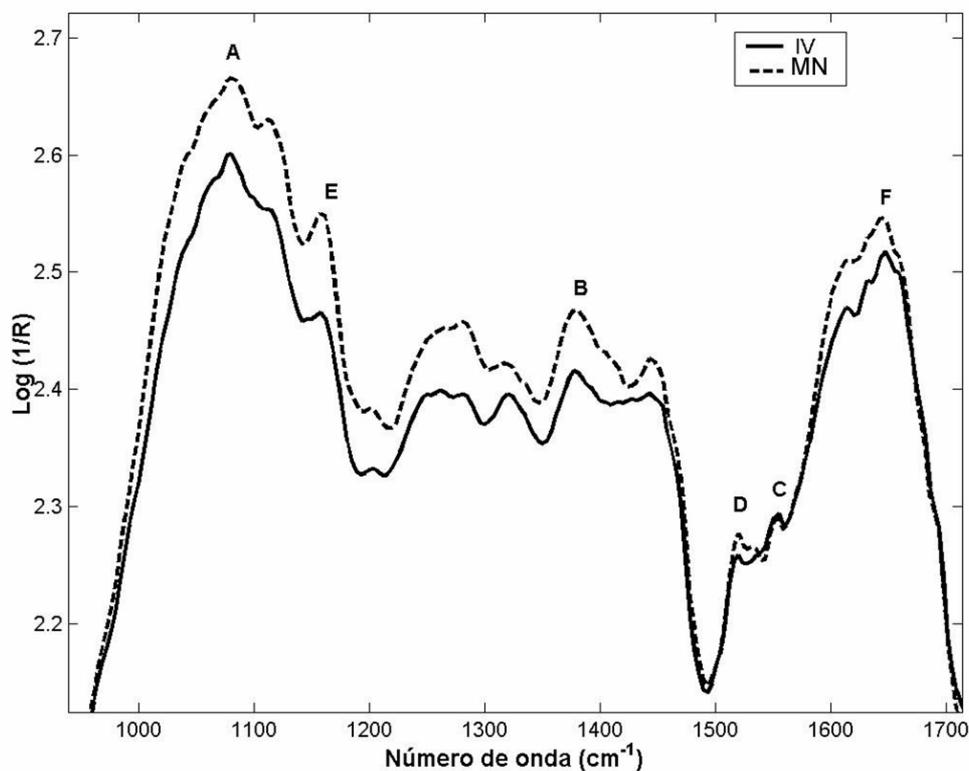


Figura 19. Espectro de reflectância difusa de infravermelho médio obtido de folhas de *C. arabica* cv. Icatu Vermelho (IV) e Mundo Novo (MN) na região entre os números de onda entre 1700 a 800 cm^{-1} .

Picos proeminentes nas regiões A (1075 cm^{-1}) e E (1150 cm^{-1}) podem ser interpretados como estiramento da ligação C-N de amina ou deformação da ligação C-O de álcool ou fenol (Pavia *et al.*, 1996), na região B (1375 cm^{-1}) pode significar também estiramento da ligação C-N de amina (Pavia *et al.*, 1996), na região C (1555 cm^{-1}) ou D (1520 cm^{-1}) pode significar uma deformação angular da ligação N-H de amida, segundo Yang & Yen (2002) ou deformação da ligação C=C de anel aromático (fenol), segundo Martin *et al.* (2005) e na região F (1645 cm^{-1})

pode ser interpretada como estiramento da ligação C=O de amida (Pavia *et al.*, 1996, Yang & Yen, 2002, Ivanova & Singh, 2003). Esses dados estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4. Picos de reflectância e alterações das ligações químicas que ocorreram em folhas de *C. arábica*.

Região	Número de onda (cm⁻¹)	Identificação de grupos
A	1075	estiramento da ligação C-N de amina ou deformação da ligação C-O de álcool ou fenol
B	1375	estiramento da ligação C-N de amina
C	1555	deformação angular da ligação N-H de amida ou deformação da ligação C=C de anel aromático (fenol)
D	1520	deformação angular da ligação N-H de amida ou deformação da ligação C=C de anel aromático (fenol)
E	1150	estiramento da ligação C-N de amina ou deformação da ligação C-O de álcool ou fenol
F	1645	estiramento da ligação C=O em amida

Análise de componentes principais

A obtenção de informações dos resultados de um experimento de espectroscopia de infravermelho envolve a análise de um grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno número destas variáveis contém as informações químicas mais relevantes, enquanto a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados. A redução de variáveis, através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística, pode ser conseguida através da análise de componentes principais, que é uma análise de estatística multivariada que tem grande aceitação na análise de dados químicos.

Nesse experimento, a Análise de Componentes Principais foi aplicada com o objetivo de determinar a discriminação entre grupos de amostras de folhas dos cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo (folha controle, metade da folha inoculada e metade da folha não inoculada) nos

intervalos de tempo de 1, 24, 48, 96 e 168 horas após a inoculação com *H. vastatrix*. Os valores de reflectância utilizados como variáveis foram aqueles que apareceram nas regiões de números de onda 1075 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} .

No intervalo de tempo de 1 hora após a inoculação não houve separação entre o grupo de amostras do cultivar Icatu Vermelho (representado por círculos) com o grupo de amostras do cultivar Mundo Novo (representado por quadrados), nas metades inoculadas (I) e não inoculadas (NI) (figura 20). No mesmo gráfico aparecem os *loadings* (representados pelas variáveis) e escores (gráfico bi-plot). Apareceram três grupos distintos: as folhas controle (C) de Icatu Vermelho, as folhas controle de Mundo Novo e as metades não inoculadas de Mundo Novo. Portanto, 1 hora após a inoculação não houve uma diferenciação entre o cultivar resistente (Icatu Vermelho) e suscetível ao fungo (Mundo Novo), porém houve uma separação entre as folhas controle do cultivar Icatu Vermelho e Mundo Novo, assinalando uma diferença que é intrínseca ao cultivar e não devido à inoculação com o fungo.

Às 24 horas após a inoculação não houve qualquer separação entre os cultivares ou entre as folhas controle, metade da folha inoculada ou metade da folha não inoculada com o fungo, como pode ser visto na figura 21.

No intervalo de 48 horas após a inoculação pode-se observar uma discriminação mais pronunciada, com a separação de um grupo de amostras das metades inoculadas da folha do cultivar Icatu Vermelho e o grupo das metades inoculadas da folha do cultivar Mundo Novo (figura 22). Nesse caso, a separação foi principalmente explicada pelo eixo PC1. O grupo de amostras das metades inoculadas da folha do cultivar Icatu Vermelho apresentou maiores valores nas variáveis A (1075 cm^{-1}), B (1375 cm^{-1}) e E (1150 cm^{-1}), (representadas por triângulos). Picos proeminentes nas regiões A e E podem ser interpretados como estiramento da ligação C-N de amina ou deformação da ligação C-O de álcool ou fenol e na região B, pode significar também estiramento da ligação C-N de amina.. O grupo de amostras das metades inoculadas das folhas do cultivar Mundo Novo apresentou maiores valores nas variáveis C (1555 cm^{-1}), D (1520 cm^{-1}) e F (1645 cm^{-1}) (representadas por triângulos). Picos proeminentes nas regiões C ou D podem significar uma deformação angular da ligação N-H de amida ou deformação da ligação C=C de anel aromático (fenol), e na região F, pode ser interpretado como estiramento da ligação C=O de amida. Houve também a discriminação de um grupo das folhas controle do cultivar Mundo

Novo. Essa separação bem distinta entre as metades das folhas inoculadas de Icatu Vermelho e de Mundo Novo mostra que às 48 horas após a inoculação, os dois cultivares apresentaram uma resposta diferenciada ao ataque do fungo. Resultado semelhante foi obtido por Martin *et al.* (2005), onde houve uma clara separação entre olmo controle e inoculado com o fungo *Ophiostoma novo-ulmi*, porém aos 5 dias após a inoculação.

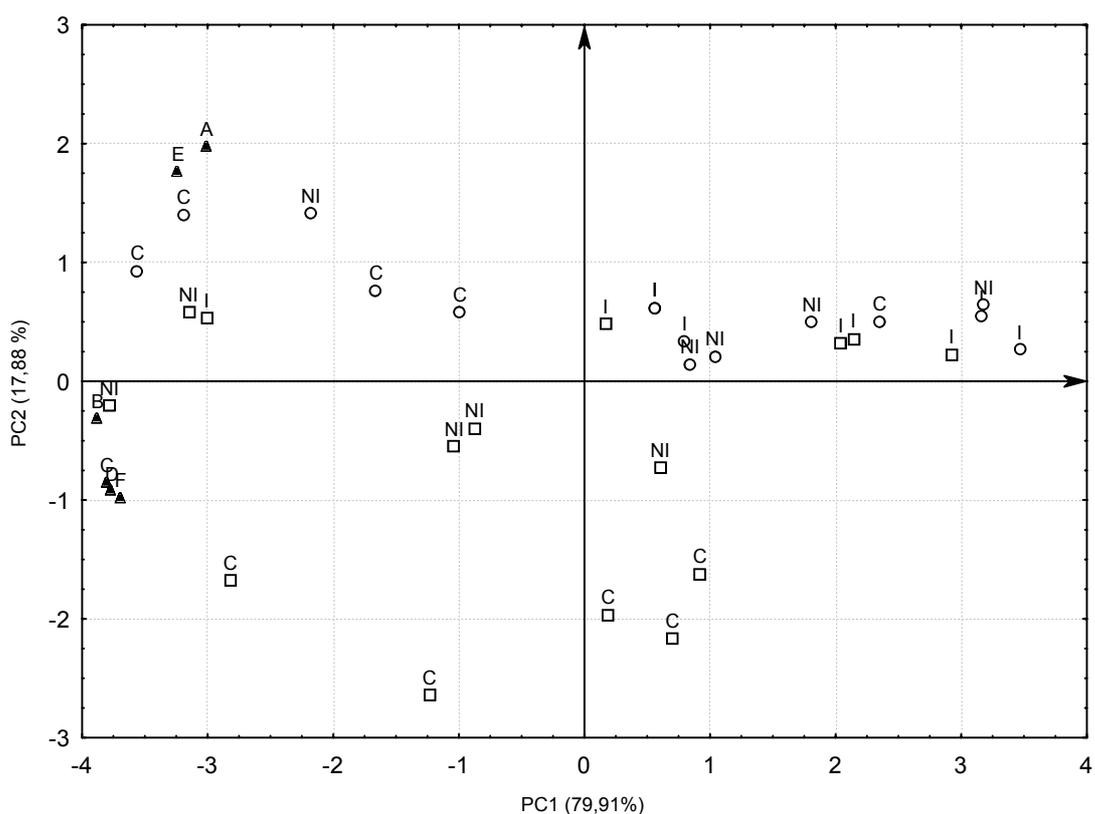


Figura 20. Análise de componentes principais para *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) 1 hora após a inoculação. A, B, C, D, E e F (triângulo) são variáveis com número de onda de 1075 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} , respectivamente.

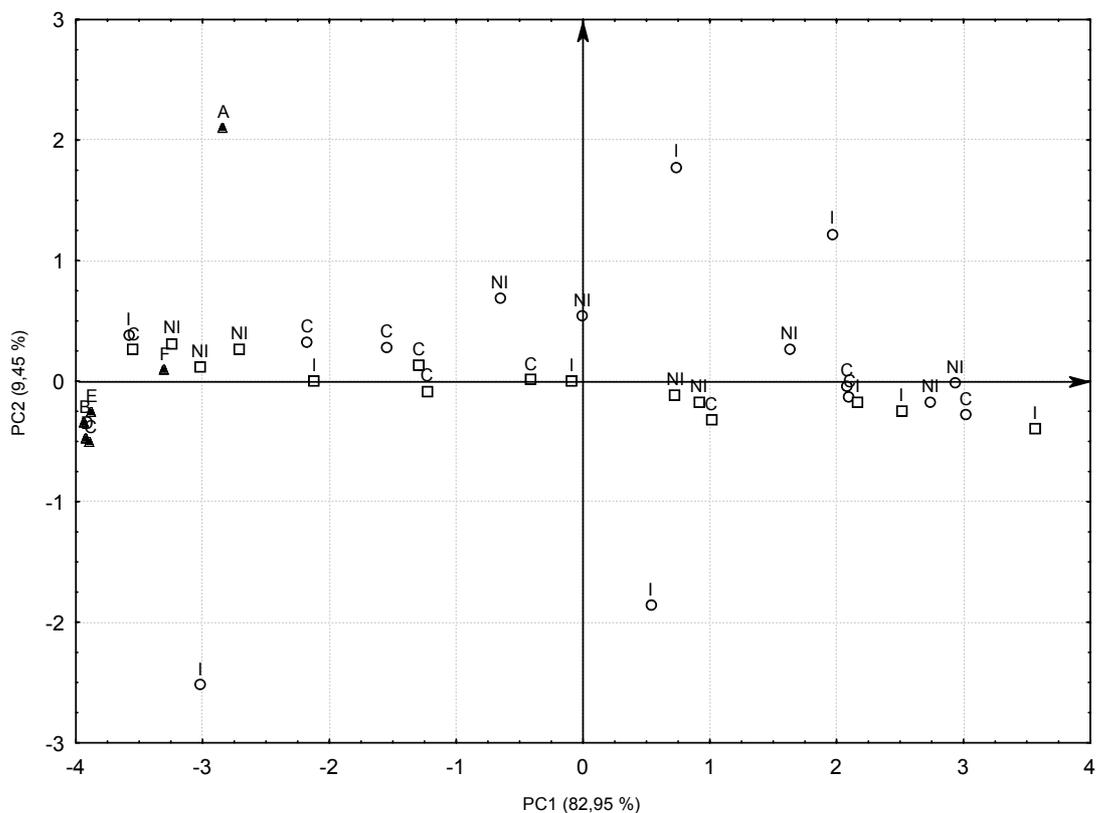


Figura 21. Análise de componentes principais para *C. arabica* cultivares Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) às 24 horas após a inoculação. A, B, C, D, E e F (triângulo) são variáveis com número de onda de 1075 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} , respectivamente.

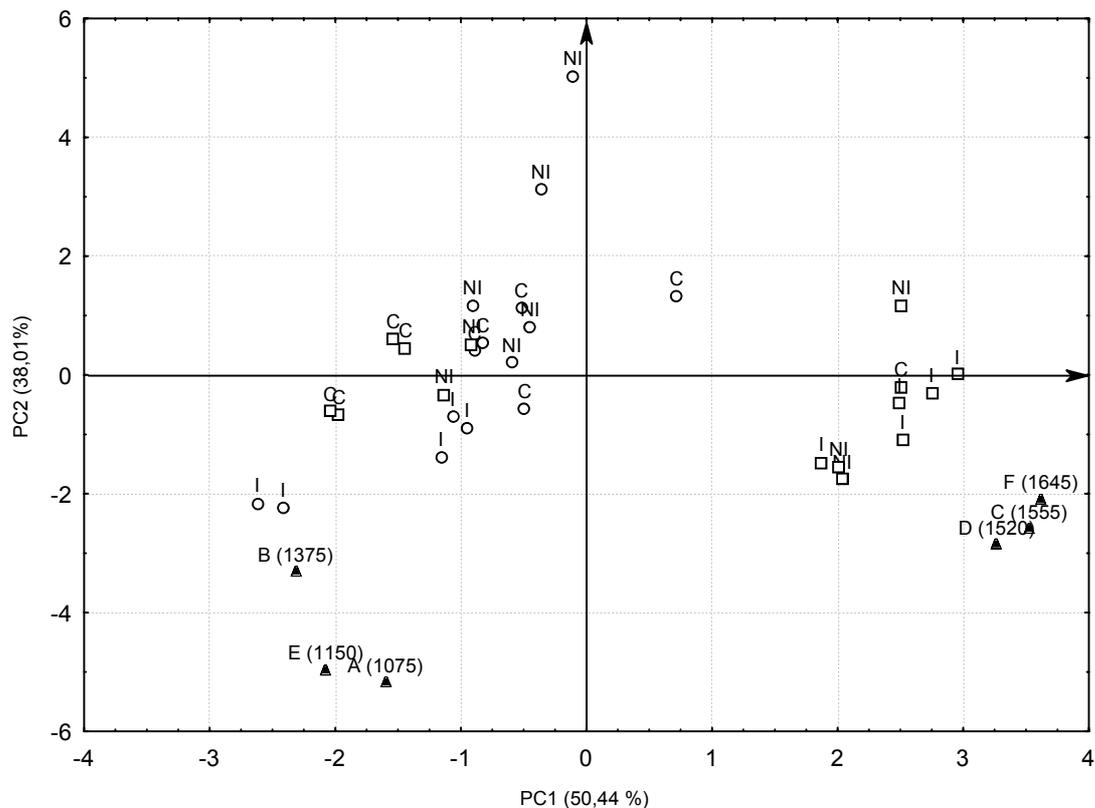


Figura 22. Análise de componentes principais para *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) às 48 horas após a inoculação. A, B, C, D, E e F (triângulo) são variáveis com número de onda de 1075 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} , respectivamente.

No intervalo de 96 horas após a inoculação o único grupo de amostras que se separou dos demais foi o das folhas controle do cultivar Mundo Novo. Portanto não houve uma discriminação entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo e nem entre as folhas inoculadas e não inoculadas com o fungo. Esse resultado pode ser visto na figura 23.

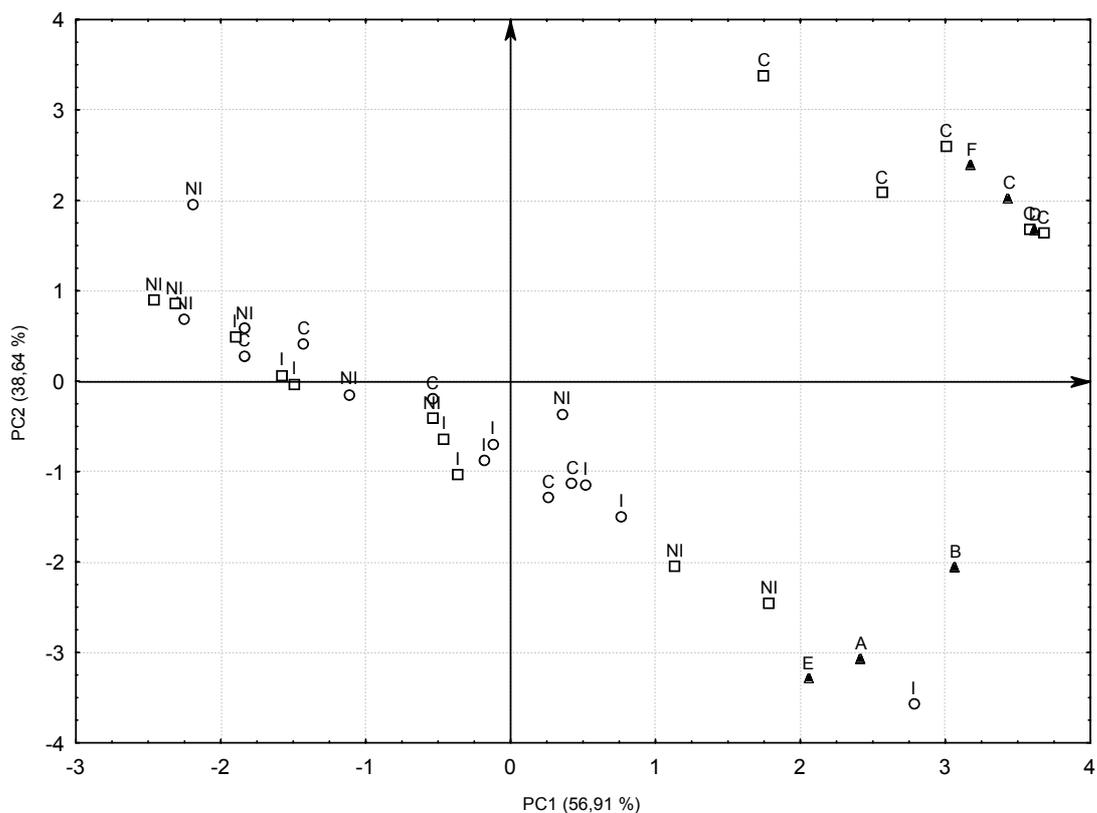


Figura 23. Análise de componentes principais para *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) às 96 horas após a inoculação. A, B, C, D, E e F (triângulo) são variáveis com número de onda de 1075 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} , respectivamente.

No intervalo de 168 horas após a inoculação também não houve separação entre os grupos de amostras, como pode ser visto na figura 24.

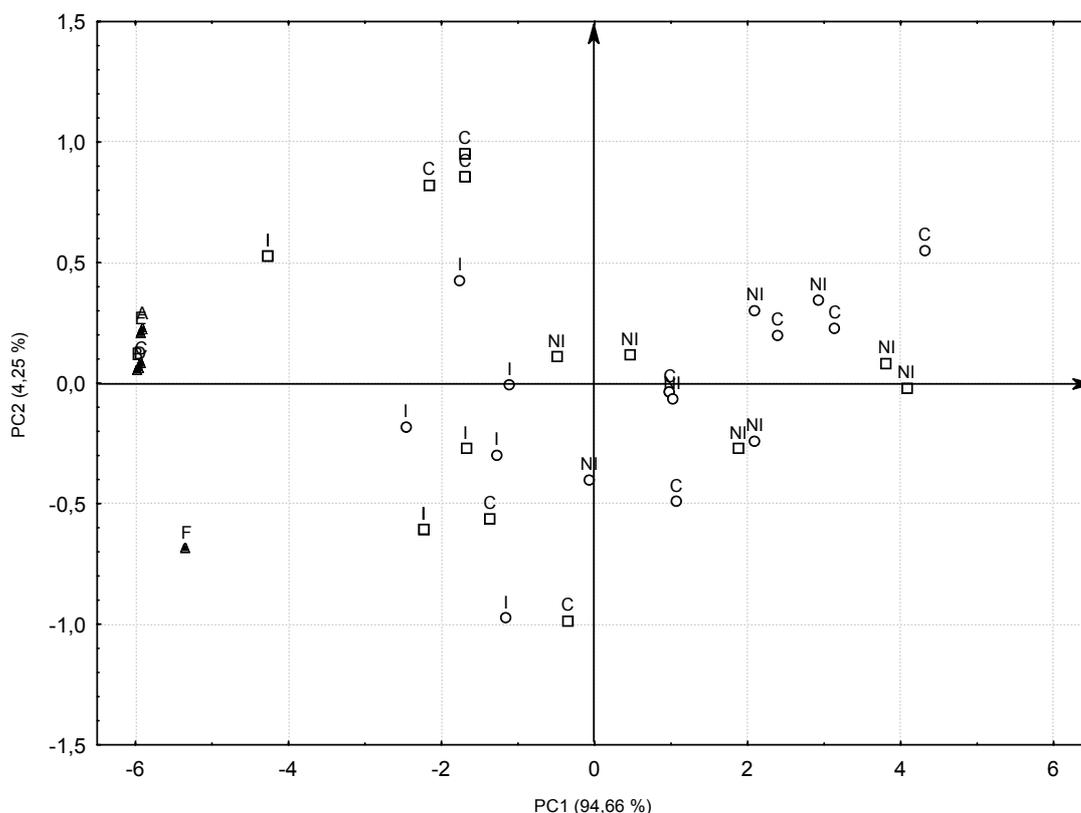


Figura 24. Análise de componentes principais para *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho (círculo) e Mundo Novo (quadrado), na folha controle (C), metade da folha inoculada (I) e metade não inoculada da folha (NI) às 168 horas após a inoculação. A, B, C, D, E e F (triângulo) são variáveis com número de onda de 1075 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} , respectivamente.

Os resultados obtidos pela Análise de Componentes Principais mostram que nos intervalos de tempo de 1 e 24 horas após a inoculação não há uma distinção clara entre os cultivares e nem entre as folhas inoculadas e não inoculadas com o fungo, ocorrendo o mesmo às 96 e 168 horas após a inoculação. O período mais importante para a discriminação das amostras foi 48 horas após a inoculação, onde foi observada uma separação entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo nas metades das folhas que receberam o inóculo do fungo. Antes desse momento (1 e às 24 horas após a inoculação), não são evidentes eventuais alterações metabólicas devido à infecção e após esse intervalo de tempo (96 e 168 horas após a inoculação) os cultivares

parecem não responder mais ao ataque do fungo, ou seja não mudaram seu metabolismo produzindo compostos de defesa. Esse resultado deve-se principalmente ao fato da germinação dos uredosporos e a penetração do haustório no tecido hospedeiro ocorrerem em até 48 horas (Silva *et al.*, 2002) e os principais mecanismos de defesa (aprisionamento do haustório através de deposição de calose e celulose, lignificação e espessamento da parede celular) ocorrem nesse período. Após 48 horas, o fungo já está instalado dentro dos tecidos do hospedeiro, de modo que a folha, que está destacada da planta, já não consegue mais se defender do ataque do patógeno.

Como a análise de componentes principais apenas permite uma melhor visualização de agrupamentos formados, julgou-se necessária realização de uma análise de variância ou comparação das médias dos diferentes tratamentos para efeito de maior rigor estatístico.

Efeito das interações e comparação de médias pelo Teste de Tukey

Com o objetivo de detalhar as diferenças ocorridas entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo, devido ao ataque do fungo, foi feita uma análise de variância comparando os efeitos de cultivar, efeitos de tempo (1, 24, 48, 96 e 168 horas após a inoculação), efeitos de inóculo (ausência de inóculo, presença de inóculo) e as interações cultivar x tempo (CxT), cultivar x inóculo (CxI), tempo x inóculo (TxI) e cultivar x tempo x inóculo (CxTxI) para os picos de reflectância A, B, C, D, E e F do espectro de infravermelho médio.

O efeito da comparação de médias entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo novo, independentemente dos efeitos do período de tempo após a inoculação e presença ou ausência de inóculo, para as regiões A, B e E não foi significativo, isso quer dizer que para essas variáveis, não houve diferença significativa entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo. Para as variáveis C, D e F houve diferença significativa entre os cultivares a 5% de probabilidade. Houve diferença significativa entre os intervalos de tempo após a inoculação para todas as regiões do espectro analisadas, independentemente do efeito dos cultivares e presença ou ausência de inóculo. Na comparação de médias entre ausência e presença de inóculo na folha (tanto a metade que foi inoculada quanto a metade que não recebeu inóculo), independentemente do efeito de cultivares e do período de tempo após a inoculação, somente para a região B o resultado foi não significativo, para as demais regiões do espectro, a diferença foi significativa a 5% de

probabilidade. Para a interação CxT, todas as regiões do espectro analisadas apresentaram diferença significativa a 5% de probabilidade, exceto a região D. Nas demais interações (CxI, TxI e CxTxI) as médias diferiram significativamente entre si para todas as regiões do espectro. Esses resultados são mostrados na tabela 5.

Tabela 5. Resultado do estudo de comparação dos efeitos de cultivar, tempo, inóculo e as interações cultivar x tempo (CxT), cultivar x inóculo (CxI), tempo x inóculo (TxI) e cultivar x tempo x inóculo (CxTxI).

Efeito	G L	Regiões					
		A	B	C	D	E	F
Cultivar	1	1,40 ^{NS}	0,96 ^{NS}	61,84*	40,08*	1,00 ^{NS}	96,136*
Tempo	4	40,82*	43,73*	59,33*	59,38*	40,91*	58,647*
Inóculo	2	4,90*	2,72 ^{NS}	10,27*	11,95*	4,58*	5,855*
C x T	4	3,21*	5,58*	7,35*	1,69 ^{NS}	2,57*	23,742*
C x I	2	5,00*	7,53*	4,17*	5,18*	6,65*	5,241*
T x I	8	3,41*	4,84*	15,32*	12,55*	3,58*	22,116*
C x T x I	8	6,18*	2,44*	18,62*	14,31*	5,41*	21,146*
Resíduo	120	-	-	-	-	-	-
Total	149	-	-	-	-	-	-

NS = Não significativo; * significativo a 5% de probabilidade; GL = graus de liberdade

Para detalhar as diferenças entre médias, quando o teste F foi significativo, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Primeiramente foi feita uma comparação de médias entre os cultivares, independente do efeito do tempo e da presença ou ausência de inoculo para os picos de reflectância A, B, C, D, E e F do espectro de infravermelho médio (tabela 6). Para as regiões do espectro C, D, E e F os valores de reflectância foram significativamente maiores para o cultivar Mundo. A região B (número de onda 1375 cm^{-1}), corresponde a estiramento da ligação C-N de amina, as regiões C (número de onda 1555 cm^{-1}) e D (número de onda 1520 cm^{-1}), corresponde a deformação angular

da ligação N-H de amida ou da ligação C=C de anel aromático (fenol) e região F (número de onda 1645 cm^{-1}), corresponde a estiramento da ligação C=O de amida. O estiramento da ligação C-N de amina sugere alteração nos níveis de poliaminas. Uma deformação da ligação N-H de amida e estiramento da ligação C=O de amida, sugere uma alteração nos níveis de proteínas e deformação da ligação C=C de anel aromático pode significar alteração nos níveis de compostos fenólicos ou hormônios. Este resultado sugere que independentemente dos efeitos do tempo após a inoculação e da presença ou ausência do fungo, no cultivar Mundo Novo ocorre maior produção de poliaminas, compostos fenólicos, hormônios e proteínas.

Tabela 6. Efeito médio das variáveis A, B, C, D, E, F, correspondentes a picos no espectro de infravermelho médio, obtidos para os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo.

Cultivar*	Variáveis (número de onda (cm^{-1}))					
	A (1075)	B (1375)	C (1555)	D (1520)	E (1150)	F (1645)
Icatu Vermelho	1,2335 a	1,0216 a	0,9172 b	0,9469 b	1,2018 b	0,8979 b
Mundo Novo	1,2525 a	1,0336 a	1,0266 a	1,0273 a	1,2179 a	1,0935 a

* Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade.

A comparação de médias entre intervalos de tempo após a inoculação, independentemente do efeito de cultivares e presença ou ausência de inóculo está apresentada na tabela 7. Para todas as regiões do espectro de infravermelho analisadas, os maiores valores ocorreram às 48 horas após a inoculação. Este resultado sugere que independentemente do efeito do cultivar e da presença ou ausência de inóculo, houve um aumento na produção de poliaminas, carboidratos, lignina, compostos fenólicos, homônios e proteínas 48 horas após a inoculação. Esse resultado pode também ser comprovado pela análise dos componentes principais (figura 22).

A comparação de médias entre presença ou ausência de inóculo de *H. vastarix*, independente dos efeitos de cultivar e tempo após a inoculação (tabela 8) mostra que para a os picos C e D, os valores de reflectância foram significativamente menores para a metade não inoculada da folha. Esses picos de reflectância correspondem à deformação angular da ligação N-H de amida ou da ligação C=C de anel aromático (fenol), o que significa que independente do

efeito de cultivar e de tempo, houve uma menor produção de proteínas e compostos fenólicos na metade não inoculada da folha.

Tabela 7. Efeito médio das variáveis A, B, C, D, E, F, correspondentes às leituras no espectro de infravermelho médio, obtidas com amostragens coletadas após diferentes tempos de inoculação com esporos de *H. vastatrix*.

Tempo após inoculação (h)*	Variáveis (número de onda)					
	A (1075)	B (1375)	C (1555)	D (1520)	E (1150)	F (1645)
1	1,1336 d	0,9579 c	0,8820 cd	0,9048 d	1,1003 c	0,8684 c
24	1,1677 cd	0,9279 c	0,8502 d	0,8733 d	1,1266 c	0,8438 c
48	1,4282 a	1,1580 a	1,1367 a	1,1357 a	1,3930 a	1,2378 a
96	1,2274 bc	1,0606 b	1,0513 b	1,0605 b	1,2011 b	1,1092 b
168	1,2581 b	1,0333 b	0,9391 c	0,9610 c	1,2282 b	0,9192 c

* Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Efeito médio das variáveis A, B, C, D, E, F, correspondentes às leituras no espectro de infravermelho médio, obtidas a partir da inoculação de esporos de *H. vastatrix* em folhas de cafeeiros.

Inóculo*	Variáveis (número de onda)					
	A (1075)	B (1375)	C (1555)	D (1520)	E (1150)	F (1645)
Controle	1,2377 ab	1,0372 a	1,0089 a	1,0224 a	1,2086ab	1,0356 a
Metade inoculada	1,2760 a	1,0381 a	0,9920 a	0,9920 a	1,2402 a	0,9992 ab
Metade não inoculada	1,2153 b	1,0073 a	0,9468 b	0,9468 b	1,1807b	0,9523 b

* Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade.

Tabela 9. Efeito médio da interação entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo e o tempo após a inoculação de esporos de *H. vastatrix*.

Pico de reflectância	Cultivar	Tempo após inolação (h)				
		1	24	48	96	168
A (1075 cm ⁻¹)	Icatu	1,1732 bA	1,1536 bA	1,4031 aA	1,2262 bA	1,2115 bA
	Mundo Novo	1,0941 bA	1,1818 bA	1,4533 aA	1,2286 bA	1,3047 bA
B (1375 cm ⁻¹)	Icatu	0,9240 bcA	0,9068 cA	1,1987 aA	1,0751 bA	1,0032 bA
	Mundo Novo	0,9919 aA	0,9492 aA	1,1172 aA	1,0462 aA	1,0633 aA
C (1555 cm ⁻¹)	Icatu	0,8502 bcA	0,8349 cA	1,0348 aB	0,9523 bB	0,9137 bA
	Mundo Novo	0,9138 bA	0,8655 bA	1,2385 aA	1,1502 aA	0,9647 bA
D (1520 cm ⁻¹)	Icatu	0,8696 cA	0,8569 cA	1,0818 aB	0,9974 bB	0,9285 bcA
	Mundo Novo	0,9400 bcA	0,8897 cA	1,1896 aA	1,1235 aA	0,9934 bA
E (1150 cm ⁻¹)	Icatu	1,1290 bA	1,1070 bA	1,3856 aA	1,2076 bA	1,1798 bA
	Mundo Novo	1,0716 dA	1,1461 cdA	1,4004 aA	1,1946 bcA	1,2765 bA
F (1645 cm ⁻¹)	Icatu	0,8348 bA	0,8381 bA	0,9898 aB	0,9308 abB	0,8960 abA
	Mundo Novo	0,9021 cA	0,8494 cA	1,4857 aA	1,2876 bA	0,9425 cA

* Médias de cultivares seguidas por uma mesma letra (maiúscula) não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade; médias de tempo após a inoculação seguidas por uma mesma letra (minúscula) não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade.

A comparação de médias para as interações entre cultivar e presença ou ausência de inóculo do fungo está apresentada na tabela 10. Para as regiões C, D e F, os valores para o cultivar Mundo Novo foram significativamente maiores que para Icatu Vermelho na folha controle, ou seja, na folha controle os níveis de compostos fenólicos, hormônios e proteínas foram maiores para o cultivar Mundo Novo que para Icatu Vermelho. Para a metade da folha que recebeu o inóculo, as maiores médias ocorreram no cultivar Mundo Novo na região F do espectro, indicando um aumento dos níveis de proteínas. Porém, na metade da folha que não recebeu o inóculo, as maiores médias ocorreram para o cultivar Mundo Novo nas regiões do

espectro C, D, E e F. Esses resultados indicam que os níveis de poliaminas, carboidratos, lignina, compostos fenólicos, hormônios e proteínas foram maiores no cultivar Mundo Novo na metade da folha que não recebeu o inóculo. Para a região F, no cultivar Mundo Novo, a folha controle apresentou valores significativamente maiores que para a folha inoculada.

Tabela 10. Efeito médio da interação entre os cultivares Icatu Vermelho e Mundo Novo e presença ou ausência de inóculo de esporos de *H. vastatrix* nas folhas.

Pico de reflectância	Cultivar	Controle	Metade da Folha	
			Inoculada	Não inoculada
A (1075 cm ⁻¹)	Icatu	1,2274 abA	1,2980 aA	1,1752 bA
	Mundo Novo	1,2481 aA	1,2540 aA	1,2553 aA
B (1375 cm ⁻¹)	Icatu	1,0179 abA	1,0655 aA	0,9812 bA
	Mundo Novo	1,0566 aA	1,0107 aA	1,0334 aA
C (1555 cm ⁻¹)	Icatu	0,9275 aB	0,9421 aA	0,8820 aB
	Mundo Novo	1,0902 aA	1,0078 aA	0,9817 bA
D (1520 cm ⁻¹)	Icatu	0,9582 abB	0,9778 aA	0,9046 bB
	Mundo Novo	1,0865 aA	1,0062 aA	0,9891 bA
E (1150 cm ⁻¹)	Icatu	1,1994 aA	1,2687 aA	1,1373 bB
	Mundo Novo	1,2177 aA	1,2118 aA	1,2240 aA
F (1645 cm ⁻¹)	Icatu	0,8924 aB	0,9276 aB	0,8738 aB
	Mundo Novo	1,1789 aA	1,0708 bA	1,0308 bA

* Médias de cultivares seguidas por uma mesma letra (maiúscula) não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade; médias de situação de inoculação seguidas por uma mesma letra (minúscula) não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade.

O resultado mais evidente da comparação de médias para as interações entre presença ou ausência de inóculo e intervalo de tempo após a inoculação, independente do efeito de cultivar é que às 48 horas após a inoculação, as médias para a metade inoculada da folha foram

significativamente maiores que as médias para o controle e para a metade que não foi inoculada, em todas as regiões do espectro analisadas (tabela 11). Assim sendo, os maiores níveis de poliaminas, carboidratos, lignina, compostos fenólicos, hormônios e proteínas foram observados na metade da folha que recebeu o inóculo, independentemente do cultivar.

Tabela 11. Efeito médio da interação entre presença ou ausência de inóculo e o tempo após a inoculação de esporos de *H. vastatrix* nas folhas.

Pico de reflectância	Inóculo	Tempo após inoculação (h)				
		1	24	48	96	168
A (1075 cm ⁻¹)	Controle	1,1301 aA	1,1101 aB	1,1607 aB	1,1766 aB	1,1359 aA
	Metade inoculada	1,1907 cA	1,4282 aA	1,5026 aA	1,3539 abA	1,2166 bcA
	Metade não inoculada	1,2665 abA	1,1991 bB	1,2373 abB	1,3650 aA	1,1719 bA
B (1375 cm ⁻¹)	Controle	0,9999 aAB	0,8917 aC	0,9822 aB	0,9432 aB	0,9141 aB
	Metade inoculada	0,9265 bB	1,1619 aA	1,1738 aA	1,1382 aA	1,0713 aA
	Metade não inoculada	1,0795 abA	1,0312 abcB	1,0098 bcB	1,1314 aA	0,9585 cAB
C (1555 cm ⁻¹)	Controle	0,9393 aA	0,8193 aB	0,8875 aB	0,8518 aB	0,8459 aB
	Metade inoculada	0,8529 cA	1,064 bA	1,2410 aA	1,1051 bA	1,2648 aA
	Metade não inoculada	0,9492 abA	0,9399abAB	0,9245 abB	1,0193 aA	0,8737 bB
D (1520 cm ⁻¹)	Controle	0,9706 aA	0,8351 bC	0,9088 abB	0,8778 abB	0,8685 abB
	Metade inoculada	0,8738 cA	1,0836 bA	1,2222 aA	1,1013 bA	1,2283 aA
	Metade não inoculada	0,9923 abA	0,9608 abB	0,9516 abB	1,0420 aA	0,8895 bB
E (1150 cm ⁻¹)	Controle	1,0994 aA	1,0681 aB	1,1334 a B	1,1432 aB	1,0957 aA
	Metade inoculada	1,1407 cA	1,4097 aA	1,4517 aA	1,3176 abA	1,1815 bcA
	Metade não inoculada	1,2485 abA	1,1733 abB	1,2091 abB	1,3371 aA	1,1382 bA
F (1645 cm ⁻¹)	Controle	0,9195 aA	0,8039 aB	0,8820 aB	0,8425 aB	0,8579 aB
	Metade inoculada	0,8301 dA	1,0505 cA	1,4106 abA	1,2522 bA	1,4731 aA
	Metade não inoculada	0,9233 aA	0,9314 aAB	0,8926 aB	1,0004 aB	0,8648 aB

* Médias de situação de inoculação seguidas por uma mesma letra (maiúscula) não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade; médias de tempo após a inoculação seguidas por uma mesma letra (minúscula) não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade.

A interação tripla, significativa para todas as variáveis analisadas (tabela 4), pode ser interpretada a partir das curvas apresentadas nas figuras 25 e 26. Essas figuras mostram uma

comparação de médias envolvendo a interação tripla dos efeitos de cultivares, intervalo de tempo após a inoculação e presença ou ausência de inóculo (tanto na metade da folha que foi inoculada quanto na metade que não recebeu o inóculo).

Para as regiões A e E (correspondentes a estiramento da ligação C-N de amina ou C-O de álcool ou fenol), o resultado que mais chama a atenção é que 48 horas após a inoculação, na metade da folha que foi inoculada, os valores de reflectância para Icatu Vermelho foram significativamente maiores que os valores para Mundo novo. Infere-se por esse resultado que no cultivar Icatu Vermelho houve maior produção de lignina, celulose e outros carboidratos, poliaminas, hormônios e compostos fenólicos nos locais de infecção (na metade da folha inoculada). Essa resposta era esperada uma vez que o cultivar Icatu Vermelho possui resistência à raça II de *H. vastatrix*. Resultado semelhante foi encontrado por Silva *et al.* (2002) em genótipos de *Coffea* com resistência a *H. vastatrix*. Segundo os autores houve uma resposta ao fungo localizada, com a morte rápida das células do hospedeiro no local da infecção, denominada de reação de hipersensibilidade. Nesses locais houve deposição de calose, celulose, pectina, polissacarídeos e fenóis.

Em diferentes interações patógeno-hospedeiro ocorre a ativação de diversos mecanismos de resistência, tais como alterações estruturais levando ao fortalecimento da parede celular vegetal pelo depósito de calose e lignina (Benhamou & Bélanger, 1998; He *et al.*, 2002) ou pela formação de papila (um agregado citoplasmático) junto à parede celular no local de penetração do patógeno (Besser *et al.*, 2000) e acúmulo de compostos antimicrobianos como fenóis e fitoalexinas (Latunde-Dada & Lucas, 2001). Calose e lignina são polímeros constituídos por β -1,3-glucana e álcoois cinâmicos e a papila é uma estrutura que contém calose e compostos fenólicos (Silué *et al.*, 2002). Os compostos fenólicos têm importância também na formação de fitoalexinas, lignina e antioxidantes (Baker *et al.*, 2005). A indução de genes de defesa em locais distantes do sítio de infecção implica a existência de moléculas sinalizadoras que se movimentam através da planta, denominadas de mensageiros secundários. Hormônios vegetais como o etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico, têm sido apontados como possíveis mensageiros secundários na transdução de sinais moleculares em interação planta-patógeno (Leite *et al.*, 1997). Segundo Feys & Parker (2000) há um aumento de ácido salicílico em plantas logo após a infecção por um patógeno e a aplicação exógena desse hormônio resulta na proteção da planta contra uma ampla

gama de patógenos. Ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno interagem mutuamente e estão envolvidos em uma complexa rede de sinalização (Kunkel & Brooks, 2002).

Para a região B, na folha controle, inicialmente, os valores foram iguais, porém às 24 horas após a inoculação o valor para Mundo Novo permaneceu constante e houve uma queda para Icatu Vermelho. Às 48 horas após a inoculação, o valor para Icatu Vermelho ultrapassou aquele para Mundo Novo. Após esse período, houve uma queda para os valores de Icatu Vermelho e os valores para Mundo Novo permaneceram praticamente constantes. Na metade da folha que recebeu o inóculo, 1 hora após a inoculação, Icatu Vermelho apresentou valor menor que Mundo Novo. Às 24 horas após a inoculação os valores para Icatu Vermelho aumentaram, atingindo o maior pico às 48 horas após a inoculação e, apresentaram queda após esse período. Os valores para Mundo Novo permaneceram mais baixos em todos os períodos, exceto às 168 horas após a inoculação, onde o valor para Icatu Vermelho foi menor. Na metade da folha que não foi inoculada, os valores de reflectância foram mais altos para Mundo Novo 1 hora após a inoculação, porém às 48 horas após a inoculação, os valores se igualaram para os dois cultivares, caindo após esse período. A região B (1375 cm^{-1}) corresponde a estiramento da ligação C-N de amina, o que pode representar alteração do conteúdo de poliaminas. Assim sendo, pode inferir-se que o nível de poliaminas nos locais de infecção com o fungo aumentaram atingindo o maior valor às 48 horas após a inoculação e após esse período, os níveis diminuíram. Isso ocorreu nos dois cultivares, porém em Icatu Vermelho os níveis foram mais altos.

Poliaminas são pequenas moléculas básicas envolvidas no desenvolvimento de plantas pela ativação da síntese de ácidos nucléicos. O metabolismo de poliaminas altera-se em plantas sob estresse abiótico e biótico (Walters, 2003). Em plantas, a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) derivada da oxidação de poliaminas tem sido correlacionada com a maturação e lignificação da parede celular durante o desenvolvimento, bem como na cicatrização da parede celular durante uma invasão de um patógeno (Cona *et al.*, 2006). Como molécula sinal, H_2O_2 derivada da oxidação de poliaminas media a morte celular, a resposta de hipersensibilidade e a expressão de genes de defesa. Além disso, aminoaldeídos e 1,3-diaminopropano, derivados da oxidação de poliaminas estão envolvidos na síntese de metabólitos secundários e na tolerância a estresse abiótico (Cona *et al.*, 2006). Pode-se deduzir por esses resultados que no cultivar Icatu

Vermelho houve um aumento no nível de poliaminas nos locais de penetração do patógeno como uma tentativa da planta se defender do ataque do fungo.

Para as regiões C e D, na folha controle, para ambos os cultivares, os valores de reflectância diminuíram às 24 horas após a inoculação e apresentaram um ligeiro aumento às 48 horas após a inoculação. Porém às 96 horas após a inoculação, Icatu Vermelho apresentou uma queda e Mundo Novo apresentou aumento súbito no valor para reflectância. Após esse período, os valores caíram para os dois cultivares. Na folha que foi inoculada, tanto na metade que recebeu o inóculo quanto na metade que não foi inoculada, os valores de reflectância foram maiores às 48 horas após a inoculação e diminuíram após esse período, sendo que os valores foram maiores para Mundo Novo. Um aumento de reflectância nas regiões C e D representam uma deformação angular da ligação N-H de amida, segundo Yang & Yen (2002) ou deformação da ligação C=C de anel aromático (fenol), segundo Martin *et al.* (2005), o que sugere um aumento nos níveis de proteínas e compostos fenólicos, dessa forma o resultado mostrou que os níveis destes compostos foram maiores para o cultivar Mundo Novo às 48 horas após a inoculação. Pode-se perceber por esse resultado que devido à infecção pelo fungo, a folha antecipa o aumento da produção de proteínas e compostos fenólicos, pois na folha controle esse aumento ocorreu 96 horas após a inoculação e na metade inoculada, ocorreu 48 horas após a inoculação.

Para a região F, na folha controle, os valores para Icatu Vermelho permaneceram praticamente constantes em todo o período de tempo analisado e o cultivar Mundo Novo apresentou um pico às 96 horas após a inoculação. Na folha inoculada, tanto na metade que recebeu o inóculo, quanto na metade que não foi inoculada, os valores para Icatu Vermelho permaneceram praticamente constantes e para Mundo Novo, em ambas as metades da folha, ocorreu um pico de reflectância às 48 horas após a inoculação. Um aumento de reflectância na região F pode significar um aumento do nível de proteínas (Yang & Yen 2002; Ivanova & Singh, 2003). O cultivar Icatu Vermelho mostrou-se constante no nível de proteínas com o ataque do fungo ao longo do tempo, porém o cultivar Mundo Novo respondeu ao ataque do fungo às 48 horas após a inoculação. Pode-se inferir por esse resultado que o cultivar Icatu Vermelho possui resistência constitutiva, uma vez que o contato com o patógeno não alterou o metabolismo de proteínas. Entende-se por resistência constitutiva ou pré-infeccional aqueles mecanismos

estruturais que impedem ou dificultam a penetração do patógeno, como cutícula mais espessa, tricomas e espinhos na superfície da folha e parede celular com alta lignificação, entre outras (Dickson, 2000). O cultivar Mundo Novo, por ser suscetível ao fungo, teve que aumentar a produção de proteínas para tentar se defender do ataque do fungo. Nesse caso também ocorreu uma antecipação no aumento da produção de proteínas de 96 horas (na folha controle) para 48 horas após a inoculação na metade inoculada da folha. Quando um patógeno entra em contato com a planta ocorre ativação de genes de defesa que resulta na síntese de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede fúngica, dentre estas enzimas podem ser citadas as quitinases e as glucanases, enzimas que auxiliam na síntese de lignina como as peroxidases e polifenoloxidasas (Carr & Klessig, 1989) e enzimas que sintetizam fitoalexinas como a fenilalanina amônia-liase (Jones, 1984). Alguns autores descreveram um aumento na atividade de algumas proteínas de café em resposta ao ataque de *H. vastatrix*, tais como lipoxigenase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase (Rojas *et al.*, 1993), quitinases e β -1,3-glucanases (Silva *et al.*, 2002), polifenoloxidase (Melo *et al.*, 2006). Segundo Dickson (2000) ocorre uma rápida polimerização de proteínas ricas em prolina que se depositam na parede celular formando uma barreira resistente contra a infecção por patógenos. O primeiro estágio de resposta de defesa em plantas é caracterizado pela elevação da atividade de peroxidases e insolubilização de proteínas ricas em prolina na parede celular (Brownleader *et al.*, 1995). Essas proteínas podem funcionar na defesa como uma aglutinina microbiana ou propiciando locais para deposição de lignina (Leach *et al.*, 1982). Segundo Dixon & Lamb (1990) em culturas de células de feijão, genes de defesa codificando quitinases e enzimas da via biossintética de fenilpropanóides, envolvidos na síntese de lignina e fitoalexinas, são ativados entre dois e três minutos após o tratamento com elicitor fúngico. Por outro lado, a transcrição de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, as quais contribuem para a rigidez da parede celular, é observada uma hora após a elicitação. Shiraishi *et al.* (1989) relataram a indução de fenilalanina amônia-liase em aveia em resposta ao fungo *Erysiphe graminis*.

A técnica de DRIFTS, apesar de ser uma medida indireta da alteração nos níveis de alguns compostos, uma vez que o espectro somente mostra alterações nas ligações químicas, é uma ferramenta útil para verificar se estão ocorrendo alterações nas plantas em resposta ao ataque de patógenos. A formação de compostos de defesa específicos nas plantas é ativada por

elicitores (compostos liberados por patógenos) e traduzida em uma complexa via de transdução de sinais. Portanto, essa técnica permite observar alterações e fazer uma distinção entre cultivares resistentes e suscetíveis e determinar quando essas alterações começam a ocorrer.

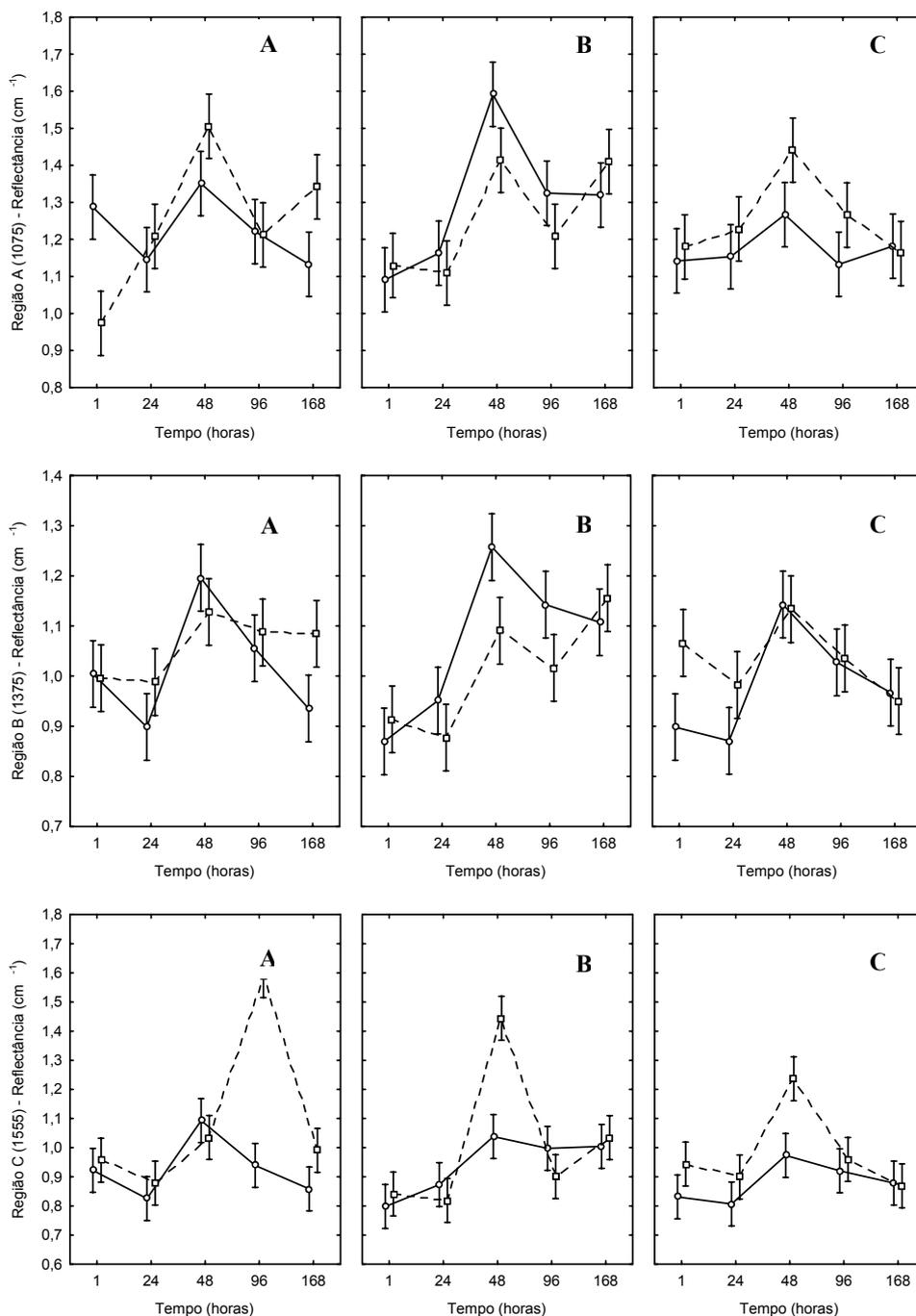


Figura 25. Interação do efeito dos cultivares Icatu Vermelho (—) e Mundo Novo (---). A) Folha inteira sem inóculo utilizada como controle; B) Metade da folha inoculada com esporos de *H. vastatrix*; C) Metade da folha não inoculada com esporos do fungo. Avaliações realizadas em 1, 24, 48, 96 e 168 horas após a inoculação de esporos, em três regiões do espectro de infravermelho (A, B, C).

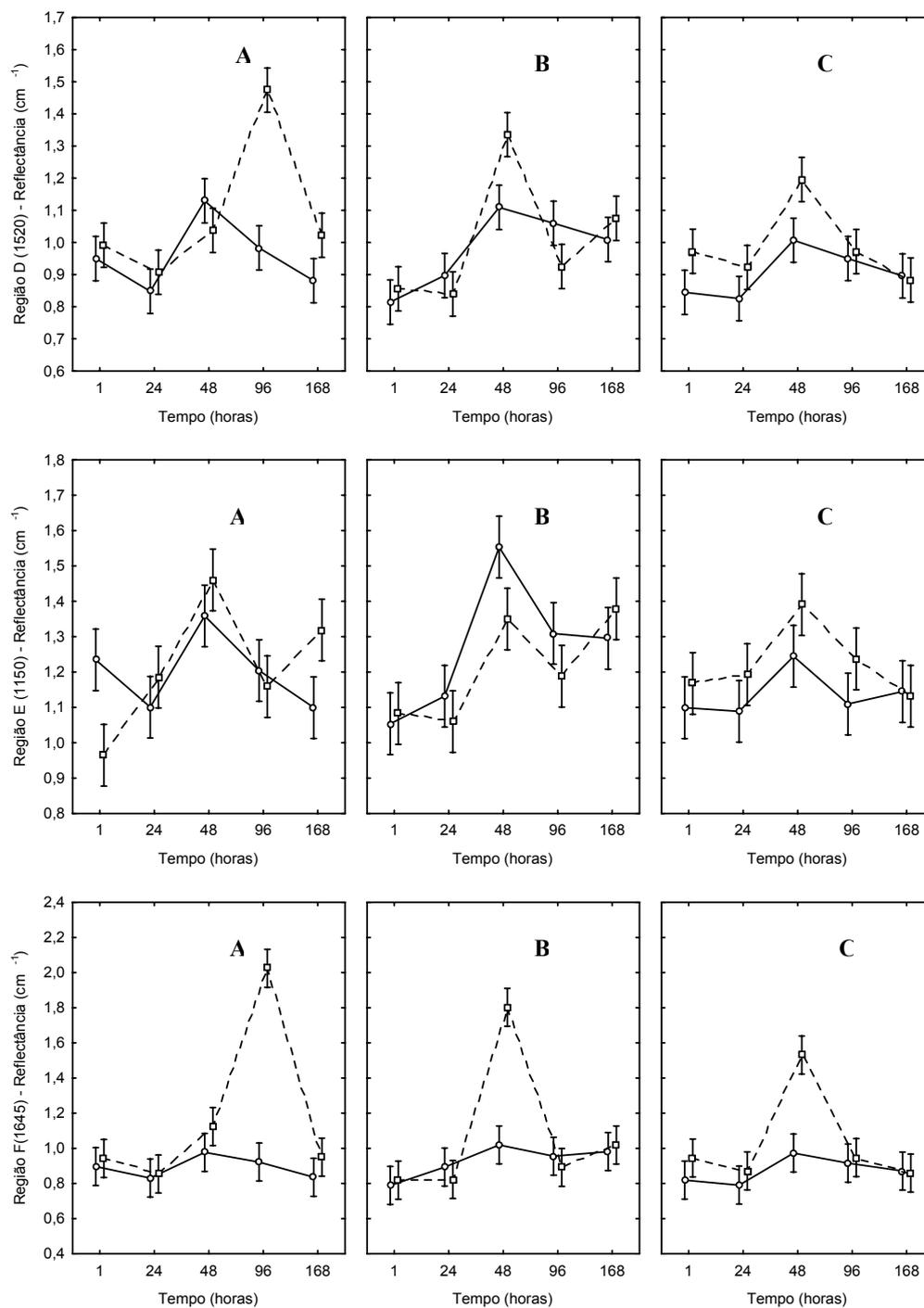


Figura 26. Interação do efeito dos cultivares Icatu Vermelho (—) e Mundo Novo (---). A) Folha inteira sem inóculo utilizada como controle; B) Metade da folha inoculada com esporos de *H. vastatrix*; C) Metade da folha não inoculada com esporos do fungo. Avaliações realizadas em 1, 24, 48, 96 e 168 horas após inoculação de esporos, em três regiões do espectro de infravermelho (D, E, F).

CONCLUSÕES

1. Foram observadas alterações na expressão gênica e mudanças metabólicas em *C. arabica* na presença do fungo *H. vastarix* tanto nos locais de penetração como em tecidos distantes dos sítios de infecção do patógeno.
2. Observou-se um aumento na expressão de cDNAs que codificam para proteínas envolvidas na transdução de sinais (anexina, pirofosfatase e quinase) em locais da folha longe dos sítios de penetração do patógeno. Essas proteínas são sintetizadas com a presença do fungo e promovem uma ativação dos mecanismos de defesa por toda a planta.
3. Os cDNAs que codificam para a HSP70 e FIS1 tiveram um aumento de expressão na metade da folha inoculada com o fungo. HSP70 além de estar envolvida em vários tipos de estresse abiótico, também está relacionada a defesa de plantas contra doenças.
4. O cDNA que codifica para o Citocromo P450 foi reprimido na presença do fungo. Essa enzima está relacionada a vários tipos de estresse e ataque de patógenos.
5. A técnica de DRIFTS mostrou-se eficaz para a verificação de alterações metabólicas em folhas de *C. arabica* em resposta ao fungo *H. vastatrix*.
6. No cultivar Icatu Vermelho houve maior produção de lignina, carboidratos, poliaminas, hormônios e compostos fenólicos nos locais de penetração do patógeno, evidenciando a resistência dessa planta ao fungo, uma vez que esses compostos estão envolvidos em interações planta-patógeno.
7. Nas folhas inoculadas com o fungo, as principais alterações metabólicas ocorreram 48 horas após a inoculação. Esse período mostrou-se importante para a produção de compostos de defesa da planta contra o patógeno.

8. O aumento nos níveis de proteínas e compostos fenólicos ocorreu às 96 horas na folha controle e às 48 horas na folha inoculada, sugerindo que com a presença do fungo ocorreu uma antecipação da produção desses compostos pela folha para se defender do ataque do patógeno.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com a técnica de DRIFTS e de *display* diferencial de mRNA abrem perspectivas para a condução de experimentos que visem à resistência de diferentes cultivares de cafeeiro à ferrugem. Esses experimentos poderiam ser direcionados ao estudo de proteínas relacionadas à resistência, como quitinases e glucanases (que degradam a parede celular do fungo), peroxidases e polifenoloxidasas (que auxiliam na síntese de lignina), fenilalanina amônia-liase (que auxilia na síntese de fitoalexinas), glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (que auxiliam no fortalecimento da parede celular), proteínas como anexina, pirofosfatase e quinase (envolvidas na transdução de sinais) e HSP70 (envolvida em estresse geral). O período ideal para o estudo do comportamento dessas proteínas em diferentes cultivares de cafeeiro seria 48 horas após a inoculação com o fungo *Hemileia vastatrix*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anthony, F.; Combes, M. C.; Astorga, C.; Bertrand, B.; Graziosi, G. ; Lashermes, P. (2002) The origin of cultivated *Coffea* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 104: 894-900.
- Atkins, P. W. (1999) *Físico-Química*. v. 2. 6 ed. LTC Editora S. A., Rio de Janeiro, RJ. p. 382.
- Ayliffe, M. A.; Roberts, J. K.; Mitchell, H. J.; Zhang, R.; Lawrence, G. J.; Ellis, J. G.; Pryor, T. J. (2002) A plant gene up-regulated at rust infection sites. *Plant Physiology* 129: 169-180.
- Azzi, A.; Boscoboinik, D.; Hensey, C. (1992) The protein kinase C family. *European Journal of Biochemistry* 208: 547-557.
- Baker, C J.; Whitaker, B. D.; Roberts, D. P.; Mock, N. M.; Rice, C. P.; Deahl, K. L.; Aver'yanov, A. A. (2005) Induction of redox sensitive extracellular phenolics during plant-bacterial interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:90-98.
- Benhamou, N.; Bélanger, R. R. (1998) Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology* 118: 1203-1212.
- Berbert, P. A.; Queiroz, D. M.; Souza, E. F.; Molina, M. B.; Melo, E. C.; Faroni, L. R. D. (2001) Dielectric properties of parchment coffee. *J. of Agricultural and Engineering Research.* 80 (1): 65-80.
- Besser, K.; Jarosh, B.; Langen, G.; Kogel, K.-H. (2000) Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Molecular Plant Pathology*, 1: 277- 286.
- Blée, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* 7 (7): 315-321.
- Bochu, W.; Jin, Z.; Biao, L.; Daohong, W.; Chuanren, D. (2005) Study of mRNA expression of *Arabidopsis thaliana* under stimulation using modified differential display RT-PCR with silver stining. *Colloids and Surfaces* 40: 31-34.
- Bong-Jun, O.; Kyung-Moon, K.; Kwang, S. K.; Young, S. K.; Lee, H. H.; Woung, B. J.; Kiung, H. I. (2003) Isolation of defense-related genes differentially expressed in the resistance interaction between pepper fruits and the anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecules and Cells* 15 (3): 349-355.

- Bowles, D. J. (1990) Defence-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907.
- Brini, F.; Gaxiola, R. A.; Berkowitz, G. A.; Masmoudi, K. (2005) Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 347-354.
- Brownleader, M. D.; Ahmed, N.; Trevan, M.; Chaplin, M. F.; Dey, P. M. (1995) Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiology* 109: 1115-1123.
- Cantero, A.; Barthakur, S.; Bushart, T. J.; Chou, S.; Morgan, R. O.; Fernandez, M. P.; Clark, G. B.; Roux, S. J. (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 13-24.
- Carvalho, A.; Eskes, A. B.; Castillo, J.; Sreenivasan, M. S.; Echeverri, J. H.; Fernandez, C. E.; Fazuoli, L. C. (1989) Breeding programmes. In: Kushalappa, A. C.; Eskes, A. B. *Coffee rust: epidemiology, resistance and management*. Boca Raton, CRC Press. p. 293-335.
- Carr, J. P.; Klessig, D. F. (1989) The pathogenesis related proteins of plants. In: Setlow, J. K. (ed.) *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Plenum, New York, p. 65-109.
- Chen, Z. J.; Ribeiro, A.; Silva, M. C.; Santos, P.; Guerra-Guimarães, L.; Gouveia, M.; Fernandez, D.; Rodrigues Jr., C. J. (2003) Heat shock-induced susceptibility of green coffee leaves and berries to *Colletotrichum gloeosporioides* and its association to *PR* and *hsp 70* gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 181-190.
- Cheong, Y. H.; Chang, H.; Gupta, R.; Wang, X.; Zhu, T.; Luan, S. (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 661-677.
- Clark, G. B.; Roux, S. J. (1995) Annexins in plant cells. *Plant Physiology* 109: 1133-1139.
- Cona, A.; Rea, G.; Angelini, R.; Botta, M.; Corelli, F. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defense. *Trends in Plant Science* 11: 80-88.
- Conagin, C. H. T. M.; Mendes, A. J. T. (1961) Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia* 20 (2): 787-804.

- Cordeiro, M. C. R.; Grossi, de Sá, M. F. (2000) Biotecnologia e resistência a patógenos - Interação planta-patógeno e o uso da biotecnologia na obtenção de plantas resistentes. *Biotecnologia* 10.
- Cros, J.; Combes, M. C.; Trouslot, P.; Anthony, F.; Hamon, S.; Charrier, A.; Lashermes, P. (1998) Phylogenetic Analysis of Chloroplast DNA Variation in *Coffea* L. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9 (1): 109– 117.
- Dae-Kyun, R.; Gen-Ichiro, A.; Stephen, Y. W. L.; Edward, P ; Jörg, B. (2005) Loblolly pine abietadienol/abietadienal oxidase PtAO (CYP720B1) is a multifunctional, multisubstrate cytochrome P450 monooxygenase. *PNAS* 102 (22): 8060-8065.
- Dangl, J. L. (1998) Plants just say no to pathogens. *Nature* 394: 525-527.
- Dangl, J. L. (1995) Pièce de résistance: novel classes of plant resistance genes. *Cell* 80: 363-366.
- De Wit, P. J. M. (1992) Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant fungus interaction and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 30: 391-418.
- Deuschle, K.; Funck, D.; Hellmann, H.; Däschner, K.; Binder, S.; Frommer, W. B. (2001) A nuclear gene encoding mitochondrial Δ^1 -pyrroline-5 carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant Journal* 27: 345-355.
- Dickson, W. C. (2000) Integrative plant anatomy. Harcourt Academy: San Diego. 533 p.
- Dixon, R. A.; Lamb, C. J. (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 338-367.
- Downey, G. (1998) Food and food ingredient authentication by mid-infrared spectroscopy and chemometrics. *Trends in Analytical Chemistry* 17: 418-424.
- Fazuoli, L. C. (1986) Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A. B.; Malavolta, E.; Rocha, M.; Yamada, T. *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. p. 447.
- Fazuoli, L.C. (1991) Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência a *Hemileia vastatrix*. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia.

- Fazuoli, L. C.; Medina Filho, H. P.; Gonçalves, W.; Guerreiro Filho, O.; Silvarolla, M. B. (2002) Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agronômico de Campinas. In: Zambolim, L. O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa: UFV. p. 163-215.
- Fernandez, D.; Santos, P.; Agostini, C.; Bom, M.-C.; Petitot, A.-S.; Silva, M. C.; Guerra-Guimarães, L.; Ribeiro, A.; Argout, X.; Nicole, M. (2004) Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* 5: 527-536.
- Ferrarini, H. (2004) Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. p. 107.
- Feys, B. J.; Parker, J. E. (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trend in Genetics* 16: 449-455.
- Fiehn, O. (2002) Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155-171.
- Flor, H. H.; Comstock, V. E. (1971) Development of flax cultivars with multiple rust resistance conditioning genes. *Crop Science* 11: 64-66.
- Fukuda, A.; Chiba, K.; Maeda, M.; Nakamura, A.; Maeshima, M.; Tanaka, Y. (2004) Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *Journal of Experimental Botany* 55 (397): 585-594.
- Gaxiola, R. A.; Li, J.; Undurraga, S.; Dang, L. M.; Allen, G. J. ; Alper, S. L.; Fink, G. R. (2001) Drought and salt tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺ pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 11444-11449.
- Gidman, E.; Goodacre, R.; Emmet, B. ; Smith, A. R.; Gwynn-Jones, D. (2003) Investigating plant-plant interference by metabolic fingerprinting. *Phytochemistry* 63: 705-710.
- Glazebrook, J.; Zook, M.; Mert, F.; Kagan, I.; Rogers, E. E.; Crute, I. R.; Holub, E. B.; Hammerschmidt, R.; Ausubel, F. M. (1997) Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* 146: 381-392.

- Godoy, C. V.; Bergamin Filho, A.; Salgado, C. L. (1997) Doenças do cafeeiro. In: Kimati, H.; Amorin, L.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. Manual de Fitopatologia. 3 ed., v.ol. 2 . São Paulo, Agronômica Ceres. p. 774.
- Gorecka, K. M.; Konopka-Postupolska, D.; Hennig, J.; Buchet, R.; Pikula, S. (2005) Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. Biochemical and Biophysical Research Communications 336: 868-875.
- Guzzo, S. D.; Martins, E. M. F. (1996) Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. Journal of Phytopathology 144: 449-454.
- Guzzo, S. D.; Harakava, R. (2002) Isolamento de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida em cafeeiros contra a ferrugem. XXVIII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambú p. 368-369.
- Hammerschmidt, R.; Métraux, J. P.; Van Loon, L. C. (2001) Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. European Journal of Plant Pathology 107: 1-6.
- Havelda, Z.; Maule, A. J. (2000) Complex spatial responses to Cucumber Mosaic Virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. The plant cell 12: 1975-1985.
- He, C. Y.; Hsiang, T.; Wolyn, D. J. (2002) Induction of systemic disease resistance and pathogen defense responses in *Asparagus officinalis* inoculated with non pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Plant Pathology, 51: 225-230.
- Inagaki, N.; Yamamoto, Y.; Mori, H.; Satoh, K. (1996) Carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein: cloning and sequencing of the spinach cDNA. Plant Molecular Biology 30: 39-50.
- Inagaki, N.; Yamamoto, Y.; Satoh, K. (2001) A sequential two-step proteolytic process in the carboxyl-terminal truncation of precursor D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC6803. FEBS Letters. v. 509. p. 197-201.
- Ivanova, D. G.; Singh, B. R. (2003) Nondestructive FTIR monitoring of leaf senescence and elicitor-induced changes in plant leaves. Biopolymers (Biospectroscopy) 72: 79-85.
- Johnson, H. E.; Broadhurst, D.; Goodacre, R.; Smith, A. R. (2003) Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. Phytochemistry 62: 919-928.

- Johnson, H. E.; Broadhurst, D.; Kell, D. B.; Theodorou, M. K.; Merry, R. J.; Griffith, G. W. (2004) High-throughput metabolic fingerprinting of legume silage fermentation via Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1583-1592.
- Jones, D. H. (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry* 23: 1349-59.
- Kamnev, A. A.; Antonyuk, L. P.; Tugarova, A. V.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G.; Gardiner, P. H. E. (2002) Fourier transform infrared spectroscopic characterization of heavy metal-induced metabolic changes in the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7. *Journal of Molecular Structure* 610: 127-131.
- Kandel, S.; Morant, M.; Benveniste, I.; Blée, E.; Werck-Reichhart, D.; Pinot, F. (2005) Cloning, functional expression, and characterization of CYP709C1, the sub-terminal hydroxylase of long chain fatty acid in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (43): 35881-35889.
- Karlsson, M.; Olson, A.; Stenlid, J. (2003) Expressed sequences from the basidiomycetous tree pathogen *Heterobasidion annosum* during early infection of scots pine. *Fungal Genetics and Biology* 39: 51-59.
- Kos, G.; Lohninger, H.; Krska, R. (2003) Development of a method for the determination of *Fusarium* fungi on corn using mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection and chemometrics. *Analytical Chemistry* 75: 1211-1217.
- Kovács, I.; Ayaydin, F.; Oberschall, A. (1998) Immunolocalization of a novel annexin like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfafa. *The Plant Journal* 15: 185-197.
- Krug, C. A.; Mendes, J. E. T.; Carvalho, A. (1939) *Taxonomia de Coffea arabica L.: descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo*. Campinas, Instituto Agrônômico, 57 p. (Boletim técnico, 62).
- Kunkel, B. N.; Brooks, D. M. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 325-331.
- Kushalappa, A. C.; Eskes, A. B. (1989). *Advances in coffee rust research*. *Annual Review of Phytopathology* 27: 503-531.

- Kushalappa, A. C.; Eskes, A. B. (1989) Coffee rust: epidemiology, resistance and management. Boca Raton, CRC Press. p. 293-335.
- Latunde-Dada, A. O.; Lucas, J. A. (2001) The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 199-208.
- Laxalt, A. M.; Munnik, T. (2002) Phospholipid signalling in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 1-7.
- Leach, J. E.; Cantrell, M. A.; Sequeira, L. (1982) Hydroxyproline-rich bacterial agglutinin from potato. *Plant Physiology* 70: 1353-1358.
- Lee, G. J.; Vierling, E. (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reinvigorate a heat-denatured protein. *Plant Physiology* 122: 189-197.
- Lee, S.; Lee, E. J.; Yang, E. J.; Lee, J. E.; Park, A. R.; Song, W. H.; Park, O. K. (2004) Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 1379-91.
- Leite, B.; Roncato, L. D. B.; Pascholati, S. F.; Lambais, M. R. (1997) Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. *RAPP* 5: 235-280.
- Livak, K.; Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Lu, C.; Zhang, J. (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 1199-1206.
- Martín, J. A.; Solla, A.; Coimbra, M. A.; Gil, L. (2005) Metabolic distinction of *Ulmus minor* xylem tissues after inoculation with *Ophiostoma novo-ulmi*. *Phytochemistry* 66: 2458-2467.
- Martins, E. M. F. (1998) Seqüência de eventos primários do desenvolvimento de *Hemileia vastarix* em folhas de cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. Dissertação de Mestrado – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. p. 149.
- Matiello, J. B.; Santinato, R.; Garcia, A. W. R.; Almeida, S. R.; Fernandes, D. R. (2002) Cultura de café no Brasil. Novo manual de recomendações. In: Matiello, J. B. MAPA/PROCAFÉ. Rio de Janeiro. p. 387.

- Matsumura, H.; Reich, S.; Ito, A.; Saitoh, H.; Kamoun, S.; Winter, P.; Kahl, G.; Reuter, M.; Detlev, H. K.; Terauchi, R. (2003) Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *PNAS* 100 (26): 15718-723.
- Maxemiuc-Naccache, V.; Braga, M. R.; Dietrich, S. M. C. (1992) Chitinase and β -1,3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastarix*). *Revista Brasileira de Botânica* 15: 145-150.
- Mazzafera, P.; Crozier, A.; Magalhães, A. C. (1991) Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee. *Phytochemistry* 30(12): 3913-3916.
- Melo, G. A.; Shimizu, M. M.; Mazzafera, P. (2006) Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry* 67: 277-285.
- Mendes, L. C.; Menezes, H. C.; Silva, A. A. P. (2001) Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora* conillon) using acceptability testes and RSM. *Food Quality and Preference* 12: 153-162.
- Monsoor, M. A.; Kalapathy, U.; Proctor, A. (2001) Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 74: 233-238.
- Moraes, S.A. (1983) A ferrugem do cafeeiro: importância, condições predisponentes, evolução e situação no Brasil. Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas. p. 50.
- Narusaka, Y.; Narusaka, M.; Seki, M.; Umezawa, T. ; Ishida, J. (2004) Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 55: 327-342.
- Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
- Pandey, K. K.; Pitman, A. J. (2003) FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52: 151-160.
- Papenbrock, J.; Grimm, B. (2001) Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis - studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta* 213: 667– 681.

- Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. (1996) Infrared spectroscopy. In: Introduction to spectroscopy – A guide for students of organic chemistry. Harcourt Brace College Publishers. p. 14-95.
- Precott, A.; Martin, C. (1987) Rapid method for quantitative assessment of levels of specific mRNAs. *Plant Molecular and Biology Report* 4: 219-222.
- Roberts, J. K.; Pryor, A. (1995) Isolation of a flax (*Linum usitatissimum*) gene induced during susceptible infection by flax rust (*Melampsora lini*). *The Plant Journal* 8: 1-8.
- Rojas, M. L.; Montes de Gómez, V.; Ocampo, C. A. (2003) Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 209-219.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. E. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sawada, H.; Shim, I.-S.; Usui, K. (2006) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis-Modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Science* 171: 263-270.
- Schenk, P. M.; Kazan, K.; Wilson, I.; Anderson, J. P.; Richmond, T.; Somerville, S. C.; Manners, J. M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 97: 11655-60.
- Schmitt, J.; Flemming, H. (1998) FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41: 1-11.
- Schroda, M.; Kropat, J.; Oster, U.; Rüdiger, W.; Vallon, O.; Wollman, F. A.; Beck, C. F. (2001) Possible role of molecular chaperones in assembly and repair of photosystem II. *Biochemical Society Transactions* 29: 413-418.
- Shiraishi, T.; Yamaoka, N.; Kunoh, H. (1989) Association between increased phenylalanine ammonia-lyase activity and cinnamic acid synthesis and the induction of temporary inaccessibility caused by *Erysiphe graminis* primary germ tube penetration of the barley leaf. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34:75-83.
- Silué, D.; Pajot, E.; Cohen, Y. (2002) Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by D-L- β -amino-n-butanoic acid (BABA). *Plant Pathology* 51: 97-102.

- Silva, M. C.; Nicole, M.; Guerra-Guimarães, L.; Rodrigues Jr., C. J. (2002) Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 169-183.
- Silva, M. C.; Várzea, V. M. P.; Marques, D. V.; Guerra-Guimarães, L.; Nicole, M.; Coelho, D.; Geiger, J. P.; Rodrigues Jr., C. J. (2000) The role of peroxidase activity in the hypersensitive reaction of *Coffea arabica* plants with complete resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *International Symposium on Durable Resistance: Key to Sustainable Agriculture*. Ede-Wageningen. p. 59.
- Smigocki, A. C.; Wilson, D. (2004) Pest and disease resistance enhanced by heterologous suppression of a *Nicotiana plumbaginifolia* cytochrome P450 gene CYP72A2. *Biotechnology Letters* 26: 1809-1814.
- Snyder, B. A.; Nicholson, R. L. (1990) Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science* 248: 1637-1639.
- Souillac, P. O.; Middaugh, C. R.; Rytting, J. H. (2002) Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state 2. Diffuse reflectance FTIR studies. *International Journal of Pharmaceutics* 235: 207-218.
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Metraux, J. P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270.
- Stitt, M. (1998) Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Bot. Acta* 111: 167-175.
- Taiz L; Zeiger E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3 Ed. Artmed. Porto Alegre. 720p.
- Van Der Vossen, H. A. M. (2001) *Agronomy I: coffee breeding practices*. In: Clarke, R. J.; Vitzthum, O. G. *Coffee: recent developments*. Blackwell Science, Oxford. p. 184-201.
- Walters, D. R (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* 64: 97-107.
- Watson, C. J.; Froehlich, J. E.; Josefsson, C. A.; Chapple, C.; Durst, F.; Benveniste, I.; Coolbaugh, R. C. (2001) Localization of CYP86B1 in the outer envelope of chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 42: 873– 878.
- Wilson, R. H.; Smith, A. C.; Kacuraková, M.; Saunders, P. K.; Wellner, N.; Waldron, K. W. (2000) The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Plant Physiology* 124: 397-405.

- Xu, N.; Johns, B.; Pullman, G.; Cairney, J. (1997) Rapid and reliable differential display from minute amounts of tissue: mass cloning and characterization of differentially expressed genes from Loblolly pine embryos. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:377-391.
- Yamamoto, Y.; Inagaki, N.; Satoh, K. (2001) Overexpression and characterization of carboxyl-terminal processing protease for precursor D1 protein. *Journal of Biological Chemistry* 276: 7518-7525.
- Yang, J.; Yen, H. E. (2002) Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of Ice Plant and *Arabidopsis*. A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Plant Physiology* 130: 1032-1042.
- Yu, L.; Setter, T. (2003) Comparative transcriptional profiling of placenta and endosperm in developing maize kernels in response to water deficit. *Plant Physiology* 131: 568-582.
- Zambolim, L.; Vale, F. X. R.; Costa, H.; Pereira, A. A.; Chaves, G. M. (2002) Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: Zambolim, L. O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa. p. 369-450.
- Zhang, C.; Guy, C. L. (2006) In vitro evidence of Hsc70 functioning as a molecular chaperone during cold stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 844-850.

ANEXO

Seqüências dos cDNAs de *Coffea arabica* cultivar Icatu Vermelho

GC2

GAGTGGTGACACATCAGGGCACTACAAGAACTTCTTAATGACGTTGCTGTGTGGAAAGATTTGAT
TCAATTTGTCTCACCATAGTCTTCATGTTTTCTTGTAATTAATTAGCTCTGGTACATGGATTTGG
TATTAAGCGTAAGAAATGCTGCTTTGCTTGGGATGCTTTTAGCATTTACTAGTTGAAGAACCAC
TGGTATTGTATGCATTTTCACTTTTGCTACCTGTTTCCAAGTAATACAGAATAAATATTGTTGCC
GAAAAAAAAAAAA

GC3

GAGTGGTGACCAGGCCACTGAAGCAGAATACGAAGAGGTGAAGAAGTAGATTGCTGATAATGGTA
GGAGGCCAATATGAGATTGCTCTCAAAGGTTTTTTCTTGTTTGCAGGAGTAGAAGTTAATTAATC
CGTTTTGTATTTAACTTGAAGCTTAGCTTTGGCTGTACTGGAAGCACTAATTGATCTTGTGAA
GTCCAAAACCTCAGTGGTAGATTGCTAAGTGAGATTTTGCAGTCGCAGCACCCATTTGCCAAA
AAAAAAAAA

GD1

GAGTGGTGACGAAGGGCATGAGGTCTCAAAATCCGCAGAGAAAGCTGATGACAAGACTGATGAAG
GGGTGAAGTCATCAGAAGAGAAGGCTCCTGGACCAAGCTCCTGAAGGCTTTGGCAGATTTGCATG
CAGCTGCAACTTTTTGAGTTTTGGCGAATTATAGTTCTTGGCTACGTGGTATTCAAAGGAAGCAT
GCTGTTTTAGCAAGAGTGAAGGTCCCCTTGATCTAGATTTAGTGTTGAAAACATTATTGTTTGT
CCTCTCATTTGGGAGGAGCTGTGATCGTACTTTCCAAAGATTCCGAGTGTTGTATTTCTAGCAA
TTTTCAATGATAAACATGATAACTAAAAATGCATGTAATTTTGGTTGGGATTATAACAATCACTTCA
ATGCGAAAAAAAAAAAA

GD3

TAATCCCATAGAGATGTTAAACCTTTCGCCTGTAAATTCAATGAATGAATTACCTCTCGATGGTT
TTGAATCGGATCAATATCATGAATAACAATATCTGAGCTATCAAATAAATTCGTCGTCGAAAATG
GAATAGTATAACATAGGAAGTTCTTTTATCCATAACCGAATTCCAACCAGTATTCCTGACCCAAT
CCATAATTCCTTTATTTGGTTCCGTTCTTTTTTCTATAACCTACCCTCCGCCTTTCGTGTACAA
TAATCTGATCAAGTATCATCAGATCGCCCTTCCACTTTCATTAGTCACGCAGTTACAAGTCCAAA
AAAAAAAAA

GD4

GGTGACGTCTATGTTGGCGGTAGCACTGGCCTGGCAATCTGGGCAGTTACCCTGGCTGGCATTC
TGGCAGGAGGTGCTCTACTGGTTTACAACACCAGTGCTTTGGTACAGTAGACAATTGCCCTGT
AATCCATGTGACATTATAGCTTGTATCCAGGAATTGTTCCCAAAAACATGGATCATATATTTTGT

TGGGATCAAACCTCGTTTTTCAGCTTGTGTCATGTTAAATGTAAGCATACTTTTTTTTACCATGAT
TATTTCTGATGTGTGATTAGCATCTTTTCCCAA

GH1X

GAGTGGTGACCATATATCAACTGGGGACAAAGATGCTATCCTACTTTTCAAGGCAGCTGTCTATT
TTAGTCTCCATCTTACACCACCCTTCGCTTCGTGAATTTCTCACCACAATCAATGAGCTTCCAAG
TTAGTTTATAGCTAGTTGAACATTATTTTTGACGAGTCGATGGTGATGATGATGATAATTGTGAT
CACTGCAGAGTTGAGAACAGATGTAGTATGACAGTTTGTAAACAGTTAGATTCCCTAGCTTCTGCTG
TAACGTCATTATTCTTGGCTGATGAGAGCAATAGCATGGTTCGAACTGGGGATGTGGCTTATACTT
GACTGTTTGCTTAAGAGTTCAGACGGAGTGTGTGCTTGTCTTGTGTTTGTAGTATTACTTTTTTATC
CTCGAAAGAAAAACAAGATTTTCTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

GH4

GAGAGTGGTGACTTCAAATTCAGATGGAGAAGCTAATTCCTGATGAGAAGATAATAAATCTTGC
ATCCCCTACTCCTGTGGATGGTCTCCCTGTTGACTCCAACGCCACAATGTTTAAATATTATTTA
GTTAAGTAATTAGTATTTTAAAGTTTACATTTATACTCCAATAATTGATCCTATAATCAATCTAT
ATTTGCATGGCTTAGGGTCTTATGTTACCCATTTCGATCTCATGTTACACTATATTACATAACTTT
TCAAATAGCAAGTGTCTGTACGAGAGATTCTTAGCTATTATTACATGGGACCTTCGCCTGTT
TGCATTATTGTACCATATATACGTGTAACAGTTGGGTGTATTAATCATATGCTACATCTTTTTTC
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

GI1

GAGTGGTGACACAGAGGCTAGAGATAACGTGGACACCCATTTTATTTGTTTCACATGTGTGAATG
GACAACCTTATGAGCTTGATGGAAGGAGGTCCGGACCAGTTTCACATGGTTCTTCCTCTTCAAGC
AGCTTGTTCATGATGCAGCTAAGGTTATTTCGGAAGATGATGGAGAAAAACCCAGATTCATAAAA
CTTCAACGTGATGGCCATTTCTAAAAGTGTTCGAGGAGAATAGACGATACAACATGAACATCCAT
TGCTGCCATTGAGAAGTTGACCCACCTGGCTCTACCAGCTTCTTGGCCTAAACCATGAGGACTGT
TATCGTTATTACATGTAATGACAGAACCAGTTTACCAGAATATTTAAGTCTGGAAGAAGTCAGC
TGTAACCTCACAAAACCTAAGTAGGTAATATGTTTGCTGATAGTAAATGATGACTAGTTACTGCCAA
AAAAAAAAAAAA

GI2

GAGTGGTGACCAGGCCACGAAGCAGAATCGAAGAGGTGAAGAAGTAGATTGCTGATAATGGTAGG
AGGCGAATATGAGATTGCTCTCAAAGTTTTTTCTTGTGTTGCGGAGTAGAAGTTAATTAATCCG
TTTTGTATTTAAACTTGGAAGCTTAGCTTTGGCTGTACTGGAAGCACTAATTGATCTTGTGAGTC
CAAACCTTCAGTGGTAGATTGCTAAGTGAAGTTTTTGCAGTCGCAGCACCCATTTGCTAATGAAG
TAGGCCCTGTGGTGTGGTTATCGCGTCAATAAATATGTTGTTTTGGATGGCATGCAATTGACGTG
GGTCGGTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

GI3

GAGTGGTGACTATTGTCCAGTTTTGTTTCATGATGAAGGTCTCGTATTTTTATATTGGTATGTCA
 CTTGTGTTTTTTGGCTGACATGATTGTGTAATGCAGTTCTATGCTAGCAAGAAAAGCTGCCGGAGT
 TAAAAGCGGAACATATGAGCTTTGCATTTTTTTGGCTGTTGTATAGTAGTATAGAGTATCAGTTTG
 ATCCGTCTTCCCCTGCTTGGTTTTCTCTGATTTATTGCATGCTTCTTTTTAGCCTTTAGCTAGTTT
 GTCTTTGGTACCTCAGCCTGGATGCCAAGCATATAAAATCATTGCTACTTTCATTGCCAAAAAAA
 AAAAAAAA

GI4

GAGTGGTGACTATTGTCCAGTTTTGTTTCATGATGAAGGTCTCGTATTTTTATATTGGTATGTCA
 CTTGTGTTTTTTGGCTGACATGATTGTGTAATGCAGTTCTATGCTAGCAAGAAAAGCTGCCGGAGT
 TAAAAGCGGAACATATGAGCTTTGCATTTTTTTGGCTGTTGTATAGTAGTATAGAGTATCAGTTTG
 ATCCGTCTTCCCCTGCTTGGTTTTCTCTGATTTATTGCATGCTTCTTTTTAGCCTTTAGCTAGTTT
 GTCTTTGGTACCTCAGCCTGGATGCCAAGCATATAAAATCATTGCTACTTTCATTGCCAAAAAAA
 AAAAAAAA

GI5

GAGTGGTGACTAATGGAGNGGTGACTGCTGATGTCTTAAGAGCGTGTTAGCGTTTTTCTATTGCTG
 TTGTTTTTTCGTCTCAAATCTGGTATCTATTCTGAAGTTGGAGGGCATGCGGGATAATGTTATAG
 GTCATGGCAGATGATCCTTATCCTTTTGGCCTTCAAATATAGGAGACTCTTATACAAGTTAATG
 TAACACTAAGTGCAATTTATTTAGTTTACTATTGTGCTACATGATGGTTTTTAAAGCATGTTTACT
 GAATCTGTGCTTGATGAGCACTATAGCTATTTACCCCTTTTCTTCTCCAAAAA

GI6

GAATTCGATTTTNTGCGACTTCACTTGGGAGGTTGNGNAAGCNCNTTAAATGGGAGAANCCCCAG
 ATTAGCTTGCTGCCTAAGCGAGAAGTGTTGTAGCTAGTAGCTGCTGGTCTGACTGAATGGNCTGC
 AGTATGCGTATTTTTGCTTCTGTCTACTGTTCTTTCCCTCTCTTGAATGGCCAGTTTCTAATAG
 TTCTCGCAAGCCTTTTTGTTAAGCATCTGTTTTAATTACTTTTNACAACCACCTAGNACTACCAA
 GTTTCATTAACATCAGACATACAAGCTGCACTTGACGAANCAAGCTGCAGAACGAAAGATCANAA
 TTAAGGATTAACACACAGATAACGCTACCATTAAGGTTAGNGATTACAAACCATCTTACAAGACA
 TTTGCATTGGGGCATGATATCAGTNGTCACCACTCA

GI9

GAGTGGTGACTGGTGATCGCCGGAATTTGATCGAATTGTTTCTGAATCAATATAACATATATTTCA
 GAAAATGGGGTGGTGGCCGGTGGGGGATGATTTTTAGGCTGGCTTTGGGCCTTGACTTACATTT
 GACTTTGGTCTGGCATTTCATGGCCTGACATCCTTGTTAATTGTCCGTCAAGTTAGGAGCTTGC
 AAAAAATAAGAGACATATTATATCGTTCTGTTCCAAAAA

CI4

GAGTGGTGACCTTTTAAGACACAATGCAATAGTTATCGAGAAGAAAAATTTCCCTCGAGTCTTG
ATCTGTTTATTTGGCTATGCTGGTTTGGGAATAAATTGCAGAAATTCACAGATCACACAATGTAGT
CCAGTTGTGTTTCTTTGGCTTAGATATGACATATCCTGCTGCAGTTACTTTTGACATTTGCTTTG
ACCATGTTTTTCATGCATCAAGTACCAAACACTCTTGCTTCATAGGCCAAAAAAAAAAAAA

CI6

GAGTGGTGACCAGGCCACTGAAGCAGAATACGAAGAGGTGAAGAAGTAGATTGCTGATAATGGTA
GGAGGCCGAATATGAGATTGCTCTCAAAGGTTTTTTCTTGTTTACGGAGTAGAAGTTAATGAAATC
CGTTTTGTATTTAACTTGGAAGCTTAGCTTTGGCTGTACTGGAAGCACTAATTGATCTTGTGAA
GTCCAAAACCTCAGTGGTAGATTGCAAAAAAAAAAAAAA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada Identificação e caracterização de cDNAs expressos diferencialmente e detecção de alterações metabólicas em folhas de cafeeiro inoculadas com *Hemileia vastatrix*:

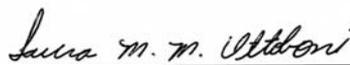
() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

(X) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº 01/2006), intitulado "Identificação e caracterização de cDNAs expressos diferencialmente e detecção de alterações metabólicas em folhas de cafeeiro inoculadas com *Hemileia vastatrix*".

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

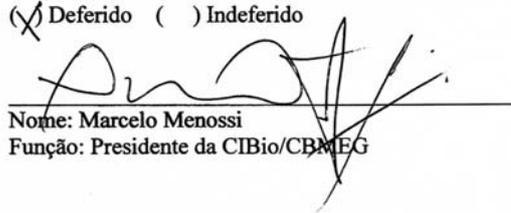
() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).


Aluna


Orientadora

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: Marcelo Menossi
Função: Presidente da CIBio/CBM/EG