



**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO
GÊNICA DE QUITINASE E PEROXIDASE
INDUZIDA POR ACIBENZOLAR-S-METIL E
EXTRATO VEGETAL EM CAFEIEIRO
CONTRA *Hemileia vastatrix***

DANIELLE CUNHA CARDOSO

2009

DANIELLE CUNHA CARDOSO

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE QUITINASE
E PEROXIDASE INDUZIDA POR ACIBENZOLAR-S-METIL E
EXTRATO VEGETAL EM CAFEIEIRO CONTRA *Hemileia vastatrix***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Cardoso, Danielle Cunha.

Análise quantitativa da expressão gênica de quitinase e peroxidase induzida por acibenzolar-S-metil e extrato vegetal em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* / Danielle Cunha Cardoso. – Lavras : UFLA, 2009.

66 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. Indução de resistência. 2. *Coffea arabica*. 3. Peroxidase. 4. Quitinase. 5. Expressão gênica quantitativa. 6. *Hemileia vastatrix*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.520429

DANIELLE CUNHA CARDOSO

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE QUITINASE
E PEROXIDASE INDUZIDA POR ACIBENZOLAR-S-METIL E
EXTRATO VEGETAL EM CAFEIEIRO CONTRA *Hemileia vastatrix***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 30 de outubro de 2009

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dra. Lílian da Silva Fialho

UFLA

Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende, PhD
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, pela presença em minha vida, força e saúde concedidas.
Aos meus pais, David e Efigênia, pelo amor e apoio incondicional,
Aos meus irmãos, Fabrício e Leonardo,
e ao meu namorado, Rodrigo,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e por iluminar meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA, onde realizei os experimentos.

Aos, meus pais David e Efigênia, pela confiança, orações, amor e por financiarem minha permanência em Lavras, sem nunca deixarem me faltar nada. Sem vocês não seria possível.

Ao orientador, professor Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor Dr. Luciano, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade e, principalmente, por não medir esforços para realizar a compra de parte dos reagentes utilizados neste trabalho.

A PRPG pelo período de concessão da bolsa atividade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos valiosos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora.

A Dra. Lílian da Silva Fialho, pelos ensinamentos e amizade.

A Lívia de Matos, pela importante ajuda nos experimentos e sugestões.

Ao Rodrigo, pelo amor, compreensão, companhia e ajuda em todos os momentos.

Aos amigos Fabrício (Bagango) e Dayana.

As minhas irmãs de república: Joyce, Lu e Cássia, pela grande amizade, companhia e divertida convivência.

A todos os amigos e amigas de BH.

A Suzana, pela amizade verdadeira e por ser tão especial.

Aos “vizinhos amigos”: Netinho, Thiago, Fael, Ale e Letícia.

Aos amigos do mestrado: Fabiane, Glacy, Humberto, Brenda, Nádia, Fabiana, Evânia, Carolina, Felipe, Luciana, Cássia, Romário, Gustavo, Kátia, Horllys, Gabriel e Ingrid.

Aos colegas de curso e do LCBM, pelo convívio e amizade.

A Magda e a Eula, pela atenção e carisma.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, em especial ao Pedro e Rodrigo, por me ajudarem na montagem do experimento e nas coletas.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA

*“Eu não sei qual o segredo do sucesso,
mas o segredo do fracasso
é tentar agradar
a toda a gente.”*

Bill Cosb

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1 <i>Coffea arabica</i>	04
2.2 Interação <i>Coffea arabica</i> – <i>Hemileia vastatrix</i>	05
2.3 Conceitos de resistência a doenças	07
2.3.1 Resistência local (HR)	09
2.3.2 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)	10
2.4 Indução de resistência	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Fonte de material	20
3.1.1 Plantas	20
3.1.2 Patógeno	20
3.1.3 Preparo de inóculo de <i>Hemileia vastatrix</i> e inoculação	20
3.2 Obtenção dos indutores de resistência	21
3.3 Bioensaio de indução de resistência em cafeeiro	22
3.4 Extração e quantificação do RNA total	23
3.4.1 Tratamento do RNA total com DNase	25
3.5 Síntese da primeira fita de cDNA	25
3.6 Análise quantitativa em tempo real da expressão dos genes <i>CHI</i> e <i>POX</i>	26
3.6.1 Busca <i>in silico</i> de sequências dos genes <i>CHI</i> , <i>POX</i> e <i>UBI</i>	26
3.6.2 Desenho de <i>primers</i>	27
3.6.3 qRT-PCR	28
3.6.4 Análises estatísticas	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Expressão quantitativa relativa dos genes <i>CHI</i> e <i>POX</i> em mudas de cafeeiro induzidas por ASM e NEFID e não inoculadas com <i>Hemileia vastatrix</i>	31
4.2 Expressão quantitativa relativa dos genes <i>CHI</i> e <i>POX</i> em mudas de cafeeiro após indução de resistência por ASM e NEFID e inoculação com <i>Hemileia vastatrix</i>	34

4.3 Efeito da inoculação com <i>Hemileia vastatrix</i> sobre a expressão quantitativa relativa dos genes <i>CHI</i> e <i>POX</i> em mudas controle de cafeeiro, pulverizadas com água.....	37
4.4 Efeito aditivo dos indutores e da inoculação com <i>Hemileia vastatrix</i> sobre a expressão quantitativa relativa dos genes <i>CHI</i> e <i>POX</i> em cafeeiro.....	38
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÕES	50
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO GERAL

CARDOSO, Danielle Cunha. **Análise quantitativa da expressão gênica de quitinase e peroxidase induzida por acibenzolar-S-metil e extrato vegetal em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A análise da expressão de genes relacionados à defesa, em resposta ao tratamento com moléculas elicitoras é uma ferramenta importante para estudar os mecanismos de resistência induzida. Este estudo foi realizado com o objetivo de analisar a expressão quantitativa de dois importantes genes, *POX* e *CHI*, que codificam para as proteínas quitinase e peroxidase, envolvidas no mecanismo de defesa induzida de plantas a patógenos. Utilizou-se o indutor padrão de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) e uma nova formulação constituída por extrato de folhas de café (NEFID) em mudas de cafeeiro susceptíveis à ferrugem, inoculadas e não inoculadas com *Hemileia vastatrix*. Para a análise do perfil de expressão gênica, utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Os genes *CHI* e *POX* foram induzidos em cafeeiro por ambos os tratamentos, tendo os perfis de expressão sido bastante variados em relação ao indutor utilizado e ao gene analisado. ASM induziu a expressão do gene *CHI* mais rapidamente que NEFID, no entanto, os maiores níveis de expressão de ambos os genes foram observados em plantas induzidas por NEFID. A expressão de genes *CHI* e *POX* foi potencializada pelo patógeno em mudas de cafeeiro induzidas, observando-se variações entre os genes, indutores e tempos analisados. Observou-se, ainda, que cafeeiro susceptível à ferrugem eleva os níveis de transcritos dos genes *CHI* e *POX* na presença do patógeno e ausência de indutores de resistência.

Comite Orientador: Mario Lúcio Vilela de Resede – UFLA (Orientador) e Lilian da Silva Fialho.

ABSTRACT

CARDOSO, Danielle Cunha. **Quantitative analysis of gene expression chitinase and peroxidase induced by acibenzolar-S-methyl and plant extract in coffee against *Hemileia vastatrix***. 2009. 66 p. Dissertation (Master in Plant Biotechnology) - Federal University of Lavras, Lavras.*

Expression analysis of defense-related genes in response to treatment with elicitor molecules is an important tool for studying the defense mechanisms induced by elicitors. This study was conducted in order to analyze the quantitative expression of peroxidases (POX) and chitinases (CHI) in coffee seedlings susceptible to rust. The standard inducer of resistance, acibenzolar-S-methyl (ASM) and a new formulation based on coffee leaves (NEFID) were sprayed on coffee seedlings, inoculated and non-inoculated with *Hemileia vastatrix*. Real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique was used for the analysis of gene expression profiling. The CHI and POX genes were induced in coffee plants by both treatments, nevertheless, the expression profiles varied in relation to the inducer used, time and the gene analyzed. ASM induced CHI gene expression faster than NEFID, however, the highest levels of expression of both genes were observed in plants induced by NEFID. Coffee seedlings had the levels of transcripts of CHI and POX increased in the presence of the pathogen and in the absence of the inducer of resistance.

Guidance Committee: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor) and Lílian da Silva Fialho

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea* sp.) pertence à família Rubiácea e é amplamente cultivado em países tropicais. Entre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* são as mais importantes, economicamente.

O Brasil destaca-se como o principal produtor e exportador mundial de café e possui o segundo maior mercado consumidor, perdendo para os Estados Unidos. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2009), a produção nacional de café, em 2008, foi de 45,99 milhões sacas de 60 kg de café beneficiado. Para 2009, há uma estimativa de produção de 39,07 milhões de sacas. O estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional; detém mais de 60% da produção do país, com 23,3 milhões de sacas produzidas em 2008. Essa cultura apresenta, portanto, uma contribuição importante para o PIB nacional (CONAB, 2009).

Entretanto, perdas significativas na produção ocorrem em função de diversos fatores, como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais e principalmente doenças. Entre estas, destacam-se as doenças foliares causadas por *Hemileia vastatrix* Berkley & Broome e *Cercospora coffeicola* Berkley & Cooke. O fungo *Hemileia vastatrix* é o agente etiológico da ferrugem alaranjada do cafeeiro; pertence à ordem Uredinales, família Pucciniaceae, sendo um parasita biotrófico exclusivo do gênero *Coffea*.

O sintoma mais notável da doença em plantações é a desfolha, que prejudica o desenvolvimento das plantas, interferindo na floração e na formação dos frutos, gerando grãos defeituosos, afetando sensivelmente a produção (Godoy et al., 1997).

Estima-se que as perdas de produção de café devidas à ferrugem do cafeeiro sejam da ordem de 30% na ausência de medidas de controle,

principalmente devido à predominância de plantas de cafeeiro (*C. arabica*) susceptíveis à maioria das raças de *H. vastatrix* (Pereira & Sakiyama, 1999).

De modo geral, a severidade da ferrugem e os prejuízos que esta doença causa à produção do cafeeiro variam de acordo com o ano e a região, em decorrência, principalmente, das condições climáticas. Em anos de alta produção, essas perdas podem chegar a 50% (Zambolim & Vale, 2003). O controle da ferrugem é baseado principalmente em aplicações de fungicidas protetores e sistêmicos, que são eficientes a curto e a médio prazo até o surgimento de raças resistentes (Zambolim et al., 1997).

A compreensão dos mecanismos de defesa do café contra *H. vastatrix* é fundamental para o desenvolvimento de formas alternativas de controle da doença. Aumentar a resistência de *C. arabica* a *H. vastatrix* tem se tornado prioridade para a produção do cafeeiro com maior economia e sustentabilidade. Entre as estratégias disponíveis, destaca-se a indução de resistência de plantas a patógenos diversos, que representa uma alternativa promissora ao controle químico e complementar aos métodos baseados na inserção de genes específicos de resistência (Melchers & Stuiver, 2000; Hammond-Kosack & Parker, 2003).

Indução de resistência significa ativação dos mecanismos de defesa inerentes das plantas, por meio de barreiras de natureza física e/ou química, em resposta a tratamentos com agentes bióticos ou abióticos, que aumentam a resistência geral da planta (Cavalcanti et al., 2004; Resende et al., 2004).

Após o tratamento com indutores de resistência, as plantas expressam genes de defesa e produzem compostos que dificultam ou, até mesmo, impedem o estabelecimento de fitopatógenos (Koholer et al., 2002).

O composto sintético acibenzolar-S-metil (ASM), derivado do benzotriazol, tem sido estudado em diversos trabalhos e caracterizado como um agente ativador dos mecanismos de defesa de plantas, conferindo proteção sistêmica contra diferentes patógenos em várias culturas, como cafeeiro,

cacaueiro, feijoeiro e tomateiro, entre outras (Resende et al., 2002; Marchi et al., 2002; Iriti & Faoro, 2003; Guzzo, 2004; Cavalcanti et al., 2006a; Toyota, 2008). O ASM é utilizado no Brasil em escala comercial em diversas culturas e estudado como um padrão de indução de resistência.

Diversos estudos têm confirmado o potencial de extratos vegetais induzirem resistência em plantas. A eficiência desses produtos no controle de fitopatógenos foi observada em vários patossistemas, em ensaios de laboratório, casa de vegetação e condições de campo (Guzzo et al., 1987; Bonaldo et al., 2004; Cavalcante et al., 2006b), inclusive no patossistema cafeeiro vs. *H. vastatrix*. Uma formulação natural obtida de folhas de café (NEFID) contém moléculas elicitoras derivadas de plantas e microrganismos e teve efeito positivo no controle de alguns patógenos. No trabalho de Santos et al. (2007), foi observada redução em torno de 30% da severidade da ferrugem após tratamento com o NEFID. O produto também induziu resistência contra mancha-de-phoma, mancha-angular do algodoeiro e mancha-bacteriana em tomate (Barguil et al., 2005; Ishida et al., 2007; Santos et al., 2007; Medeiros, 2009).

Estudos que visam analisar a ativação de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta de defesa induzida, como aquelas relacionadas à patogênese (PRPs), são fundamentais para a confirmação da eficiência de um indutor de resistência, seja ele biótico ou abiótico. Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de analisar quantitativamente a expressão de dois importantes genes relacionados à defesa induzida, *CHI* e *POX*, em cafeeiro (*Coffea arabica*), na susceptibilidade à infecção por *Hemileia vastatrix* e sob indução de resistência por acibenzolar-S-metil (ASM) (nome comercial Bion[®]) e por uma formulação natural à base de folhas de *Coffea arabica* (NEFID). Os genes *CHI* e *POX* codificam para as PRPs quitinase (EC 3.2.1.14) e peroxidase (EC 1.11.1.7), respectivamente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Coffea arabica*

O cafeeiro pertence ao subgênero *Coffea* e família *Rubiaceae*. Há mais de cem espécies conhecidas deste gênero e entre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta) são as mais importantes, economicamente. A primeira é responsável por mais de 72% da produção nacional.

O Brasil destaca-se como o principal produtor e exportador mundial de café e possui o segundo maior mercado consumidor, perdendo para os Estados Unidos. Segundo a CONAB (2009), a produção nacional de café em 2008 foi de 45,99 mil sacas de 60 kg de café beneficiado e, para a safra de 2009, a estimativa de produção total do café é de 39,07 milhões de sacas. O estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional e sua participação para a produção de café para a safra 2009 é estimada em 50,3% (CONAB, 2009).

Essa cultura representa, portanto, uma contribuição importante para o PIB nacional e de outros países emergentes. Em função disso, há, no Brasil, um aporte tecnológico para o agronegócio do café, fornecido por instituições de pesquisa e desenvolvimento, cujos esforços são voltados para uma maior sustentabilidade da cafeicultura (Cafeicultura, 2009).

Um dos principais obstáculos à produção do café é a ocorrência de uma série de doenças causadas por fungos, tais como ferrugem-alaranjada, causada por *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome; cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cook, antracnose-dos-frutos (CBD), causada por *Colletotrichum kahawae* e mancha-de-phoma, causada por *Phoma* spp., dentre outras. Entre estas, a ferrugem-alaranjada é considerada a de maior importância no Brasil, por ser encontrada em todas as regiões produtoras, ocasionando perdas de até 45% da produção (Zambolim & Vale, 2003).

2.2 Interação *Coffea arabica*–*Hemileia vastatrix*

O fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. é o agente etiológico da ferrugem-alaranjada do cafeeiro. Pertence à ordem Uredinales, família Pucciniaceae e classe Urediniomycetes. Uma característica importante desse patógeno é a biotrofia, ou seja, a dependência de células vivas do hospedeiro para o desenvolvimento e a reprodução.

Hemileia vastatrix foi descrito, inicialmente, por J. M. Berkeley, em 1868, no Ceilão, hoje Sri Lanka e o registro no Brasil ocorreu em 1970, no estado da Bahia. Atualmente, está presente na maioria das regiões cafeeiras do mundo e, das 40 raças fisiológicas identificadas, a raça II é a mais encontrada no mundo (Zambolim et al., 2005).

O fungo desenvolve-se na superfície abaxial foliar, quando há condições de umidade e temperatura propícias para a germinação dos urediniósporos, geralmente 24 horas após a infecção (Silva et al., 2002). Em seguida, ocorre formação de tubos germinativos, apressórios e da hifa de penetração, a qual atravessa o ostíolo do estômato e continua seu desenvolvimento na câmara subestomática, colonizando as células subsidiárias e do mesófilo, formando estruturas denominadas haustórios, responsáveis pela absorção de nutrientes das células do hospedeiro pelo patógeno (Zambolim et al., 2002).

Sucessivas sequências de sinais são requeridas para controlar o desenvolvimento do fungo dentro da planta, mas a natureza desses sinais é desconhecida. Estudos moleculares confirmaram, em *H. vastatrix*, a presença de um gene homólogo ao *pmk1* de *Magnaporthe grisea*, da família MAPK, que regula a formação do apressório e o crescimento da hifa. A proteína codificada por esse gene exerce papel importante nos mecanismos de sinalização que conduzem à formação das estruturas de desenvolvimento de *H. vastatrix* (Azinheira, 2005).

Estudos citoquímicos feitos por Silva et al. (1999) mostraram que, durante a formação dos apressórios, a degradação da parede celular vegetal esteve restrita ao sítio de penetração, com mínimo dano às células do hospedeiro, o que é um objetivo comum de fungos biotróficos.

Segundo Schulze & Panstruga (2003), as seguintes propriedades desse fungo parecem ser notáveis: (a) estruturas de infecção altamente desenvolvidas, (b) atividade secretora limitada, (c) camadas interfaciais com elevado teor de carboidratos e proteínas que separam as membranas plasmáticas do fungo e da planta, (d) presença de haustórios, (e) supressão de longa duração das defesas do hospedeiro e indução de genes específicos do hospedeiro para o estabelecimento da biotrofia.

É importante considerar que as cultivares tradicionais de *Coffea arabica* L. são susceptíveis à ferrugem, um dos motivos pelos quais a doença ocasiona decréscimos acentuados na produção. A cultivar Mundo Novo é resultante de uma recombinação procedente de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho de *C. arabica*. Essa cultivar tem elevada capacidade de adaptação e é susceptível à maioria das raças de ferrugem (Zambolim et al., 2002).

Os sintomas da doença são caracterizados pela ocorrência de manchas cloróticas translúcidas com 1-3 mm de diâmetro na face abaxial do limbo foliar. Essas manchas aumentam de tamanho rapidamente, atingindo de 1 a 2 cm de diâmetro. Na face abaxial, desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração alaranjada, formadas por uredíniosporos de *H. vastatrix*. Posteriormente, no centro das lesões, forma-se uma área necrótica, na qual a esporulação é reduzida e chega a cessar. Ocasionalmente, o fungo pode atacar a extremidade do ramo em desenvolvimento e os frutos verdes (Godoy et al., 1997). A perda de produção atribuída à ferrugem do cafeeiro ocorre em função da desfolha prematura, que reduz a área fotossintética da planta, resultando em morte dos

ramos, comprometendo o florescimento, a produção e a qualidade física dos grãos de café (Chalfoun & Zambolim, 1985; Matiello et al., 2002).

O controle da ferrugem do cafeeiro é intrincado. Aplicações sistemáticas de fungicidas cúpricos e sistêmicos, principalmente durante a estação chuvosa, dependendo da severidade da doença, têm gerado resultados satisfatórios. Comumente, são realizadas pulverizações foliares e aplicação via solo de fungicidas sistêmicos associados ou não a inseticidas. Porém, o uso inadequado desses fungicidas pode selecionar novas raças fisiológicas resistentes do patógeno (Agrios, 2005), o que é um obstáculo para as cultivares portadoras de genes de resistência a *H. vastatrix*, que vem sendo desenvolvidas para substituir as cultivares tradicionais de *C. arabica* susceptíveis.

2.3 Conceitos de resistência a doenças

As plantas têm capacidade para reconhecer potenciais patógenos invasores e desenvolvem mecanismos de defesa elaborados para proteção ao ataque dos mesmos. Esses mecanismos de defesa são eficientes, uma vez que as plantas são resistentes à maioria dos patógenos. Por outro lado, os patógenos desenvolvem estratégias para evitar seu reconhecimento ou conter os mecanismos de defesa das plantas (Staskawicz, 2001). Alguns desses mecanismos são constitutivamente expressos e fornecem barreiras físicas e químicas, enquanto outros são induzidos somente após o contato com o patógeno, o qual envolve vias interligadas de transdução de sinal e a rápida ativação da expressão gênica (Heath, 2000).

A percepção de patógenos pelas plantas envolve o reconhecimento de moléculas patogênicas ou originadas da injúria na planta. Essas moléculas são chamadas elicitores e podem ser peptídeos, proteínas, esteroides ou de outra natureza química (Durrant & Dong, 2004).

Elicitores têm baixo peso molecular, são encontrados em baixas concentrações e podem apresentar diversas estruturas. Essas moléculas são reconhecidas por proteínas transmembrana, que apresentam domínios extracelulares e citoplasmáticos, responsáveis pelo processo de transdução do sinal de reconhecimento, o qual não está bem esclarecido (Peck, 2003). Sabe-se que ocorrem numerosas mudanças celulares e que a ativação de cascatas de sinalização na membrana plasmática leva à indução de redes interligadas de moléculas sinalizadoras, tais como ácido salicílico, ácido jasmônico e óxido nítrico, para a formação rápida de respostas de defesa para limitar ou inibir a dispersão do patógeno pela planta (Harrison & Baldwin, 2004).

Resistência e suscetibilidade são o resultado de uma variação de tempo, autonomia celular ou intensidade das respostas de defesa das plantas (Moraes, 1998). As interações planta-patógeno são classificadas em compatíveis (patógeno virulento e hospedeiro susceptível) e em incompatíveis (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). Nas interações incompatíveis, o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado, conduzindo à resistência, enquanto na compatibilidade não ocorre ativação de defesa, ou esta é tardia, condicionando a doença.

Os mecanismos de defesa podem ser estruturais ou bioquímicos e são classificados em pré-formados e pós-formados. Os estruturais atuam como barreiras físicas que impedem a entrada e a dispersão do patógeno nos tecidos vegetais, enquanto os bioquímicos estabelecem condições adversas ao crescimento do patógeno ou produzem substâncias tóxicas ao mesmo (Pascholati & Leite, 1995).

Dentre os pré-formados estruturais, destacam-se presença de cutícula, acúmulo de lignina, cálcio e silício na parede celular, formação de tricomas e modificação da forma dos estômatos e dos vasos condutores (Alves, 2007). As

barreiras químicas incluem fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, fitotoxinas, inibidores proteicos, entre outros.

Nos pós-formados ou induzíveis estruturais pode ocorrer formação de papilas, tiloses, acúmulo de minerais no sítio de infecção, camadas de cortiça e abscisão, entre outros. Entre os mecanismos de defesa pós-formados bioquímicos, destacam-se as fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogênese (PRPs), formação de espécies ativas de oxigênio (ROS) e resposta de hipersensibilidade (HR) (Pascholati & Leite, 1995; Resende, 1996). Alguns desses mecanismos serão descritos em seguida.

De acordo com Johal et al. (1995), o grau de envolvimento dos fatores estruturais e bioquímicos nas respostas de resistência da planta varia de acordo com o patossistema e, num mesmo patossistema, de acordo com a idade da planta hospedeira, do órgão e ou tecido afetado, do estado nutricional e das condições ambientais.

Os principais tipos de resistência são: a resistência local, a resistência sistêmica adquirida, conhecida como *systemic acquired resistance* (SAR) e a resistência sistêmica induzida, denominada *induced systemic resistance* (ISR). A resistência local, conhecida como reação de hipersensibilidade (HR), pode levar à morte local das células situadas onde o elicitador ou indutor se instala.

2.3.1 Resistência local (HR)

A resistência local, ou resposta de hipersensibilidade (HR), apresenta-se como um sistema de defesa localizado, caracterizado pela rápida necrose das células nas proximidades do local de invasão de patógenos (vírus, bactérias, nematoides e fungos). As células vegetais necróticas não são as únicas responsáveis pela contenção do desenvolvimento do patógeno; nelas ocorre acúmulo de metabólitos tóxicos, como fitoalexinas e fornecedores de elicitores secundários, os quais estimulam mecanismos de defesa nas células vegetais nas

proximidades do local de infecção (Keen, 1990). HR é também considerada resposta de resistência, uma vez que há maior produção de calose, deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular na célula infectada, limitando o crescimento do haustório (Silva et al., 2002).

Em muitas interações biotróficas ou hemibiotróficas entre plantas e patógenos fúngicos, imediatamente após o contato com o patógeno ocorre desintegração do núcleo celular. Ao mesmo tempo, grânulos marrons formam-se no citoplasma, inicialmente ao redor do ponto de penetração do patógeno e, posteriormente, em todo o citoplasma. A morte celular ocasiona degeneração da hifa do fungo e essa é a principal característica estrutural celular detectada na HR (Agrios, 2005). Durante a resistência local na interação cafeeiro-*H. vastatrix*, foi observado aumento da atividade de algumas enzimas, como lipoxigenase, peroxidase (Silva et al., 2002), fenilalanina amônia-liase e as PR-proteínas, quitinases e β -1,3-glucanases (Guzzo & Martins, 1996; Guerra-Guimarães et al., 2001). Nesse tipo de resposta ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, conhecidas como *reactive oxygen species* (ROS), tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila e óxido nítrico (NO), entre outros. ROS participam como sinalizadores de respostas de defesa e podem atuar direta ou indiretamente sobre o patógeno, acarretando efeito tóxico (Resende et al., 2003).

2.3.2 Resistência sistêmica adquirida (SAR)

A resistência induzida (IR) pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios (Athayde et al., 2005; Nojosa et al., 2005). A IR pode ser dividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR) (Loon et al., 1998).

Na SAR, a resistência desenvolve-se de forma sistêmica em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). No fenômeno SAR, a ativação do estado de latência contra doenças é induzida sistematicamente e a resistência expressa, geralmente, é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está associada à produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) em resposta à infecção por um patógeno (Ramamoorthy et al., 2001). Muitas PRPs possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência.

Na ISR, geralmente induzida por rizobactérias, não há acúmulo de PRPs e a sinalização não é salicilato dependente, parecendo haver outras rotas de sinalização mais associadas a jasmonatos e etileno (Loon et al., 1998). Trabalhos recentes têm mostrado que uma ampla variedade de hormônios vegetais, tais como auxinas, giberelinas, ácido absísico (ABA), citoquininas, ácido salicílico (AS), etileno e jasmonatos, desempenham papéis importantes nas respostas de defesa das plantas aos estresses bióticos e abióticos. Infecções de plantas com diversos patógenos resultam em mudanças no nível de vários hormônios vegetais (Adie et al., 2007).

O ácido salicílico exerce papel crucial na defesa de plantas e está envolvido na ativação de respostas de defesa contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos, bem como no estabelecimento da resistência sistêmica adquirida (SAR). Diversos trabalhos confirmam que plantas mutantes deficientes para o acúmulo de AS apresentam maior susceptibilidade a patógenos biotróficos e hemibiotróficos. Recentemente, tem sido mostrado que metil salicilato, o qual é induzido durante a infecção com o patógeno, atua como um indutor móvel de SAR em tabaco (Park et al., 2007). Níveis elevados de ácido salicílico em tecidos de planta desafiados com patógenos ou que entram

em contato com elicitores resultaram em indução de genes codificadores de PRPs e resistência aumentada a uma ampla variedade de patógenos. Embora as vias de sinalização de defesa mediadas por AS, etileno e jasmonatos sejam geralmente antagonônicas, têm sido relatadas evidências de interações sinérgicas entre elas. Isso sugere que redes interligadas de sinalização de defesa utilizadas pelas plantas dependem da natureza do patógeno e do seu mecanismo de patogenicidade (Schenk et al., 2000; Mur et al., 2006; Bari & Jones, 2009).

As PRPs são proteínas de plantas que se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contacto com patógenos ou em resposta ao tratamento com determinados compostos químicos ou a outros tipos de estresse (Loon et al., 1994). Localizam-se no espaço intercelular, no vacúolo e na parede celular e estão presentes em diversas espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias. A maioria dessas proteínas possui um peptídeo-sinal na região N-terminal, responsável por sua translocação através da membrana do retículo endoplasmático para o vacúolo ou para o espaço intercelular (Loon et al., 1997). Essas proteínas apresentam propriedades físico-químicas típicas, como baixo peso molecular, estabilidade em meio ácido e resistência a proteases, uma vez que, nos locais para os quais elas são translocadas, encontram-se muitas enzimas com atividade de protease ácida. Atualmente, são classificadas em 17 famílias diferentes, com base na similaridade das sequências de aminoácidos e atividade enzimática ou biológica (Loon et al., 1999). As 17 famílias de PRPs conhecidas até o momento são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 Famílias reconhecidas de proteínas relacionadas à patogênese.

Famílias	Membros representativos	Propriedades
PR-1	PR-1 do fumo	Antifúngica
PR-2	PR-2 do fumo	β -1,3-glucanase
PR-3	P, Q do fumo	Quitinase tipos I, II, IV, V, VI e VII
PR-4	'R' do fumo	Quitinase tipos I e II
PR-5	S do fumo	Tipo taumatina
PR-6	Inibidor I de tomate	Inibidor de proteinase
PR-7	P ₆₉ de tomate	Endoproteinase
PR-8	Quitinase do pepino	Quitinase tipo III
PR-9	Peroxidase formadora de lignina do fumo	Peroxidase
PR-10	'PR1' da salsa	Tipo ribonuclease
PR-11	Quitinase 'classe V' do fumo	Quitinase tipo I
PR-12	Rs-AFP3 de rabanete	Defensina
PR-13	THI2.1 de <i>Arabidopsis</i>	Tionina
PR-14	LTP4 de cevada	Proteína de transferência de lipídeos
PR-15	OxOa (germina) de cevada	Oxalato oxidase
PR-16	OxOLP de cevada	Tipo oxalato oxidase
PR-17	PRp27 de fumo	Desconhecida

Fonte: adaptado de Loon et al. (2006).

Diversos estudos confirmam que o acúmulo dessas proteínas está associado com a SAR, por serem induzidas por patógenos. Enzimas que são constitutivamente expressas, mas que têm sua concentração aumentada na

presença do patógeno ou por outra forma de estresse, como fatores ambientais, tratamento com eliciadores endógenos e exógenos e reguladores de crescimento, também são consideradas PRPs, como, por exemplo, fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenol oxidase (Ferreira et al., 2007).

Entre as PRPs, encontram-se hidrolases, como as β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.6) e quitinases (CHI; EC 3.2.1.14), que têm sido relatadas principalmente como inibidoras do crescimento fúngico (Loon & Strien, 1999). Segundo Edreva (2005), a toxicidade das PRPs geralmente ocorre em função das capacidades de hidrólise, inibição de proteinase e permeabilização de membranas.

Estudos recentes têm mostrado que a superexpressão de genes de quitinases e glucanases em plantas aumenta a resistência dessas plantas a patógenos (Loon et al., 2006). Quitinases e β -1,3-glucanases são capazes de degradar componentes das paredes celulares de muitos fungos.

As quitinases constituem o segundo maior grupo de proteínas antifúngicas, catalisam a hidrólise da ligação β -1,4 glicosídica presente em biopolímeros de quitina, um importante componente da parede celular de fungos, ocorrendo inibição do desenvolvimento destes. Os oligossacarídeos gerados desta hidrólise atuam como elicitores para uma indução de resistência. Plantas superiores sintetizam sete classes diferentes de quitinases, que diferem quanto ao substrato, à estrutura e ao mecanismo de catálise. Essas classes pertencem a três famílias de PRPs: PR-3 (classes I, II, IV, VI e VII), PR-8 (classe III) e PR-11 (classe IV) (Burner et al., 1998).

As β -1,3-glucanases pertencem à família PR-2 e participam de vários processos fisiológicos dos vegetais. As β -1,3-glucanases de classe II apresentam atividade antifúngica, uma vez que clivam glucana, um componente estrutural da parede celular de fungos e oomicetos. Segundo Theis & Stahl (2004), β -1,3-glucanases de classe II apresentam atividade antifúngica quando atuam sinergicamente com quitinases e β -1,3-glucanases de classe I.

As peroxidases (POX; EC 1.11.1.7) são outra importante classe de proteínas relacionadas à patogênese. Pertencem à família PR-9 e também participam de vários processos fisiológicos importantes. Catalisam a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina. Esse processo reforça a parede celular das plantas em resposta ao ataque de patógenos (Loon & Strien, 1999). Essas enzimas também participam da biossíntese de etileno e da oxidação de compostos fenólicos acumulados em resposta à infecção (Schwan-Estrada et al., 2008). Peroxidases também estão envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio e na oxirredução de vários substratos, usando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Kawaoka et al., 2003).

Em diferentes interações planta-patógeno, a indução de peroxidases tem sido associada com resistência (Anguelova et al., 2002). Em estudo de Silva et al. (2006), duas interações incompatíveis entre *Coffea arabica*-*H. vastatrix* foram comparadas com interações compatíveis para elucidar se peroxidases estão, de fato, envolvidas na resistência do cafeeiro à ferrugem. Análises celulares e bioquímicas foram conduzidas para analisar a localização e a atividade de peroxidases durante o período de infecção. Os resultados mostraram que a incompatibilidade está associada com o aumento da atividade de peroxidases nas primeiras horas após o contato com *H. vastatrix*. O trabalho sugere, ainda, que esse aumento de atividade pode estar relacionado com as resistências pré e pós-haustoriais e com a resposta de hipersensibilidade.

2.4 Indução de resistência

Indução de resistência é definida como a ativação da capacidade da planta em se defender contra um amplo espectro de patógenos, após estímulo apropriado. O resultado do aumento da resistência devido a um agente indutor, antes da infecção por um patógeno, é chamado de resistência sistêmica adquirida

(SAR) ou resistência sistêmica induzida (ISR), a qual não é específica e se expressa em toda a planta após ser induzida por elicitor. O caráter não-específico da indução da resistência propicia um aumento simultâneo no nível de resistência basal para muitos patógenos (Schwan-Estrada & Stangarlin, 2003).

Vários agentes podem induzir a produção de “sinais” no tecido vegetal e a percepção se dá quando moléculas do agente indutor se ligam a moléculas receptoras situadas, provavelmente, na membrana plasmática da célula vegetal. Essas reações desencadeiam a ativação de vários mecanismos de defesa (Resende, 1996). Os elicitores ou indutores de resistência podem ser bióticos ou abióticos, não exibem atividade antimicrobiana direta e são capazes de ativar os mesmos mecanismos bioquímicos de defesa de SAR, ativados por patógenos.

Elicitores bióticos podem ser endógenos e exógenos e é importante diferenciá-los. Os endógenos ou constitutivos são liberados pela planta, como fragmentos de parede celular vegetal e os exógenos são liberados pelo patógeno. Entre eles podem ser citados: fragmentos de parede celular do patógeno e substâncias como glicoproteínas, oligopeptídeos, lipopolissacarídeos (LPS), entre outros. LPS são os principais componentes estruturais de células bacterianas (Resende et al., 2007b).

Em cafeeiro, substâncias extraídas de esporos germinados induziram aumento na atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas e nos níveis de compostos fenólicos, além de conferirem proteção contra inoculações posteriores de *H. vastatrix* (Maxemiuc–Naccache, 1983; Maxemiuc–Naccache & Dietrich, 1985; Guzzo et al., 1987). Maxemiuc-Naccache et al. (1992) observaram aumentos nas atividades de quitinase e β -1,3 glucanase, três dias após a inoculação com *H. vastatrix* em plantas resistentes, enquanto que, em plantas suscetíveis, esse aumento só foi verificado após 21 dias. Os mesmos obtiveram resultados semelhantes utilizando extrato eliciador a partir de urediniosporos. De acordo com Martins et al. (1985), esporos de outros fungos,

como *Puccinia psidii* e *Tranzschelia pruni-spinosae* var. *discolor*, também conferiram proteção do cafeeiro contra *H. vastatrix*, observando percentuais de controle de ferrugem superiores a 80%. A indução de resistência em café também já foi testada com o uso de *Bacillus thuringiensis*, em que inoculações prévias induziram uma proteção que durou até 36 dias (Roveratti et al., 1989).

Avanços nas pesquisas envolvendo RI em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente, sendo capazes de propiciar melhora na produtividade agrícola, devido à redução de perdas ocasionadas por patógenos e, em alguns casos, incrementos no desenvolvimento vegetativo (Resende et al., 2006).

O desenvolvimento mais recente neste campo dos ativadores de resistência de plantas está relacionado com a descoberta de um análogo funcional do ácido salicílico, o acibenzolar-S-metil (ASM). O ácido salicílico promove, nas células das plantas, a produção de proteínas específicas relacionadas com a patogênese. Além disso, foi constatado que ele se liga e inibe a catalase, o que levaria a um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou de espécies reativas de oxigênio derivadas deste, que se elevam durante a respiração, a fotossíntese ou a resposta de hipersensibilidade. H₂O₂ pode ter atividade antimicrobiana direta contra patógenos invasores e seus derivados podem também atuar como intermediários na cascata de sinalização para a expressão de genes relacionados à defesa, entre eles genes codificadores de PRPs (Col, 1999).

Em cafeeiro cultivar Mundo Novo e cultivar Catuaí Vermelho M-99, a aplicação do produto proporcionou proteção contra *H. vastatrix* (Guzzo et al., 2001; Marchi et al., 2002). Esse efeito indutor do ASM contra ferrugem do cafeeiro foi confirmado por Nojosa (2003), que obteve 52% de controle da doença em mudas de cafeeiro tratadas com ASM. Foi possível observar, ainda,

um aumento considerável nos teores de clorofila *a* e *b*, nos teores de lignina e na atividade de peroxidase. Segundo Martins et al. (1998), esse produto foi capaz de induzir proteção contra *H. vastatrix* por até 10 semanas, em condições controladas.

Além do ASM, outros produtos disponíveis no mercado são capazes de induzir resistência em plantas contra patógeno, como fosfitos, INA (ácido 2,6 dicloroisnicotínico), Messenger®, que tem a proteína bacteriana harpina como ingrediente ativo e Agro-Mos®, contendo um manano-oligossacarídeo fosforilado originado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, entre outros (Cavalcanti et al., 2004).

Muitos outros indutores comerciais de resistência a doenças têm sido estudados com eficácia variável. Alguns estudos têm confirmado o potencial de extratos vegetais ativarem SAR. Extratos de plantas podem conter múltiplos elicitores. Um extrato obtido a partir de folhas de café (NEFID), coletadas na superfície do solo, devido a doenças, colheita de frutos e outros tipos de estresse, foi recentemente patenteado (INPI, protocolo nº 0000220604167501, “Formulação para indução de resistência”..., agosto/2006) e, provavelmente, contém múltiplos elicitores de plantas e microrganismos e tem se mostrado efetivo contra múltiplos patógenos (Medeiros, 2009).

Trabalhos têm indicado o potencial de extratos de plantas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas e PRPs, indicando presença de algum composto eliciador. Na cafeicultura, a utilização de extratos vegetais em campo ainda é praticamente inexistente e a maioria dos trabalhos tem sido realizada *in vitro* ou em casa de vegetação. Segundo Schnepfleitner et al. (1996), a utilização de extratos de plantas medicinais, como erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) e erva-cidreira (*Lippia alba*), em experimentos visando verificar a

germinação de uredíniosporos de *H. vastatrix*, possibilitou observar que essa germinação não passou de 5%.

A utilização de extratos de casca de café e de folhas de café infectadas com ferrugem proporcionou certa proteção de mudas de café contra os patógenos *Phoma costarricensis* e *Cercospora coffeicola* (Resende et al. 2004; Amaral, 2005). Foi observada diminuição na percentagem da mancha-de-phoma de 20% e 38%, para extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem, respectivamente (Resende et al., 2004). Para cercosporiose, observou-se diminuição na percentagem da doença em 40% e 37% em plantas tratadas com extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem, respectivamente (Amaral, 2005). Santos (2006) observou, em testes de campo, que o extrato de folhas de café com ferrugem proporcionou uma diminuição na porcentagem da cercosporiose do cafeeiro orgânico de 34,2% em relação ao tratamento padrão com o produto comercial Viça-café plus®. Como citado por Medeiros (2009), plantas de algodão pulverizadas com NEFID tiveram redução na severidade da mancha-angular, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* e esse resultado foi similar ao obtido pelo tratamento com ASM (Ishida et al., 2007).

A aplicação de produtos indutores de resistência, especialmente aqueles baseados em extratos e produtos naturais, representa uma alternativa promissora e sustentável para o controle de doenças que afetam as diversas cultivares. O mecanismo de indução de resistência que esses produtos ativam, bem como a natureza das respostas moleculares e bioquímicas de defesa, não estão elucidados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fonte de material

3.1.1 Plantas

Foram utilizadas no experimento plantas de *Coffea arabica* L. cultivar Mundo Novo (seleção MG-379-19), como materiais susceptíveis a *Hemileia vastatrix*. As mudas foram produzidas a partir de sementes adquiridas da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional do Sul de Minas (Epamig-Uresm) e semeadas em bandejas de isopor de 72 células, contendo o substrato comercial Plantmax-café[®]. As mudas foram mantidas em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e adubadas com 0,5 g de fertilizante de liberação lenta por muda (formulação 4-14-8 de NPK). A casa de vegetação possui um sistema de nebulização automatizado, por meio do qual foi possível manter a umidade relativa em, aproximadamente, 60%, à temperatura de 24±3°C.

3.1.2 Patógeno

Urediniosporos de *Hemileia vastatrix* foram coletados a partir de pústulas em folhas de plantas de café arábica cultivar Mundo Novo, naturalmente infectadas, presentes em campo experimental da UFLA. A coleta de urediniosporos foi realizada por meio da raspagem das pústulas, utilizando pincel n° 1.

3.1.3 Preparo do inóculo de *Hemileia vastatrix* e inoculação

Após a coleta, dois dias antes da inoculação, os urediniosporos foram peneirados em peneiras de 0,149 mm, a fim de eliminar impurezas. Em seguida, foram armazenados à temperatura de 5°C em dessecador, contendo, na parte inferior, solução aquosa de ácido sulfúrico 32,6% (v/v), para manter a umidade

relativa em torno de 50% (Zambolim & Chaves, 1974), até a realização da inoculação das mudas. Para a inoculação das plantas, realizou-se uma suspensão de uredíniosporos em ágar água 0,2% (v/v), a qual foi ajustada em hemocitômetro, para 15.000 uredíniosporos viáveis por mL. O preparo do inóculo e as inoculações foram realizados em condições de baixa intensidade luminosa.

O processo de inoculação das mudas foi feito por meio da pulverização da suspensão até o ponto de escorrimento nas plantas, quando as mesmas já apresentavam os três primeiros pares de folhas completamente expandidos (cerca de quatro meses de idade). As plantas foram mantidas no escuro por 48 horas, com umidade relativa de 100% e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, condições favoráveis para a germinação dos uredíniosporos. Nas plantas controle, não inoculadas, foram aplicadas a uma solução ágar água 0,2% (v/v) sem inóculo.

3.2 Obtenção dos indutores de resistência

Os produtos utilizados no bioensaio de indução de resistência foram acibenzolar-S-metil (ASM), comercialmente Bion® 500wg, da Syngenta Proteção de Cultivos (São Paulo, SP) e NEFID, produto à base de extratos de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*), coletadas da superfície do solo. Cem gramas de folhas trituradas foram misturados com 1.000 mL de água destilada. A solução foi fervida e, posteriormente, filtrada em peneira de malha 400. O filtrado de folhas foi acondicionado e estocado à temperatura de -20°C . A formulação NEFID foi patenteada por Resende et al. (2006) (I.N.P.I., protocolo nº 0000220604167501, “Formulação para indução de resistência”..., agosto/2006).

3.3 Bioensaio de indução de resistência em cafeeiro

O experimento de bioensaio de indução de resistência em cafeeiro foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFPA, em delineamento em blocos casualizados (DBC), com 6 tratamentos (Tabela 2) e 3 repetições, sendo a parcela experimental constituída por 6 mudas, com cerca de 4 meses de idade.

A resistência foi induzida por meio de pulverizações com ASM, a 0,2 g i.a./L (Bion® 50WG Syngenta) ou com a formulação NEFID, referida no item 3.2 e, em plantas controle, as pulverizações foram realizadas com água. A pulverização dos tratamentos foi realizada sete dias antes da inoculação das mudas, descrita no item 3.1.3.

O material vegetal foi coletado nos seguintes tempos após a pulverização com os indutores e inoculação com *H. vastatrix*: 12, 24, 48, 168, 192, 216 e 264 horas (Tabela 2), equivalentes a 0,5; 1; 2; 7; 8; 9 e 11 dias. Assim, os tempos 0, 24, 48 e 96 horas após a inoculação, correspondem, exatamente, a 168, 192, 216 e 264 horas após a pulverização com os indutores, devido à pulverização dos tratamentos ter sido realizada sete dias antes da inoculação das mudas, como mencionado acima.

Foram coletadas seis mudas/tempo/tratamento, utilizando-se luvas descartáveis de látex e, imediatamente após coletadas, as mudas foram enroladas em papel alumínio, previamente identificados e congeladas em nitrogênio líquido. Ao final de cada coleta, o material congelado foi armazenado em freezer, a temperatura de -80°C, até o momento da maceração para a extração de RNA.

TABELA 2 Tratamentos utilizados para o bioensaio de indução de resistência e tempos de coleta após a aplicação dos indutores.

TRATAMENTOS COM INDUTORES DE RESISTÊNCIA	TEMPOS DE COLETA (HAP) ¹ ou (HAI) ²
ASM	12; 24; 48; 168; 192; 216 e 264 (HAP)
ASM COM INOCULAÇÃO *	0; 12; 24; 48 (HAI)
NEFID	12; 24; 48; 168; 192; 216 e 264 (HAP)
NEFID COM INOCULAÇÃO*	0, 12, 24, 48 (HAI)
CONTROLE	12; 24; 48; 168; 180; 192; 216 e 264 (HAP)
CONTROLE COM INOCULAÇÃO *	0, 12, 24, 48, 96 (HAI)

*Tratamentos acompanhados de inoculação apresentam número de tempos de coleta reduzidos, comparados aos tratamentos sem inoculação, porque a inoculação com o patógeno ocorreu às 168 HAP, tempo este correspondente a 0 HAI

¹ HAP (horas após pulverização).

² HAI (horas após inoculação).

Os experimentos descritos nos itens subsequentes foram realizados no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da UFLA, inclusive as análises de qRT-PCR.

3.4 Extração e quantificação do RNA total

Todos os materiais utilizados para extração (cadinhos e pistilos de porcelana, microtubos e ponteiros, água destilada) foram tratados com DEPC (*diethylpyrocarbonate*) para inativar RNAses. Os materiais foram submersos em DEPC 0,05% (v/v), *overnight* e autoclavados por 30 minutos. O DEPC inativa RNAses, nucleases que degradam RNA. O procedimento foi realizado com a utilização de luvas de látex descartáveis.

Os RNAs totais de tecido vegetal de cafeeiro foram extraídos utilizando TRI ReagentTM Solution (Applied Biosystems, USA), de acordo com as

recomendações do fabricante. Inicialmente, quatro plantas representativas da mesma amostra foram maceradas em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, 100mg de tecido macerado foram colocados em microtubos tipo eppendorf de 1,5 mL e adicionou-se 1mL do TRI Reagent™. Em seguida, realizou-se homogeneização em vórtex e a mistura foi incubada, por 5 minutos, à temperatura de 25°C. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por 10 minutos, à temperatura de 4°C, a 12.000 x g. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo, ao qual se adicionaram 200µL de clorofórmio, a mistura foi homogeneizada por 15 segundos e, em seguida, incubada por 20 minutos, à temperatura ambiente. Foi, então, realizada uma centrifugação durante 15 minutos, à temperatura de 4°C, a 12.000 x g. Após a centrifugação, a fase superior contendo RNA foi transferida para um novo tubo e adicionaram-se 500µL de isopropanol. Fez-se rápida homogeneização por inversão, seguida por incubação mínima de 1 hora, à temperatura de -20°C. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 10 minutos, à temperatura de 4°C a 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes, com 1mL de etanol 75% (v/v) gelado, seguido de uma centrifugação por 5 minutos, à temperatura de 4°C, a 7.500 x g. Após a lavagem, foi realizada a solubilização do RNA. O *pellet* foi, finalmente, ressuspendido em 20µL de água milli-Q autoclavada contendo 0,05% (v/v) de DEPC. Antes de serem estocadas em freezer à temperatura de -80°C, as amostras foram tratadas com inibidor de RNase *RNAse OUT* (Invitrogen™). A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies™) e, em seguida, tratadas com DNaseI. Os RNAs de todas as amostras das três repetições biológicas foram isolados separadamente.

3.4.1 Tratamento do RNA total com DNase

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (New England BioLabs™), segundo especificações do fabricante, para a eliminação de eventual DNA presente. Uma reação contendo 10 µg de RNA total, 2U de enzima DNase I, 10µL de tampão de reação 10X e água milli-Q DEPC 0,05% (v/v), para completar um volume final de 100µL, foi incubada, à temperatura de 37°C, por 30 minutos. Em seguida, o RNA total foi purificado da reação pela adição de 10µL de acetato de potássio 2M, mantendo-se os tubos no gelo durante 15 minutos e centrifugação a 14.000 x g, à temperatura de 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual se adicionaram 3 volumes de etanol 100% (v/v) gelado. A mistura foi incubada por 2 horas, à temperatura de -80°C.

Após a incubação, a mistura foi submetida à centrifugação por 30 minutos, a 14.000 x g, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 400µL de etanol 70% (v/v) gelado. Realizou-se mais uma centrifugação a 14.000 x g, à temperatura de 4°C, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco até a evaporação total do álcool e, posteriormente, ressuspenso em 20µL de água milli-Q autoclavada contendo DEPC 0,05% (v/v).

As amostras tratadas com DNase foram novamente quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

3.5 Síntese da primeira fita de cDNA

A partir dos RNAs tratados com DNase I foi sintetizada a primeira fita de cDNA utilizando o kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante.

Em microtubos estéreis, tratados com DEPC 0,05% (v/v), adicionou-se 1 µg de RNA total, tratado com DNase, 3µM de *primers* randômicos (Invitrogen™) e 1 µl de mistura de dNTPs na concentração de 10µM. A mistura foi aquecida à temperatura de 65°C, por 5 minutos e, imediatamente, acondicionada em gelo, por 5 minutos. Em seguida, foi submetida a uma rápida centrifugação.

Ao mesmo tubo, acrescentaram-se 4µL do tampão First-Strand 5X e 1 µM de DTT 0,1M, sendo realizada uma leve homogeneização. Os tubos foram incubados em banho-maria, à temperatura de 25°C, durante 2 minutos. Adicionaram-se 1µL da enzima SuperScript II™ 200U/µL e água DEPC 0,05% (v/v) para completar o volume de reação para 20 µL. A mistura foi incubada à temperatura de 25°C, por 2 minutos e, posteriormente, a 42°C, durante 50 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.6 Análise quantitativa em tempo real da expressão dos genes *CHI* e *POX*

3.6.1 Busca *in silico* de sequências dos genes *CHI*, *POX* e *UBI*

As sequências de genes *CHI*, *POX* e *UBI* foram identificadas tendo como fonte de dados o banco de ESTs (Expressed Sequence Tags), gerado pelo projeto Genoma Brasileiro Café CAFEST (Vieira et al., 2006). O gene *UBI* codifica para a proteína ubiquitina e foi utilizado como controle endógeno da reação de PCR em tempo real, descrita no item 3.6.3.

Por meio da interface Gene Project, foi possível a procura por *reads*, a montagem de *clusters* e a análise dos prováveis genes *CHI*, *POX* e *UBI*.

Inicialmente, realizou-se uma busca por palavra-chave (nome da proteína), tendo em vista que todos os *reads* haviam sido previamente anotados automaticamente por comparação com o banco de genes do National Center for Biotechnology (NCBI).

Um segundo tipo de busca foi realizado por meio da ferramenta Basic Local Alignment Search (BLAST), utilizando-se sequências de genes *CHI*, *POX* e *UBI* disponíveis no GenBank. Assim, por meio da ferramenta tBLASTN (Altschul et al., 1997), foram comparados os aminoácidos da fita *query* com os nucleotídeos traduzidos do banco de dados e selecionados todos os *reads* que apresentaram alinhamento significativo ($e\text{-value} > 10^{-5}$).

Posteriormente, os *reads* encontrados foram agrupados (*clustering*), formando os chamados EST-*contigs* de cada gene. Todos os EST-*contigs* formados foram utilizados para uma nova busca no banco CAFEST, visando encontrar novas sequências prováveis desses genes.

As sequências de nucleotídeos de interesse foram comparadas com as sequências de proteínas de banco de dados públicos (NCBI), utilizando-se, para isso, o algoritmo BLASTx. Para classificar a parte funcional da proteína, bem como sua matriz de leitura, foi utilizada a ferramenta Open Reading Frame Finder (ORF FINDER). O alinhamento da sequência da proteína de interesse com as proteínas disponíveis no NCBI foi realizado por meio do algoritmo BLASTp (Altschul et al., 1997). Após essas análises, detendo as sequências corretas dos genes *CHI*, *POX* e *UBI*, os respectivos *primers* foram desenhados.

3.6.2 Desenho de *primers*

Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados utilizando o programa Primer Express (versão 2.0) (Applied Biosystems, USA) e estão descritos na Tabela 3. *Primers* específicos para os genes *CHI*, *POX* e *UBI* foram desenhados a partir das sequências obtida *in silico* neste trabalho, por meio de busca no banco CAFEST. O gene *UBI* foi utilizado como controle endógeno constitutivo da reação. Os *primers* foram sintetizados pela empresa IDT Integrated DNA Technologies (USA) e ressuspensos em água ultrapura para manutenção em solução estoque 100nM.

TABELA 3 Sequências dos *primers* utilizados para a análise de qRT-PCR e tamanho dos *amplicons*.

Genes	Sequências dos <i>primers</i>	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
Quitinase (<i>CHI</i>)	F: 5' AAC TGA ACT TAG CTG GCC ACT GT 3' R: 5' CTG GCA AAC CTC TAT CTG AGA ACT C 3'	72
Peroxidase (<i>POX</i>)	F: 5' GGA CAG TGA ATA TGC AGC AAA TCT3' R: 5' CCT GGA TCC ATT TCA ACT ATC GT 3'	83
Ubiquitina (<i>UBI</i>)	F: 5' AAG GCC AAG ATC CAG GAC AA 3' R: 5' TTG CTT TCC AGC GAA GAT GA 3'	69

(R) sequência do *primer reverse*. (F) sequência do *primer forward*.

3.6.3 qRT-PCR

A análise da expressão gênica quantitativa por qRT-PCR foi realizada em sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando SYBR Green, o qual se baseia na capacidade do fluoróforo de intercalar as fitas duplas de cDNA. Realizou-se um *pool* de cDNA das amostras referentes das três repetições biológicas, usando as mesmas quantidades de cDNA de cada amostra correspondente.

As condições térmicas da reação foram 2 minutos, a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados gerados foram armazenados e analisados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.1).

Para cada reação, foram utilizados 80ng de cDNA, 0,4μL de cada *primer* e 5,0 μL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). A reação foi completada com 3,6 μL de água livre de nuclease (*nuclease-free water*) (Ambion™), para um volume final 10,0 μL/amostra. As amostras foram processadas em tréplicas. Os resultados foram normalizados usando C_{TS} (ciclo *Threshold*) obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação. O C_T foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *Threshold*. O método usado foi o C_T comparativo.

A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta C_T = C_T$ (gene alvo) - C_T (controle endógeno). A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) - ΔC_T (calibrador). O calibrador é uma amostra usada como base para resultados de expressão comparativa. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Após serem analisados, os dados gerados pelo programa 7500 Fast Software (Versão 2.1) foram exportados para o programa Microsoft Excel, para realização dos cálculos de ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ e da quantificação relativa (RQ) para a posterior construção dos gráficos.

Os *primers* foram desenhados para produzir pequenos *amplicons* (Tabela 3), menores que 100 pb, para maximizar a eficiência da amplificação. As análises da curva de *melting* e da eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) dos produtos de amplificação confirmaram que os *primers* amplificaram um único tipo de produto (dados não mostrados).

Para verificar o efeito dos indutores sobre a expressão de cada gene, os cálculos de quantificação relativa foram realizados utilizando-se como calibrador os dados obtidos a partir das amostras controle (pulverizadas com água) para um dado tempo de coleta. Os cálculos de quantificação relativa para verificar o efeito do patógeno sobre a expressão de cada gene em plantas induzidas foram realizados utilizando-se, como calibradores, os dados obtidos a

partir das amostras não inoculadas com patógeno por tratamento para um dado tempo.

A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *UBI*, utilizado como controle endógeno para compensar variações internas na PCR. Os resultados foram normalizados usando C_{TS} (Ciclo Threshold) obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação.

3.6.4 Análises estatísticas

O experimento foi instalado segundo um delineamento em blocos casualizados (DBC), com três repetições biológicas. Foi realizada análise de variância para comparar os níveis de expressão gênica induzidos por tratamento por tempo de análise, por meio do Test t (Bonferroni), a 5% de probabilidade.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sisvar[®].

4 RESULTADOS

A análise quantitativa dos níveis de expressão dos genes *CHI* e *POX* possibilitou o estudo da indução de resistência em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) contra o desenvolvimento de *Hemileia vastatrix*, pelo tratamento das mudas com ASM e NEFID. O padrão de expressão foi avaliado nos tempos 12, 24, 48, 168, 192, 216 e 264 horas após a pulverização com indutores e inoculação com o patógeno.

4.1 Expressão quantitativa relativa dos genes *CHI* e *POX* em mudas de cafeeiro induzidas por ASM e NEFID e não inoculadas com *Hemileia vastatrix*

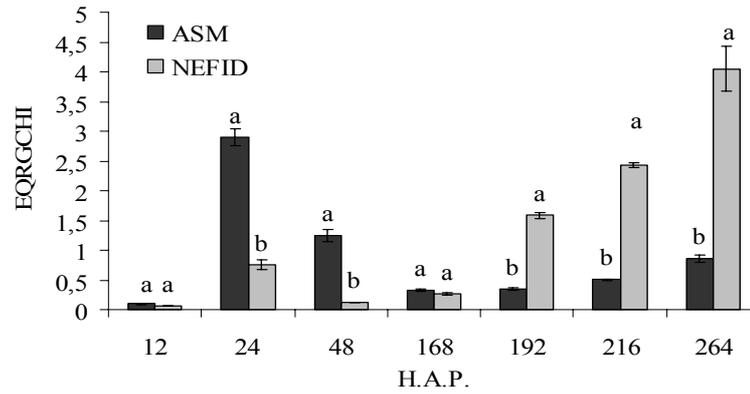
O estudo do efeito dos indutores sobre a expressão dos genes *CHI* e *POX* em mudas de cafeeiro na ausência do patógeno, durante os sete tempos de análise descritos em materiais e métodos, revelou que a expressão quantitativa relativa do gene *CHI* foi maior em plantas tratadas com ASM que naquelas tratadas com NEFID, às 24 e às 48 horas após a pulverização (HAP), havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois indutores (Figura 1A). Em plantas tratadas com ASM, o maior nível de expressão do gene *CHI* ocorreu 24 HAP. No período de 168 HAP, houve uma queda considerável na expressão do gene *CHI*, em plantas tratadas com ASM e NEFID. Nos tempos seguintes de análise, foi possível observar um aumento da expressão gênica de *CHI* significativamente maior em plantas tratadas com NEFID do que naquelas induzidas por ASM, nos períodos de 192; 216 e 264 HAP. Neste último tempo de análise, observou-se o maior nível de expressão do gene *CHI*, induzido por NEFID (Figura 1A).

A expressão quantitativa relativa do gene *POX* foi maior em mudas de cafeeiro tratadas com ASM nos tempos iniciais de análise, 24 e 48 HAP. No

período de 12 HAP, a expressão não se diferenciou estatisticamente entre plantas tratadas com ASM e NEFID (Figura 1B). De maneira inversa ao observado para o gene *CHI*, no período de 168 HAP houve aumento na expressão quantitativa relativa do gene *POX* para ambos os tratamentos, mas, principalmente, em plantas tratadas com NEFID, cujos níveis de expressão do gene *POX* foram significativamente maiores que os apresentados pelas plantas tratadas com ASM. No entanto, 192 HAP houve decréscimo nos níveis de expressão gênica para ambos os tratamentos. No período seguinte de análise, 216 HAP, os níveis de expressão do gene *POX* sofrem um novo aumento significativo em plantas tratadas com NEFID, atingindo os mesmos padrões de expressão gênica do período de 168 HAP. Os níveis de transcritos gênicos de *POX* não se mantiveram até o último período de análise, 264 HAP, no qual pode ser observada uma queda expressiva, principalmente em plantas tratadas com NEFID. Nesse tempo de análise não houve diferença estatística entre plantas tratadas com ASM e aquelas tratadas com NEFID (Figura 1B).

As análises quantitativas da expressão dos genes *CHI* e *POX* referentes às Figuras 1A e 1B são relativas à expressão dos mesmos genes, em mudas de cafeeiro pulverizadas com água e não inoculadas (controle).

A



B

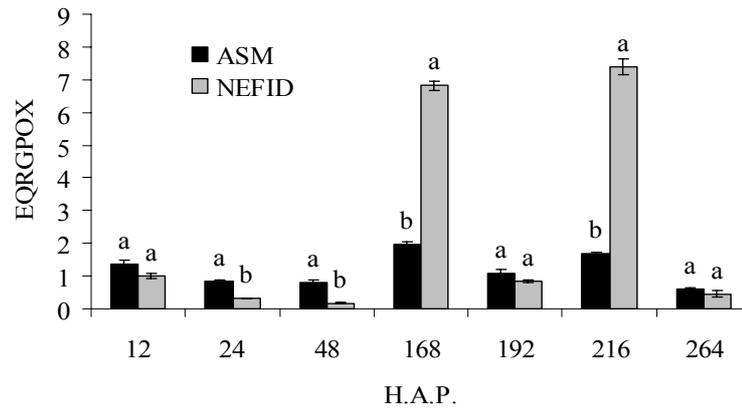


FIGURA 1 Perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos genes *CHI* (EQRGCHI) (A) e *POX* (EQRGPOX) (B), nos tempos 12, 24, 48, 168, 192, 216 e 264 horas após pulverização de mudas de café com ASM e NEFID, sem inoculação do patógeno. Colunas representam a indução média de transcritos relativos aos controles não induzidos e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir do *pool* de cDNA das três repetições biológicas. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *UBI*. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas de um mesmo tempo, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste t – Bonferroni. H.A.P.: horas após pulverização.

4.2 Expressão quantitativa relativa dos genes *CHI* e *POX* em mudas de cafeeiro após indução de resistência por ASM e NEFID e inoculação com *Hemileia vastatrix*

A análise da expressão quantitativa relativa dos genes *CHI* e *POX* em mudas pulverizadas com os indutores de resistência ASM e NEFID e inoculadas com *H. vastatrix* foi feita nos tempos 0, 12, 24 e 48 HAI com o patógeno, a qual ocorreu 168 horas ou 7 dias após a pulverização com os indutores. A expressão quantitativa dos genes *CHI* e *POX* é relativa à expressão dos mesmos genes em plantas induzidas e não inoculadas, nos mesmos períodos de tempo após a pulverização.

O perfil de expressão quantitativa relativa do gene *CHI* induzida pelo patógeno em mudas tratadas com NEFID foi bastante distinto do perfil de expressão observado no tratamento com ASM (Figura 2A). A expressão do gene *CHI* foi significativamente maior nos tempos 0, 24 e 48 HAI nas mudas tratadas com NEFID em comparação com aquelas tratadas com ASM. O nível máximo de expressão do gene *CHI* induzida pelo patógeno ocorreu em mudas pulverizadas com NEFID, 48 horas após a inoculação (período referente a 216 HAP). A expressão do gene *CHI* nas plantas tratadas com ASM foi maior que nas plantas tratadas com NEFID apenas no período de 12 HAI, período no qual a expressão induzida pelo patógeno nas plantas tratadas com NEFID foi muito baixa (Figura 2A).

De modo semelhante ao observado para o gene *CHI*, o perfil de expressão do gene *POX* induzida pelo patógeno foi significativamente maior em mudas tratadas com NEFID, em comparação ao tratamento com ASM (Figura 2B). Para o gene *POX*, pode ser observado um aumento significativo nos níveis de transcritos induzidos pelo patógeno em mudas tratadas com NEFID, 24 e 48 HAI, sendo estes os períodos de expressão máxima do gene *POX*. No momento da inoculação, a expressão gênica de *POX* manteve-se baixa em ambos os

tratamentos. A expressão do gene *POX*, induzida pelo patógeno em mudas tratadas com ASM, foi maior que em plantas tratadas com NEFID apenas no período de 12 HAI e manteve-se constante ao longo dos períodos analisados (Figura 2B).

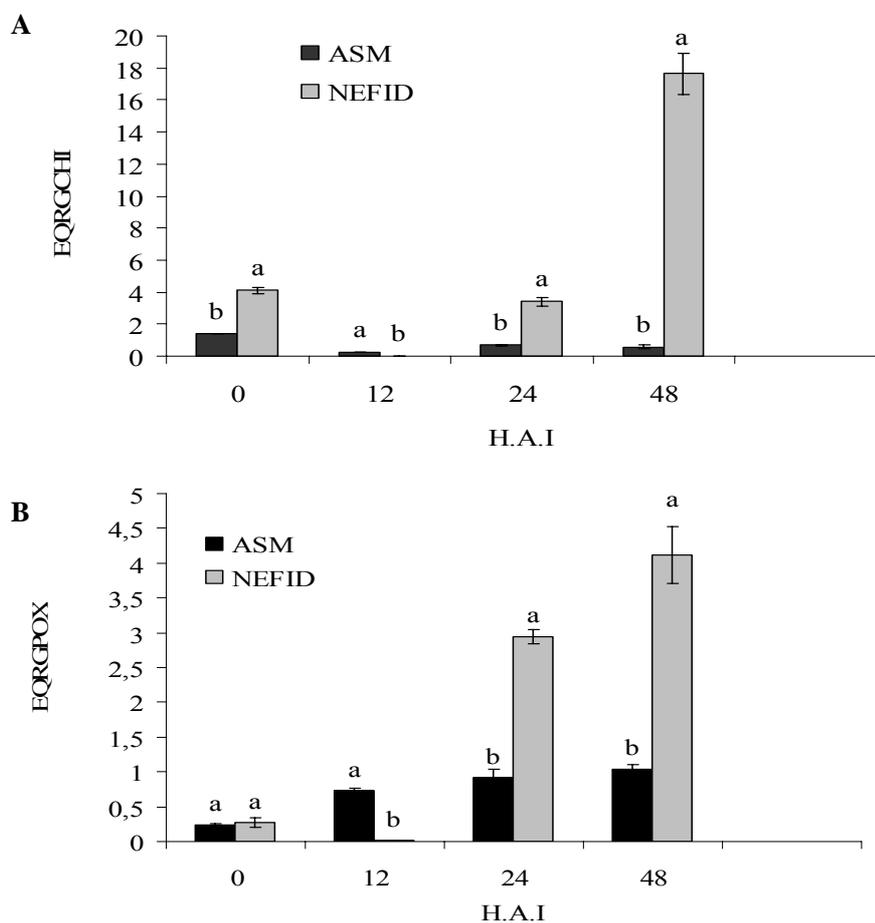


FIGURA 2 Perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos genes *CHI* (EQRGCHI) (A) e *POX* (EQRGPOX) (B), nos tempos 0, 12, 24, 48 horas após a inoculação das mudas de cafeeiro com *H. vastatrix*, equivalentes a 168, 180, 192 e 216 horas após a pulverização com os indutores ASM e NEFID. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos em plantas induzidas e inoculadas relativas aos controles induzidos e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir do *pool* de cDNA das três repetições biológicas. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *UBI*. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas de um mesmo tempo, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste t - Bonferroni. HAI: horas após a inoculação.

4.3 Efeito da inoculação com *Hemileia vastatrix* sobre a expressão quantitativa relativa dos genes *CHI* e *POX* em mudas controle de cafeeiro, pulverizadas com água.

A análise do efeito do patógeno sobre a expressão quantitativa dos genes *CHI* e *POX* em plantas controle, pulverizadas com água e inoculadas com *H. vastatrix*, mostra que os níveis de expressão de ambos os genes foram maiores no momento da inoculação, 0 HAI (168 HAP) e que, neste tempo, os níveis de transcritos do gene *CHI* foram superiores aos do gene *POX* (Figura 3). Nos tempos de análise sucessivos, observa-se uma queda na expressão de ambos os genes, principalmente do gene *CHI*, cuja expressão se mantém constantemente baixa até o último período de tempo analisado, 96 HAI. A expressão do gene *POX* foi maior que a expressão do gene *CHI*, nos períodos de tempo de 24 e 48 HAI, havendo um decréscimo nos níveis de transcritos 96 HAI, tempo em que os níveis de expressão dos dois genes se igualaram (Figura 3).

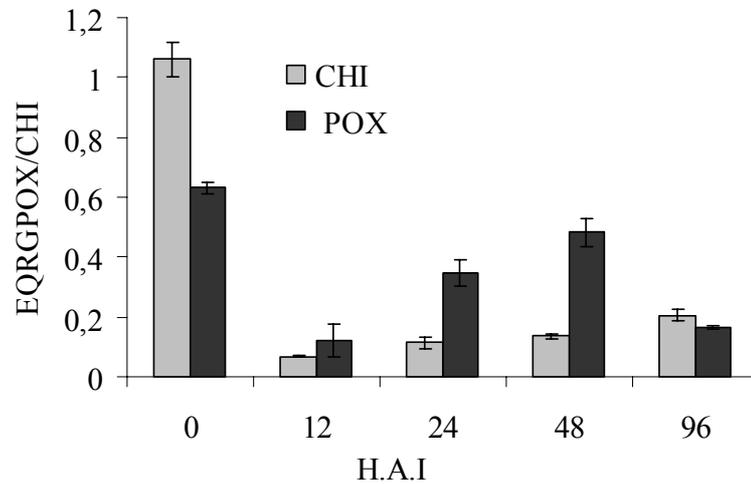


FIGURA 3 Perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos genes *CHI* e *POX*, nos tempos 0, 12, 24, 48 e 96 horas após a inoculação das mudas de cafeeiro com *H. vastatrix*. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos em plantas controle pulverizadas com água e inoculadas relativas aos controles pulverizados com água e não inoculados, no mesmo período de tempo, com valores dados a partir do *pool* de cDNA das três repetições biológicas. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *UBI*. EQRGPOX/CHI (Expressão quantitativa relativa dos genes *POX* e *CHI*). HAI: horas após a inoculação.

4.4 Efeito aditivo dos indutores e da inoculação com *Hemileia vastatrix* sobre a expressão quantitativa relativa dos genes *CHI* e *POX* em cafeeiro

A análise do efeito do indutor adicionado ao efeito do patógeno sobre a expressão quantitativa relativa dos genes *CHI* e *POX* em mudas de cafeeiro mostrou que, em plantas induzidas por ASM, é possível observar um pico máximo de expressão de ambos os genes, no momento da inoculação (0 HAI); equivalente a 168 HAP (Figura 4A e 4B). No entanto, neste período de análise, o efeito do patógeno sobre a expressão do gene *CHI* foi maior que o efeito do ASM, enquanto que para a expressão do gene *POX*, pode ser observado o

contrário, ou seja, o indutor exerceu maior efeito sobre a expressão gênica do que o patógeno (Figura 4B). Nos períodos seguintes de análise, houve decréscimo nos níveis de expressão de ambos os genes e maior efeito do ASM sobre a expressão gênica. Os níveis de transcritos de *CHI* tornam-se bastante reduzidos 24 HAI, mas sofrem um aumento gradativo 48 e 96 HAI, por efeito gradual do ASM (Figura 4A). O perfil de expressão do gene *POX* foi diferente do perfil de expressão do gene *CHI*, especialmente no período de 96 HAI, quando os níveis de transcritos de *POX* sofrem redução expressiva (Figura 4B). É importante considerar que não ocorreu supressão da expressão gênica por efeito do patógeno ou do indutor.

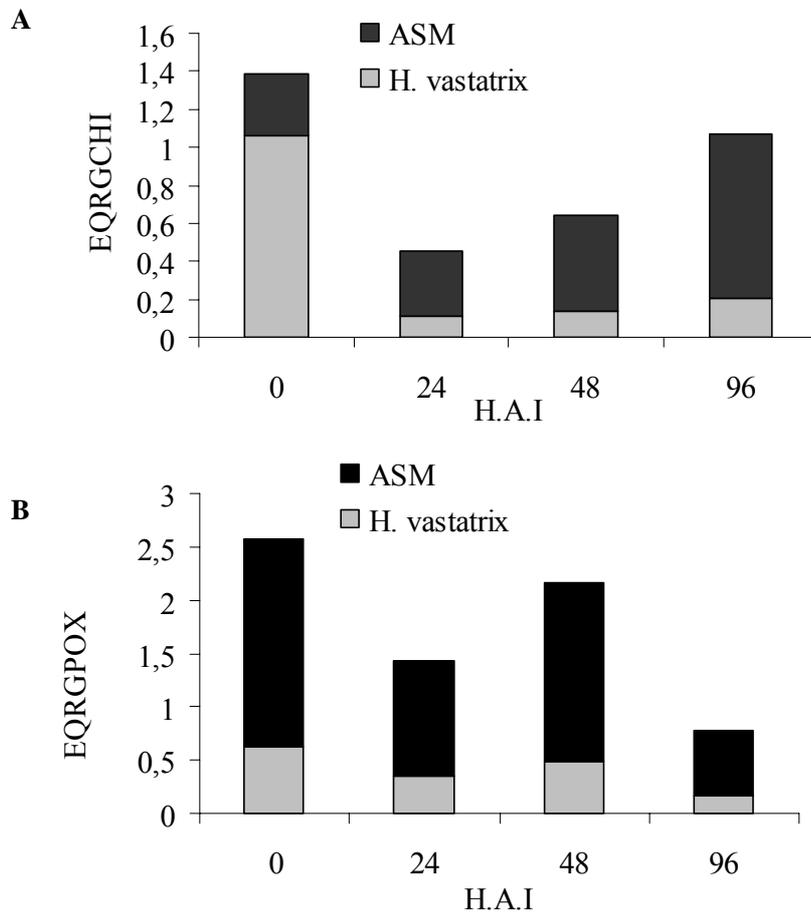


FIGURA 4 Análise do efeito do indutor ASM adicionado ao efeito do patógeno sobre o perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos genes *CHI* (EQRGCHI) (A) e *POX* (EQRGGPOX) (B), nos tempos 0, 12, 24, 48 e 96 horas após inoculação das mudas de café com *H. vastatrix*, correspondentes a 168, 180, 192, 216 e 264 horas após pulverização das mudas com ASM. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos em plantas induzidas e inoculadas relativas aos controles pulverizados com água e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir do *pool* de cDNA das três repetições biológicas. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *UBI*. HAI: horas após a inoculação.

Em mudas de café induzidas por NEFID, o nível máximo de expressão do gene *CHI* ocorreu 96 HAI (264 HAP) (Figura 5A). O efeito do indutor sobre a expressão gênica foi consideravelmente maior que o efeito do patógeno, nos períodos 24, 48 e 96 HAI, sendo possível observar aumento gradativo da expressão gênica de *CHI*. No momento da inoculação, 0 HAI, observa-se o menor nível de expressão gênica, entretanto, o patógeno exerceu um efeito maior que o NEFID sobre os níveis de transcritos do gene *CHI* (Figura 5A). O efeito aditivo de NEFID/*H. vastatrix* para a expressão do gene *POX* foi distinto do perfil observado para o gene *CHI*. O NEFID apresentou efeito maior sobre a expressão gênica de *POX* do que o patógeno, em todos os tempos analisados (Figura 5B), sendo possível observar dois picos de expressão do gene *POX*, 0 e 48 HAI. Nos períodos de 24 e 96 HAI, houve redução na expressão devido ao efeito de NEFID e do patógeno, mas, nesses tempos, o indutor exerceu maior efeito sobre a redução da expressão gênica (Figura 5B). Nessas análises também não ocorreu supressão da expressão gênica por efeito do patógeno ou do indutor.

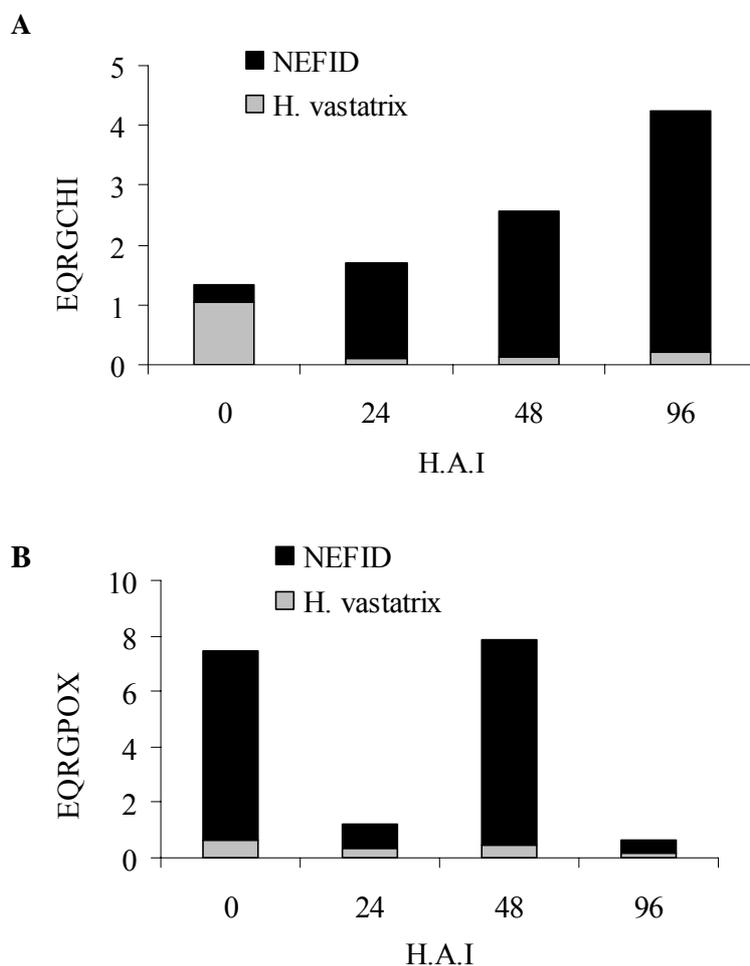


FIGURA 5 Análise do efeito do indutor NEFID adicionado ao efeito do patógeno sobre o perfil da expressão quantitativa relativa por PCR em tempo real (qRT-PCR) dos genes *CHI* (EQRGCHI) (A) e *POX* (EQRGPOX) (B), nos tempos 0, 12, 24, 48 e 96 horas após inoculação das mudas de café com *H. vastatrix*, correspondentes a 168, 180, 192, 216 e 264 horas após pulverização das mudas com NEFID. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos em plantas induzidas e inoculadas relativas aos controles pulverizados com água e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir do *pool* de cDNA das três repetições biológicas. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão do gene *UBI*. HAI: horas após a inoculação.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi estudado o perfil da expressão de dois genes importantes da resposta de defesa induzida, os genes *CHI* e *POX*, em mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo, susceptível ao fungo *H. vastatrix*, em resposta aos tratamentos com ASM e NEFID. ASM e outros indutores de resistência podem controlar o desenvolvimento de fitopatógenos. Diante da exposição a um eliciador, os tecidos vegetais reagem mais rápida e eficientemente a tentativas de infecção por patógenos e os mecanismos de defesa vegetal são também ativados em tecidos não infectados (resistência sistêmica adquirida, SAR), tornando a planta resistente a infecções secundárias pelo mesmo patógeno ou patógenos relacionados (Ryals et al., 1996). A SAR está associada a uma ampla variedade de genes de defesa. Dentre estes, destacam-se os genes que codificam para as várias classes de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), já mencionadas anteriormente. Devido à correlação entre a indução de genes que codificam para PRPs e o desenvolvimento da resistência a doença, esses genes são marcadores moleculares utilizados para o estudo da resposta de defesa (Loon et al., 1997).

Diversos trabalhos confirmam que os genes *CHI* e *POX* têm sua expressão induzida ou ocorre acúmulo das proteínas por eles codificadas em resposta a indutores de resistência e a presença de patógenos em cafeeiro (Guzzo & Martins, 1996; Amaral, 2005; Nardi et al., 2006) e em outras culturas (Baysal et al., 2003; Buzi et al., 2004; Cavalcanti et al., 2006, Pereira, 2008; Costa, 2008; Medeiros, 2009), o que fundamenta a escolha desses genes para a análise do perfil de expressão mediante indução de resistência e presença do patógeno.

A análise do efeito de ASM e NEFID sobre o perfil da expressão do gene *CHI*, na ausência do patógeno, ao longo dos oito tempos após a aplicação dos indutores (Figura 1A), indica que estes ativaram a expressão gênica de modo distinto. ASM parece ter induzido a expressão do gene *CHI* mais rapidamente

que NEFID. Às 24 HAP com ASM, já se observaram níveis elevados de transcritos do gene *CHI* e níveis baixos destes em plantas induzidas por NEFID. É interessante notar que, quando os níveis de transcritos do gene *CHI* ativados por ASM decrescem, nas plantas pulverizadas com NEFID ocorre aumento gradativo da expressão desse gene, que atinge nível máximo 264 HAP.

A pressuposição de que a indução do fenômeno de SAR por ASM ocorre mais rapidamente, também foi considerada no trabalho de Marchi et al. (2002). Foi possível observar que o ASM não foi capaz de induzir resistência em cafeeiro a *H. vastatrix* quando o intervalo entre aplicação do produto e inoculação foi de sete dias. Isso, possivelmente, ocorreu porque os níveis de PRPs induzidos por ASM já estavam baixos 168 HAP, período em que, no presente trabalho, foram observados níveis muito baixos de transcritos do gene *CHI* induzidos por ASM (Figura 1A). Porém, ainda a respeito do trabalho de Marchi et al. (2002), quando o indutor foi aplicado 3 dias antes da inoculação, a eficiência de redução da incidência da ferrugem variou de 27,81% para 100%.

Prosseguindo nas análises apenas do efeito dos indutores, os níveis de expressão dos genes *CHI* e *POX* eliciados por NEFID se mantiveram mais altos e em maior tempo do que aqueles eliciados por ASM, como indicado pelos picos de expressão consecutivos 216 e 264 HAI para o gene *CHI* e 168 e 216 HAP para o gene *POX* (Figura 1B). Pode-se especular que diferentes sinais estejam ativando diferentes vias de sinalização de defesa.

No processo de indução de resistência, o AS, do qual o ASM é análogo, participa como uma molécula sinal capaz de inibir a catalase, levando a um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cujos derivados podem atuar em cascatas de sinalização para a expressão de genes relacionados à defesa. O AS é uma entre outras moléculas que operam como um sinal capaz de desencadear a resistência induzida (Sticher et al., 1997). Em NEFID, uma combinação de elicitores provenientes do patógeno inativado e de oligômeros

tecido vegetal ativa sinais que estimulam respostas de defesa (Medeiros, 2009). O acúmulo de compostos fenólicos, presentes em grande quantidade no NEFID, na parede celular da planta, pode explicar o aumento nos níveis de transcritos do gene *POX* nas mudas pulverizadas com NEFID. Em estudos de Silva et al. (2002), o aumento da atividade de peroxidase e de fenilalanina amônio-liase (PAL) foi relacionado ao acúmulo tardio de compostos fenólicos e à lignificação da parede celular em plantas de café inoculadas com *H. vastatrix*.

A resposta de defesa celular efetivada pelo patógeno, representada neste trabalho pela expressão de genes *CHI* e *POX* em mudas de cafeeiro induzidas por ASM e NEFID, mostrou expressão rápida do gene *CHI* e em níveis mais elevados que a expressão do gene *POX*, no momento da inoculação (168 HAP) (Figura 2A e 2B). Nas interações planta-patógeno, a transcrição aumentada de numerosos genes que codificam PRPs pode ser monitorada logo nas primeiras horas que seguem a inoculação do patógeno (Maleck et al., 2000; Scheideler et al., 2002). Diversos trabalhos sugerem que a rapidez dessas mudanças transcricionais esteja ligada ao reconhecimento imediato de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) por proteínas receptoras das células da planta hospedeira, logo que ocorre a germinação dos esporos do fungo na superfície da folha (Heath, 1997; Mould et al., 2003), o que explica a expressão rápida desses genes nas primeiras horas após a inoculação.

Os picos de expressão de quitinase, induzidos pelo patógeno, observados em plantas tratadas com NEFID 24 e 48 horas após a inoculação, coincidem exatamente com os momentos em que ocorre a germinação da maioria dos esporos e diferenciação dos apressórios no estômato das folhas de cafeeiro susceptíveis (Ganesh et al., 2006). Silva et al. (2006) observaram, por análise histoquímica, a presença de numerosas hifas de penetração 48 HAI de plantas de cafeeiro susceptíveis. Silva et al. (1999) e Guerra-Guimarães et al. (2001) constataram que as paredes das hifas intracelulares e os haustórios de *H.*

vastatrix contém β -1,3-glucanas e resíduos de N-acetilglucosamina, monômeros formadores de quitina. As enzimas hidrolíticas β -1,3-glucanases e quitinases podem ter, então, um papel relevante na restrição do desenvolvimento do patógeno em plantas de café induzidas à resistência, por degradarem as estruturas de infecção de *H. vastatrix*. A indução de resistência de cafeeiro por NEFID, de acordo com os níveis de transcritos do gene *CHI* induzidos, mostrou-se promissora para o controle da ferrugem do cafeeiro, embora seja fundamental considerar a relevância dos eventos pós-transcricionais de regulação da expressão gênica. Amaral (2005) verificou que NEFID e um extrato vegetal semelhante conferiram proteção em mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* e promoveram aumento nas atividades das PRPs, peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase.

Em experimento de campo, realizado por Toyota (2008), em cafeeiro convencional, avaliando o efeito da aplicação de extratos vegetais sobre a ferrugem, foi observada redução da severidade da doença em 26%, promovida pela aplicação de um produto muito semelhante ao NEFID. No trabalho de Resende et al. (2007a), ocorreu aumento da atividade de peroxidases de guaiacol, quitinases e β 1,3 glucanases em cacaueiro induzido por ASM e extrato vegetal a partir de 4 até 18 dias após a pulverização, em relação a plantas não induzidas, indicando uma ativação duradoura de respostas de defesa.

Em relação ao efeito do patógeno sobre a indução da expressão do gene *CHI*, em plantas induzidas por ASM, nos tempos aqui analisados foram detectados baixos níveis de transcritos (Figura 2B). Esse resultado é condizente com o observado por Guzzo et al. (2001), que detectaram aumento local e sistêmico da atividade de quitinase e β -1,3-glucanases e também expressão dos genes codificadores dessas hidrolases apenas 72 HAI em cafeeiro cultivar Mundo Novo. É possível que o aumento expressivo de transcritos desses genes,

por efeito do patógeno, em plantas tratadas com ASM, ocorra em tempos posteriores aos aqui analisados.

Guzzo (2004) sugere que, inicialmente após a inoculação, ocorre maior ativação de genes relacionados aos mecanismos iniciais de percepção e transdução de sinais, que vão sinalizar a célula vegetal para induzir a expressão de genes e síntese subsequente de compostos de defesa. Entre estes genes, o *NPR1* está envolvido na regulação da resistência induzida, uma vez que há uma ligação direta entre a atividade da proteína NPR1 e a regulação da expressão de genes codificadores de PRPs (Zhou et al., 2000). Seria interessante monitorar a expressão desse gene, concomitantemente com as análises de expressão de genes de PRPs, como os estudados nesse trabalho, pois, segundo o trabalho desenvolvido por Pieterse et al. (2001) e Nawrath & Métraux (1999), plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* deficientes no acúmulo da AS ou da proteína reguladora NPR1 são incapazes de desencadear a SAR e de ativar a síntese de PRPs associadas à resistência sistêmica.

Alguns estudos mostram o envolvimento da proteína NPR1 no processo denominado sensibilização ou *priming* caracterizado pela ativação rápida e intensa de respostas de defesa celular, após o contato com o patógeno, em plantas previamente induzidas (Conrath et al., 2002). Possivelmente, a manutenção de um mecanismo de controle das respostas de defesa proporciona economia de energia para a planta na ativação de respostas de defesa, que ocorre na presença do patógeno.

O rápido aumento da expressão do gene *CHI* potencializada por *H. vastatrix*, em plantas tratadas com NEFID, observada entre 24 e 48 HAI e do gene *POX* entre 12 e 24 HAI (Figura 2A e 2B) pode ser atribuído ao efeito *priming*, bem como à expressão rápida desses genes, observada no momento da inoculação, em plantas não tratadas (Figura 3). Entretanto, é necessária uma maior investigação para certificar a ocorrência desse efeito no presente estudo.

A análise do efeito limitado do patógeno sobre a expressão gênica mostrou níveis mais elevados do gene *POX* nos tempos, 12, 24 e 48 HAI e um decréscimo na expressão foi observado 96 HAI, em comparação com o gene *CHI* (Figura 3). Esses resultados diferem do observado no trabalho realizado por Pereira (2008), cujo resultado de uma das análises feitas, avaliando o efeito de *Crinipellis pernicioso* sobre a expressão destes mesmos genes em cacaueteiro, mostrou um possível silenciamento do gene *CHI* na presença do patógeno. A supressão de defesa de plantas susceptíveis por patógenos tem sido considerada como uma das etapas chaves na patogênese (Nomura et al., 2005). Essa possível supressão não foi observada neste trabalho, provavelmente por se tratarem de patossistemas diferentes, com ativação de mecanismos de resistência distintos, tanto em relação ao tempo de ativação quanto aos componentes envolvidos, devido, principalmente, às diferenças genéticas existentes entre cacaueteiro e cafeeiro e entre os respectivos patógenos.

Diversos estudos confirmam a importância das peroxidases na defesa contra infecções por patógenos, especialmente em infecções por fungos (Curts et al., 1997) e, embora essas proteínas não tenham atividade direta sobre o patógeno, POX ativadas por elicitores são parte de uma rede interligada de defesa para conter o desenvolvimento do patógeno (Kang, 2009). As POX estão relacionadas com o processo de proteção antioxidativa catalisando a oxirredução de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio e também com o aumento na síntese de lignina, que fortalece a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas por alguns patógenos (Kvaratskhelia et al., 1997).

No trabalho de Cavalcanti et al. (2006) foi observado aumento da atividade de POX em plantas de tomate tratadas com extratos vegetais e ASM e inoculadas com *Xantomonas vesicatoria*, nas primeiras 4 horas após o tratamento, havendo acúmulo dessa proteína até 72 horas após o tratamento. No presente trabalho, níveis elevados de expressão do gene *POX* foram induzidos

por efeito aditivo de ambos os indutores e do patógeno no momento da inoculação.

Os resultados deste trabalho mostraram efeito aditivo na expressão de genes *CHI* e *POX* na presença de indutores e patógeno em mudas de cafeeiro susceptíveis (Figuras 4 e 5). Para realizar essa análise, comparou-se a expressão gênica de plantas não tratadas com indutores e não inoculadas (controles) com plantas tratadas e não inoculadas, obtendo-se apenas o efeito do indutor de resistência sobre a expressão gênica. Esse nível de expressão de ambos os genes foi, então, comparado com a expressão induzida apenas pelo efeito do patógeno, resultante da comparação entre as expressões gênicas em plantas não tratadas e não inoculadas, com plantas não tratadas e inoculadas.

Análises semelhantes foram realizadas por Pereira (2008). Estudando o patossistema cacaueiro/*C. pernicioso*, observou-se que os indutores ASM e Agromos[®] atuaram no sentido de elevar os níveis de expressão dos genes *CHI* e *POX*, ao passo que o efeito do patógeno foi mais marcante para a supressão da defesa. Aqui, não houve supressão da defesa, conforme mencionado anteriormente.

Os resultados do presente trabalho revelaram que o momento da inoculação foi o único tempo em que o efeito aditivo do patógeno foi maior que o efeito dos indutores sobre a expressão do gene *CHI* (Figuras 4A e 5A). As análises da expressão do gene *POX* indicaram que ASM e NEFID tiveram maior contribuição na indução da expressão que *H. vastatrix*, em todos os tempos analisados (Figuras 4B e 5B). Não foi observado efeito apenas do patógeno ou do indutor sobre o aumento dos níveis de transcritos dos genes *CHI* e *POX* em nenhum tempo analisado.

6 CONCLUSÕES

Os tratamentos com ASM e NEFID induziram a expressão dos genes *CHI* e *POX* em mudas de cafeeiro susceptíveis à ferrugem alaranjada, tendo os perfis de expressão sido bastante variados em relação ao indutor utilizado e ao gene analisado.

ASM induziu a expressão do gene *CHI* mais rapidamente que NEFID e os maiores níveis de expressão de ambos os genes ocorreram em plantas induzidas por NEFID. A expressão gênica foi potencializada pelo patógeno em mudas de cafeeiro induzidas, observando-se variações entre os genes, os indutores e os tempos analisados. O cafeeiro cultivar Mundo Novo, susceptível à ferrugem, eleva os níveis de transcritos dos genes *CHI* e *POX* na presença do patógeno e ausência de tratamento com indutores de resistência. Por fim, conclui-se que, em todos os períodos após a inoculação analisados, ocorreu efeito aditivo dos indutores e do patógeno sobre a expressão dos genes *CHI* e *POX*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo revelaram que genes *CHI* e *POX* foram induzidos em cafeeiro pelo tratamento com NEFID e com o indutor padrão de resistência ASM e que os perfis de expressão gênica diferiram entre os genes analisados e entre os indutores utilizados.

Esses resultados despertam o interesse em estudos de confirmação da eficiência de indutores de resistência, especialmente de extratos vegetais, em ativar os mecanismos de defesa vegetal para o controle alternativo de doenças.

A ativação das respostas de defesa, bem como os mecanismos que as envolvem, são complexos e, durante uma íntima interação planta-patógeno, é esperado detectar aumentos e decréscimos de níveis de expressão e atividade dos diversos genes e proteínas envolvidos na defesa vegetal, durante todo o curso do processo infeccioso.

Não foi objetivo, com a realização deste trabalho, analisar se a resistência conferida por NEFID e ASM, verificada pela expressão dos genes *CHI* e *POX*, confere proteção em cafeeiro contra *H. vastatrix*. Diversos estudos confirmaram a eficiência do ASM em reduzir a severidade dos sintomas causados por *H. vastatrix* em cafeeiro. Trabalhos do mesmo grupo de pesquisa já foram realizados com a finalidade de analisar a proteção de cafeeiro conferida por NEFID contra a ferrugem e resultados satisfatórios foram obtidos. Além disso, já foram desenvolvidos estudos, no mesmo patossistema, de atividade enzimática de quitinases, peroxidases e de outras proteínas relacionadas à patogênese, em condições (tempos de análise e padrões comparativos) parecidas com as estudadas no presente trabalho.

Com base nas considerações acima, torna-se clara a necessidade de integrar esses conhecimentos e realizar outros estudos para elucidar as vias de

sinalização de defesa e as proteínas ativadas por esses indutores para, então, validá-los como potenciais produtos para aplicações práticas, especialmente indutores de resistência alternativos, como o NEFID.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIE, B. A.; PEREZ-PEREZ, J. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1665-1681, 2007.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. New York: Academic, 2005. 922 p.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

ALVES, E. Mecanismos estruturais na resistência de plantas a patógenos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, p. 154-156, 2007.

AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANGUELOVA-MERHAR, V. S.; WESTHUIZEN, A. J. van der; PRETORIOUS, Z. A. Intercellular chitinase and peroxidase activities associated with resistance conferred by gene Lr 35 to leaf rust of wheat. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 159, n. 11, p. 1259-1261, 2002.

ATHAYDE, S. C.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.

AZINHEIRA, H. G. **Estudos celulares bioquímicos e moleculares da diferenciação de *Hemileia vastatrix***. 2005. 142 p. Thesis (Doctor in Agronomy) Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

BARGUIL, B. M.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, R. S.; BEZERRA JUNIOR, J. E. A.; SALGADO, S. L. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.

BARI, R.; JONES J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, p. 473-488, 2009.

BAYSAL, Ö.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 6, p. 747-753, 2003.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, mar./abr. 2004.

BRUNNER, F.; STINTZI, A.; FRITIG, B.; LEGRAND, M. Substrate specificities of tobacco chitinases. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 225-234, Apr. 1998.

BUZI, A.; CHILOSI, G.; SILLO, D. de; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 1, p. 34-42, 2004.

CAFEICULTURA. Patrocínio: Agencia Impacto Patrocínio, 2009. Disponível em: <<http://www.revistacafeicultura.com.br>>. Acesso em: 24 mar. 2009.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 408-417, 2006b.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, J. P. M. S.; SILVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, J. T. A. O. Activities of oxidant enzymes and photosynthetic response in tomato pré-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4/6, p. 198-208, Apr./Jun. 2006a.

CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; PEREIRA, R. B.; ZACARONI, A. B.; VILLAS BOAS, C. H.; RESENDE, M. L. V. Natural extracts induce lignification on cocoa and tomato leaves. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 107.

CHALFOUN, S. M.; ZAMBOLIM, L. Ferrugem do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 42-46, jun. 1985.

COL, D. L. The efficacy of Acibenzolar-S-Methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection**, Oxford, v. 18, p. 267-273, 1999.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: safra de 2009: segunda estimativa. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Boletim.pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2009.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 210-216, 2002.

COSTA, J. C. B. **Prospecção de indutores de resistência para o manejo da vassoura-de-bruxa do cacauero**. 2008. 86 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CURTIS, M. D.; RAE, A. L.; RUSU, A. G.; HARRISON, S. J.; MANNERS, J. M. A peroxidase gene promoter induced by phytopathogens and methyl jasmonate in transgenic plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, n. 3, p. 326-338, Apr. 1997.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**, Sofia, v. 31, n. 1/2, p. 105-24, 2005.

ESKES, A. B. **Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*)**. 1983. 140 f. Thesis (Doctoral) - Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 5, p. 677-700, 2007.

GANESH, D.; PETITOT, A. S.; SILVA, M. C.; ALARY R.; LECOULLS, A. C.; FERNANDEZ, D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, Washington, v. 170, p. 1045-1051, 2006.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas e seu controle**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 184-200.

GUERRA-GUIMARÃES, L.; SILVA, M. C.; NICOLE, M.; AZINHEIRA, H. G.; RODRIGUES JUNIOR, C. J.; PINTO, C. R. Chitinase activity associated with coffee-rust interaction. In: CONGRESS OF THE MEDITERRANEAN PHYTOPATHOLOGICAL UNION, 11.; CONGRESS OF THE SOCIEDADE PORTUGUESA DE FITOPATOLOGIA, 3., 2001, Évora. **Proceedings...** Évora: [s. n.], 2001. p. 356-358.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Centro de Engenharia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUZZO, S. D.; CASTRO, R. M. de; KIDA, K.; MARTINS, E. M. F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2001.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 449-454, 1996.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, dez. 1987.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, p. 177-193, 2003.

HARRISON, M. J.; BALDWIN, I. T. Biotic interactions: ploy and conter-ploy in the biotic interactions of plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 353-355, 2004.

HEATH, M. C. Nonhost resistance and non-specific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 315-319, 2000.

HEATH, M. C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 6, p. 713-720, 1997.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 3, p. 171-180, 2003.

ISHIDA, A. K. N.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; AMARAL, D. R.; RESENDE, M. L. V. Extrato vegetal e acibenzolar-S-metil (ASM) na indução de resposta de defesa do algodoeiro contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40., 2007, Maringá. **Anais...** Lavras: UFLA, 2007. p. 262.

JOHAL, G. S.; GRAY, J.; GRUIS, D.; BRIGGS, S. P. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 468-474, 1995.

KANG, N. J. Induced resistance to powdery mildew by 2,6-dichloroisonicotinic acid is associated with activation of active oxygen species-mediated enzymes in cucumber plants. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 78, n. 2, p. 185-194, Apr. 2009.

KAWAOKA, A.; MATSUNAGA, E.; ENDO, S.; KONDO, S.; YOSHIDA, K.; SHINMYO, A.; EBINUMA, H. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1177-1185, July 2003.

KEEN, N. T. Phytoalexins and their elicitors. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 1990. cap. 6, p. 114-129

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPRI/NIM1* gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, 2002.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R. N. F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 1237-1245, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method. **Methods: a companion to methods in enzymology**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOON, L. C. van. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Dec. 1997.

LOON, L.C. van; BAKKER, P.A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

LOON, L.C. van; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 12, p. 245-264, 1994.

LOON, L.C. van; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

LOON, L.C. van; STRIEN, E. A. van. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.

MALECK, K. A.; LEVINE, T.; EULGEM, A.; MORGAN, J.; SCHMID, K. A.; LAWTON, J. L.; DANGL, R. A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature genetics**, New York, v. 26, n. 4, p. 403-410, Dec. 2000.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. de F.; RESENDE, M. L. V. Proteção induzida por benzotiadiazole contra a ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1103-1106, 2002.

MARTINS, E. M.; GUZZO, S. D.; CASTRO, R. M.; KYDA, K. Ação protetora do Acibenzolar-S-Metil (Bion) em plantas de cafeeiro contra ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 1998. p. 177-178.

MARTINS, E. M.; MARIA, A. de; MORAES, W. B. C. Histological studies of compatible interaction of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 627-636, 1985.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. 387 p.

MAXEMIUC-NACCACHE, V. **Alterações bioquímicas em folhas de *Coffea arabica* resistentes e suscetíveis à infecção por *Hemileia vastatrix* (ferrugem do cafeeiro)**. 1983. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. Chitinase and β -1, 3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, p. 145-150, 1992.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 8, p. 185-190, 1985.

MEDEIROS, F. C. L. **Biochemical & molecular defense responses triggered by acibenzolar-S- metil and a multiple-elicitor plant formulation in tomato**. 2009. 133 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MELCHERS, L. S.; STUIVER, M. H. Novel genes for disease-resistance breeding. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 147-152, 2000.

MORAES, M. G. Mecanismos de resistência adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**, São Paulo, v. 6, p. 261-284, 1998.

- MOULD, M. J.; XU, T.; BARBARA, M.; ISCOVE, N. N.; HEATH, M. C. DNAs generated from individual epidermal cells reveal that differential gene expression predicting subsequent resistance or susceptibility to rust fungal infection occurs prior to the fungus entering the cell lumen. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, p. 835-845, 2003.
- MUR, L. A. J.; KENTON, P.; ATZORN, P.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C. The outcomes of concentration specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 249-262, 2006.
- NARDI, B. de; DREOS, R.; TERRA, L. del; MARTELLOSI, E. A.; TORNICASA, D. G.; PACCHIONI, R. R.; PALLAVICINI, A.; GRAZIOSI, G. Differential responses of *coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 1594-1605, 2006.
- NAWRATH, C.; MÉTRAUX, J. P. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1393-1404, 1999.
- NOJOSA, G. B. A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. e *Phoma costarricensis* Echandi.** 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 139-153.
- NOMURA, K.; NELOTO, M.; HE, S. Y. Suppression on host defense in compatible plant – *Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 4, p. 361-368, Aug. 2005.
- PARK, S. W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIG, D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science Magazine**, Washington, v. 318, n. 5847, p. 113-116, 2007.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-453.

PECK, S. C. Early phosphorylation events in biotic stress. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 344-338, 2003.

PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S. Melhoramento genético do cafeeiro visando resistência às doenças. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1999. p. 117-140.

PEREIRA, L. de M. **Expressão quantitativa de genes relacionados à defesa induzida em Theobroma caçã por BION® e AGROMÓS® contra Crinipellis pernicioso**. 2008. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIETERSE, C. M. J.; PELT, J. A. van; WEES, S. C. M. van; TON, J.; LÉONKLOOSTERZIEL, K. M.; KEURENTJES, J. J. B.; VERHAGEN, B. W. M.; KNOESTER, M.; SLUIS, I. van der; BAKKER, P. A. H. M.; LOON, L. C. van. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 51-61, 2001.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASSAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting Rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.

RESENDE, M. L. V. Mecanismos de resistência a doenças fúngicas vasculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 329-351, 1996.

RESENDE, M. L. V.; ARAUJO, D. V.; COSTA, J. C. B.; DEUNER, C. C.; FERREIRA, J. B.; MUNIZ, M. F. S.; REIS, S. N.; SANTOS, F. S.; CAVALCANTI, L. S.; NOJOSA, G. B. A. Produtos comerciais a base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, n. 1, p. 361-380, jan. 2006.

RESENDE, M. L. V.; BARGUIL, B. M.; RESENDE, R. S.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; SALGADO, S. M. L. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PRPROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 2004, Elsinore. **Abstract...** Elsinore: Universitas Friburgenis, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V.; BARRETTI, P. B.; MEDEIROS, F.C. L.; SILVA, D. D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. O.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, M. A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 129-198, 2007b.

RESENDE, M. L. V.; COSTA, J. C. B.; CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; CAMILO, F. R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 213-221, 2007a.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; CAVALCANTI, L. S.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO, R. M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, 2002.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 123-130, 2003.

ROVERATTI, D. S.; TEIXEIRA, R.; MORAES, W. B. *Bacillus thuringiensis* – A new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 126, p. 149-159, 1989.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, Oct. 1996.

SANTOS, F. S. **Epidemiologia e manejo de doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) sob cultivo orgânico**. 2006. 146 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, F.; SOUZA, P.; RESENDE, M. L.V.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; MANERBA, F. C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SCHEIDELER, M. N. L.; SCHLAICH, K.; FELLEBERG, T.; BEISSBARTH, N. C.; HAUSER, M.; VINGRON, A. J.; SLUSARENKO, A. J.; HOHEISEL, J. D. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defence metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 12, p. 10555–10561, 2002.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J. P.; RICHARMOND, T.; SOMERVILE, S. C.; MANNERS, J. M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SCHNEPFLEITNER, C.; MAFFIA, L. A.; BARBOSA, L. C. D.; SANTOS, R. H. S. Germinação de uredíniosporos de *Hemileia vastratrix* e de *Uromyces appendiculatus* em presença de extratos de plantas medicinais. In: SIMPOSIO DE INICIACAO CIENTIFICA DA UFV, 6., 1996. Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1996. p. 151.

SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. Establishment of biotroph by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 641-667, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 54-56, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Org.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

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

SILVA, M. C.; NICOLE, M.; RIJO, L.; GEIGER, J. P.; RODRIGUES JÚNIOR, C. J. Cytochemical aspects of the plant rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv.Caturra) - *Hemileia vastatrix* (race III). **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 160, n. 1, p. 79-91, 1999.

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

STASKAWICZ, B. J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, p.73-76, 2001.

STICHER, L.; MAUCHI-MANI, B.; MÈTRAUS, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 61, n. 4, p. 437-455, Feb. 2004.

TOYOTA, M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; PEREIRA, L. F. P.; SANTOS, S. N.; MORAES, A. H. A.; METHA, A.; OLIVEIRA, A. C.; LABATE, C. A.; MARINO, C. L. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 95-108, jan./mar. 2006.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Efeito de baixas temperaturas e do binômio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos urediosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseoli typica* Arth. **Experientiae**, Viçosa, MG, v. 17, p. 151-184, 1974.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do. Estratégias múltiplas no manejo integrado de doenças do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 137-153, 2003.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; COSTA, H.; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-café. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. cap. 10, p. 369-450.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. V. do; PEREIRA, A. A.; CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. v. 2, p. 83-179.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do café (*Coffea arabica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H.; AMORRIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.

ZHOU, J. M.; TRIFA, Y.; SILVA, H.; PONTIER, D.; LAM, E.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, p. 191- 202, 2000.