



SANDRA ELIZA GUIMARÃES

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA NA PROTEÇÃO
DO CAFEIRO CONTRA A CERCOSPORIOSE
E NA EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS
DE DEFESA**

LAVRAS – MG

2015

SANDRA ELIZA GUIMARAES

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA NA PROTEÇÃO DO CAFEIRO
CONTRA A CERCOSPORIOSE E NA EXPRESSÃO DE GENES E
PROTEÍNAS DE DEFESA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção de título de Doutor.

Orientador

PhD. Mário Lucio Vilela de Resende

Coorientador

Dr. Anderson Cleiton José

LAVRAS - MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Guimarães, Sandra Eliza.

Indutores de resistência na proteção do cafeeiro contra a cercosporiose e na expressão de genes e proteínas de defesa / Sandra Eliza Guimarães. – Lavras : UFLA, 2015.

118 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Mario Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. Indutor de resistência. 2. *Cercospora coffeicola*. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Espectrometria de massas. 5. Expressão gênica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

SANDRA ELIZA GUIMARAES

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA NA PROTEÇÃO DO CAFEEIRO
CONTRA A CERCOSPORIOSE E NA EXPRESSÃO DE GENES E
PROTEÍNAS DE DEFESA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção de título de Doutor.

APROVADA em 19 de março de 2015.

Dra. Eveline Teixeira Caixeta Embrapa

Dr. Jorge Teodoro de Souza UFLA

Dr. Luciano Paiva Vilela UFLA

Dr. Mário Lucio Vilela de Resende
Orientador

Dr. Anderson Cleiton José
Coorientador

LAVRAS – MG

2015

Tente mover o mundo - o primeiro passo será mover a si mesmo.

Platão

Dedico,

A Deus e a minha família, que me deu coragem para enfrentar meus medos e todos os desafios;

A minha pequena, Maria Clara, por ter suportado a minha ausência necessária para concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está acima de todas as coisas, sendo a força maior que nos move!

A minha família, pelo apoio, orações e incentivos, João, Maria Helena, Lúcio, Saulo e Maria Clara.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por intermédio do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia do Café (INCT-Café) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsa.

Ao orientador Mário Lúcio Vilela de Resende e à Anderson Cleiton José pelos ensinamentos, orientações e apoio.

À Leonor Guerra-Guimarães, Sandra Mathioni e Pedro Júnior pelos ensinamentos.

À banca pela participação.

Aos amigos do Laboratório Fisiologia do Parasitismo, obrigada pela parceria, convivência e amizade, em especial, Ana Cristina, Deila, Eliane, Josineide, Joyce, Manoel, Camila, Ingrid, pela ajuda, apoio e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório Biotecnologia Florestal, em especial, Natália, Olivia e Adriano.

Aos Amigos do LCBM, em especial, Kalynka, Fabrício, Letícia, Ricardo, Eliete, pelo ajuda e suporte.

Aos colegas de turma, muitas saudades, Valquíria Martins, Kátia Pôssa, em especial Tatiana Costa, pelo ajuda e esforços.

Aos amigos baianos, obrigada pelo incentivo, orações.

A todos que diretamente e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO GERAL

A indução de resistência consiste na ativação dos mecanismos de defesa vegetal para o controle de pragas e doenças. Entender os fenômenos moleculares envolvidos na interface patógeno e hospedeiro, bem como respostas das plantas a eliciadores, tem demandado cada vez mais estudos. A expressão gênica e a proteômica tornaram-se ferramentas importantes para obter informação sobre os mecanismos apresentados pelas plantas sobre uma determinada condição de estresse. O objetivo deste estudo foi analisar produtos indutores como Acilbenzolar -S- Methyl (ASM) e o extrato à base de subprodutos da cadeia produtiva do café- Greenforce CuCa, em mudas de *Coffea arabica*, cultivar Mundo Novo 376/4, para os quais foi verificada a expressão das enzimas de defesa – lipoxigenase, catalase, glutathione peroxidase, quitinase por meio da técnica qRT-PCR, as quais se mostraram mais expressas com os tratamentos, sendo que o ASM responde mais rapidamente e o Greenforce CuCa tem efeito menor, porém mais duradouro. Outro estudo foi realizado para verificar o perfil proteico das plantas tratadas com estes produtos observando por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Foi possível verificar a abundância de proteínas relacionadas a processos fotossintéticos e de defesa das plantas. Também foi possível notar que nas plantas tratadas com ASM houve uma redução na abundância das proteínas ao longo das horas após a aplicação deste produto e que o Greenforce CuCa teve uma abundância crescente ao longo das horas após a aplicação para proteínas relacionadas à defesa e a processos fotossintéticos. Em geral, os produtos testados apresentaram efeito indutor de resistência em plantas evidenciado por meio dos resultados obtidos.

Palavras-chave: Indutor de resistência. *Cercospora coffeicola*. Espécies reativas de oxigênio. Proteínas relacionadas à patogênese. Espectrometria de massas. Expressão gênica.

GENERAL ABSTRACT

The induction of resistance consists of the activation of plant defense mechanisms for the control of pests and diseases. Understanding the molecular phenomena involved in the pathogen and host interface, as well as the responses of plants to eliciting products, has demanded ever more studies. Gene and proteomic expressions have become important tools to obtain information regarding the mechanisms presented by the plants over a certain stress condition. The objective of this study was to analyze inducing products such as Acibenzolar S- Methyl (ASM) and the extract based on byproducts of the Greenforce Cuca coffee productive chain, on *Coffea arabica* seedlings, cultivar Mundo Novo 376/4, of which were verified the expression of defense enzymes lipooxygenase, catalase, glutathione peroxidase, by means of qRT-PCR, which were more expressive with the treatments, with ASM responding faster and Greenforce Cuca presenting slower, however more durable, effect. Another study was conducted to determine the protein profile of the plants treated with these products by means of two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. It was possible to verify the abundance of proteins related to photosynthetic processes and plant defense. We also noted that, in plants treated with ASM, there was a reduction in the abundance of proteins over the hours after applying this product and that the Greenforce Cuca presented a growing abundance over the hours after application for proteins related to defense and to photosynthetic processes. In general, the tested products presented inducing effect for plant resistance, evidenced by the results obtained.

Keywords: Resistance inducer. *Cercospora coffeicola*. Oxygen reactive species. Pathogenesis-related proteins. Mass spectrometry. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Efeito dos tratamentos sobre a cercosporiose em mudas de cafeeiro. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) e da incidência (AACPI) da doença. Controle da cercosporiose em porcentagem após os tratamentos com produtos químicos e extratos à base de subprodutos da cadeia produtiva do café. Barras com mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).67
- Figura 2 Efeito dos tratamentos Greenforce CuCa e ASM em mudas de cafeeiro. Expressão relativa dos genes que codificam para as enzimas lipoxigenase (A), catalase (B), glutathiona peroxidase (C), quitinase (D), nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos com os produtos. O gene GAPDH e o RPL7 foram usados como controle endógeno. Barras de erros representam o erro padrão da média de três repetições. As letras nas barras de erros representam a análise os efeitos de cada produto aplicados ao longo do tempo conforme Tukey 5% de probabilidade.69

ARTIGO 2

- Figura 1 Relação biológica das proteínas diferencialmente abundantes, encontradas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo e identificadas por análise dos peptídeos em espectrometria de massa por eletrospray. Análise realizada no Programa Mercator, acessado através do link: <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator> 103

Figura 2 Localização celular das proteínas diferencialmente abundantes, encontradas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo, e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray. Análise realizada no Programa Mercator, acessado através do link: <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator> 104

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Principais famílias das proteínas PR, propriedades, genes envolvidos e plantas nas quais foram descobertas	26
----------	--	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Tratamentos e doses utilizados na proteção de mudas de cafeeiro contra a cercosporiose em casa de vegetação	60
Tabela 2	Sequências dos primers utilizados para a análise de qRT-PCR.....	64

ARTIGO 2

Tabela 1	Proteínas diferencialmente abundantes encontradas em folhas de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Mundo Novo após aplicação de acibenzolar-S-metil e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray	95
Tabela 2	Proteínas diferencialmente abundantes encontradas em folhas de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Mundo Novo após aplicação de Greenforce CuCa e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray	99

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	O cafeeiro	18
3.2	Cercosporiose do cafeeiro	19
3.3	Resistência induzida	21
3.3.1	Proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR)	25
3.3.2	Espécies reativas de oxigênio	28
3.4	Transcriptoma	30
3.5	Proteômica	32
	REFERÊNCIAS	36
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	49
	ARTIGO 1 Indutores de resistência no controle da cercosporiose do cafeeiro: análise de genes relacionados à defesa	49
	ARTIGO 2 Proteínas diferencialmente expressas em cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.) após tratamento com indutores de resistência ..	81

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea* sp.) é amplamente cultivado em países tropicais, sendo uma das culturas mais tradicionais no Brasil. As espécies de cafeeiros mais exploradas comercialmente são *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café conilon ou robusta) representando, respectivamente, 71,2% e 28,8% da produção nacional (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2014). O seu cultivo ocorre principalmente na região Sudeste, onde estão os três maiores estados produtores: Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, respectivamente. Em Minas Gerais, a produção representa, em média, 53,3% de todo o café do Brasil, sendo que 98,8% dessa produção é de café arábica (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

Diversos fatores bióticos e abióticos afetam a produtividade da cultura, destacando-se as doenças, como a cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berkley & Cooke (ROMERO et al., 2010; VENTURA et al., 2007), um patógeno necrotrófico, que é controlado por mecanismos de resposta das plantas mediados pelo hormônio jasmonato ou ácido jasmônico, que leva à síntese de vários compostos envolvidos no sistema de defesa das plantas tais como, enzimas, compostos fenólicos e fitoalexinas (BUCHANNAN; GRUÍSSEM; JONES, 2006; PIETERSE et al., 2014).

Este microrganismo é responsável por causar grandes prejuízos desde 1971 nas regiões altas do Espírito Santo e Minas Gerais. Em condições amenas de temperatura e alta umidade, as quais são ideais para o desenvolvimento da doença, as perdas na produção podem chegar até 30% (CARVALHO; CHALFOUN, 2001).

A utilização de cultivares resistentes seria economicamente a alternativa mais viável, porém, os estudos ainda são iniciais para cercosporiose e não existem cultivares comerciais de café resistentes à cercosporiose, existem apenas cultivares que são mais ou menos susceptíveis ao patógeno, como é o caso da cultivar de *Coffea arabica*, variedade Mundo Novo, que apresenta susceptibilidade à *Cercospora coffeicola* (PATRICIO et al., 2010). Assim, a principal medida de controle utilizada pelos produtores para esta doença é o manejo químico com a utilização de fungicidas sistêmicos e protetores. Entretanto, o uso indiscriminado de fungicidas pode causar danos ao meio ambiente e aos seres vivos, além da possibilidade de surgimento de isolados do patógeno resistentes a esses produtos (ABRAHÃO et al., 2009).

Um dos maiores desafios tem sido determinar novos métodos, eficientes e sustentáveis, que apresentem baixo impacto ambiental e baixa toxicidade aos seres vivos para o controle dessa importante doença do café. Diante disso, a utilização de produtos comerciais, principalmente, de formulações de fertilizantes foliares, cuja composição contenha extratos de plantas, vem ganhando relevância no manejo de doenças de plantas. Esses produtos podem conter múltiplos eliciadores capazes de ativar, de forma eficiente, os mecanismos latentes de defesa das plantas (BUDZINSKI et al., 2011).

O indutor de resistência comercial mais utilizado é o acibenzolar-S-metil (ASM), que tem sido citado como um agente ativador dos mecanismos de defesa de plantas, protegendo-as sistemicamente contra uma larga gama de doenças causadas por fungos e bactérias, com reduzido ou nenhum efeito tóxico direto contra estes fitopatógenos (FERNANDES et al., 2013; GUZZO et al., 2001; RUESS et al., 1996).

Outros produtos que têm apresentado resultados significativos na indução de resistência são fertilizantes foliares, como fosfitos e formulações à base de subprodutos da cadeia produtiva do café (COSTA et al., 2014;

GUIMARAES et al., 2014; OGOSHI et al., 2013). Estas formulações têm apresentado controle significativo de doenças em cafeeiro, como a mancha-de-phoma (BARGUIL et al., 2005; RESENDE et al., 2004; SANTOS et al., 2008), a cercosporiose e a ferrugem (AMARAL, 2005; COSTA et al., 2014; PEREIRA, et al., 2008), além de proporcionar aumento da expressão de genes e enzimas relacionadas à defesa de plantas em estudos com tomateiro e cafeeiro (MEDEIROS et al., 2009; PEREIRA et al., 2008).

A indução de resistência em plantas consiste no aumento do nível da resistência por meio da utilização de agentes externos (eliciadores), sem qualquer alteração do genoma da planta, sendo estes agentes bióticos ou abióticos (RESENDE et al., 2004). Em plantas tratadas com indutores de resistência ocorrem diversas mudanças transcricionais e pós-traducionais. Estas mudanças que levam à ativação ou inibição da expressão de diversos genes e, conseqüentemente, à produção de diversas proteínas relacionadas à patogênese. A compreensão destas mudanças ainda está sendo elucidada por meio de estudos que buscam avaliar esses níveis de inibição, super expressão e síntese diferencial, que possibilitam as análises de suas propriedades, bem como seus envolvimento nas vias de sinalização e de defesa de plantas (CAVALCANTI; RESENDE, 2005).

A transcriptômica ou análise do transcriptoma estuda a expressão diferencial de genes em um tecido específico e em condições fisiológicas diversas e de interesse. Alguns processos pós-transcricionais, como a síntese proteica, a degradação, o processamento e a modificação pós-traducional, não são considerados na transcriptômica. Assim, são necessárias abordagens complementares, como os perfis de expressão baseados no proteoma, para compreender quais os elementos reguladores estão envolvidos a nível proteico (JORRIN et al., 2006). Numa abordagem proteômica é possível detectar diferenças nas proteínas presentes no momento da amostragem e ainda

identificar o envolvimento de diferentes isoformas da mesma proteína no processo em estudo (MEHTA et al., 2008). Entender os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas das plantas ao ataque de patógenos é cada vez mais necessária para se determinar as melhores formas de controle da doença, além de fornecer informações que auxiliem os estudos de melhoramento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito dos indutores de resistência por meio da expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas nas respostas de defesa das plantas, bem como a abundância de proteínas presentes no perfil proteico dos tratamentos com indutores.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a eficiência dos indutores no controle da cercosporiose em mudas de *Coffea arabica* cv. Mundo Novo, seleção 376/4;
- b) Analisar os efeitos dos produtos Acilbenzolar-S-Methyl (ASM) e formulações à base de subprodutos da indústria cafeeira, por meio da expressão de enzimas relacionadas à defesa das plantas;
- c) Identificar proteínas que são diferencialmente expressas em plantas pulverizadas ASM e Greenforce CuCa envolvidas no sistema de defesa das plantas

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O cafeeiro

O cafeeiro, pertencente ao gênero *Coffea*, família Rubiaceae, apresenta mais de 100 espécies conhecidas (DAVIS et al., 2011). Dentre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café conilon ou robusta) são as mais importantes economicamente, sendo a primeira responsável por 75% da produção brasileira (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014; PLECHAKOVA et al., 2009). É uma planta perene de porte arbustivo ou arbóreo com folhas persistentes e flores hermafroditas.

As primeiras sementes de café foram introduzidas no Brasil durante as primeiras décadas do século XVII, vindas da Guiana Francesa para o norte do país, seguindo então para as regiões localizadas ao sul do Brasil (ECCARDI; SANDALJ, 2003). Hoje o café está em quase todas as regiões brasileiras: em planaltos, cerrados e montanhas, sobre sistemas convencionais, florestais, adensados, irrigados e orgânicos, presente em grandes e pequenas propriedades. Neste último caso, esta cultura é produzida por agricultores familiares, correspondendo a cerca de 25% da produção nacional e 30% da produção em Minas Gerais, sendo uma das principais fontes de renda agrícola e de desenvolvimento social no país e no Estado (BUAINAIN; SABATTO, 2009).

Segundo o levantamento de safras realizado pela CONAB em dezembro de 2014, a produção de café no Brasil foi em torno de 45,35 milhões de sacas, sendo que deste total, 71,2% correspondem ao café arábica, e Minas Gerais deteve 53,26% da produção nacional de café, perfazendo um total de 98,8% da variedade arábica.

Em relação às variedades de cafeeiro, o Instituto Agrônomo de Campinas-IAC vem realizando cruzamentos e melhoramentos das espécies de

cafeeiro arábica visando a melhor qualidade da bebida, à alta produtividade e à resistência a pragas e doenças. Uma das cultivares bem difundidas é a Mundo Novo, resultante do cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho. Possui boa adaptação às regiões altas, com elevada rusticidade, vigor e produtividade. É uma planta com porte alto, caule fino, grande crescimento vertical, requerendo controle por meio da poda, maturação precoce e uniforme. Entretanto, esta cultivar apresenta susceptibilidade à ferrugem e à cercosporiose (INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, 2015; PATRICIO et al., 2010).

Devido aos custos elevados de produção do cafeeiro, há a necessidade de se eliminar as fontes de prejuízos na lavoura. Entre os fatores responsáveis por perdas, desde o viveiro até o campo, destacam-se as doenças fúngicas, como é o caso da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berkley & Cooke), que é considerada uma das principais doenças desta cultura (ROMERO et al., 2010; VENTURA et al., 2007).

Para assegurar a sustentabilidade dos sistemas produtivos de café, as estratégias de manejo e controle das doenças levam em conta fatores genéticos do hospedeiro, fatores evolutivos dos patógenos e fatores epidemiológicos das doenças. Porém, essas estratégias devem ser aplicadas em escala temporal e espacial, baseadas em experimentos e resultados das pesquisas científicas (VENTURA et al., 2007).

3.2 Cercosporiose do cafeeiro

A cercosporiose do cafeeiro está entre uma das mais antigas e importantes doenças desta cultura. Seu agente etiológico, *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, pode ser disseminado pelo vento, água ou insetos (MATIELLO et al., 2002). Também conhecida como mancha-de-olho-pardo, é

uma doença presente em todas as regiões produtoras de café no Brasil. Os sintomas da doença são observados nas folhas, as quais apresentam pequenas manchas de cor marrom escura, apresentando no centro uma lesão cinza claro, com anel arroxeado ou amarelado em volta, com aspecto de um halo. Provoca desfolha e menor produtividade, além da depreciação da qualidade da bebida devido à seca dos frutos (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; POZZA, 2008).

Em plantas de cafeeiro infectadas, durante o desenvolvimento da doença, o patógeno produz uma toxina denominada cercosporina, a qual é necessária para a expressão dos sintomas (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005; GUSMÁN et al., 2002). A cercosporina é incluída no grupo químico das perilenequinonas, que contém compostos sintéticos e naturais de moléculas fotossensibilizadoras (DAUB; EHRENSHAFT, 2000). Na presença de luz, a cercosporina torna-se ativa e é capaz de reagir com outras moléculas dentro da célula vegetal, sendo o oxigênio o principal alvo de reação. Esse, ao reagir com a cercosporina, promove a formação de substâncias reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido (O_2^-), que são altamente tóxicos, podendo interagir e danificar o DNA, proteínas e membranas, provocando a morte da célula (DAUB; CHUNG, 2007). Daub, Herrero e Chung (2005) verificaram que a cercosporina provoca morte das células do hospedeiro, permitindo que o fungo tenha acesso aos nutrientes nos espaços intercelulares por meio da peroxidação dos lipídeos da membrana celular.

Para o controle da cercosporiose do cafeeiro, recomenda-se o controle químico utilizando fungicidas sistêmicos e protetores. Entretanto, a utilização indiscriminada de fungicidas tem causado danos ao meio ambiente e aos seres vivos (ABRAHÃO et al., 2009; AMARAL et al., 2008). Uma alternativa bastante promissora seria a utilização de cultivares com resistência, porém, não existem cultivares de cafeeiros resistentes à cercosporiose. Assim, um dos

maiores desafios para os pesquisadores tem sido determinar métodos eficientes de controle, que apresentem baixo impacto ambiental.

O controle da cercosporiose com extratos vegetais à base de subprodutos da cadeia produtiva do café é uma estratégia que vem sendo estudada. Pereira et al. (2008) observaram que concentrações crescentes do extrato de casca de café apresentam efeito tóxico *in vitro* ao crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*, porém não inibem a germinação dos conídios, além de conferir proteção parcial em plantas de cafeeiro desafiadas por *C. coffeicola*. Costa et al. (2014) verificaram que o uso de extratos à base de subprodutos da cadeia produtiva do café, também promoveu redução da doença, além de reduzir a desfolha e aumentar a produtividade.

O entendimento dos mecanismos de defesa relacionados à resistência induzida contra o ataque de patógenos é fundamental para a redução do uso de produtos químicos. Entretanto, a maior parte do conhecimento nesta área de pesquisa foi obtida por meio de estudos em plantas consideradas modelo, tais como *Arabidopsis* e tomateiros (HAMMERSCHMIDT, 2009). Assim, novas pesquisas devem ser realizadas para elucidar os mecanismos de defesa envolvidos na indução de resistência de plantas de cafeeiros à *C. coffeicola*.

3.3 Resistência induzida

Os mecanismos de defesa induzidos podem ser localizados ou sistêmicos e se baseiam na capacidade do hospedeiro em reconhecer o patógeno, resultando na transdução de sinais dentro da célula e na expressão de vários genes de defesa (GANESH et al., 2006; MONTESINOS et al., 2002). O processo de sinalização desenvolvido pelas células vegetais para reconhecer e perceber os estímulos intrínsecos e/ ou extrínsecos na planta pode ser dividido em três etapas: (1) reconhecimento ou percepção do sinal, realizado por

receptores específicos ou inespecíficos; (2) transdução do sinal, que pode ser feito por mensageiros secundários, alterações nas fosforilações de proteínas e por proteínas-G e; (3) tradução do sinal, que consiste na ativação de genes que induzem a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), proteínas de defesa e determinadas enzimas regulatórias envolvidas com a produção de fitoalexinas (CAMPOS et al., 2011).

A respeito dos compostos relacionados à resposta de defesa das plantas, estão o acúmulo de peróxido de hidrogênio, de fitoalexinas (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; IRITI; FAORO, 2003) e de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) como, por exemplo, β -1,3-glucanases e quitinases (GUZZO et al., 2004; SILVA et al., 2008; QUERINO et al., 2005), e também um aumento na atividade de várias enzimas, tais como lipoxigenase, fenilalanina amônia-liase (FAL), chalcona isomerase, peroxidases e polifenoloxidasas (KOHLENER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002; RESENDE et al., 2002). Estas enzimas e compostos desenvolvem nas plantas uma “imunidade” sistêmica, por meio da resistência sistêmica adquirida (SAR), a qual é mediada pelo ácido salicílico como sinalizador; e também por meio da resistência sistêmica induzida (ISR), que é mediada pelo ácido jasmônico, um hormônio ativador do sistema de defesa das plantas em resposta ao ataque de patógenos necrotróficos como é o caso da *C. coffeicola* (PIETERSE et al., 2014). Patógenos necrotróficos destroem a célula hospedeira e utilizam os nutrientes do hospedeiro. A principal via de resposta ao ataque deste tipo de patógeno é a do ácido jasmônico, ou jasmonato, que possui a enzima lipoxigenase como a enzima chave desta via precursora da síntese do ácido jasmônico, através do ácido α -linolênico (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2006)

Em cafeeiro, foram encontrados genes envolvidos em diversos processos relacionados à resistência de plantas contra fitopatógenos, como: formação de espécies reativas de oxigênio, morte celular programada, síntese e transporte de

metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese, metabolismo de lipídeos e a degradação controlada de proteínas (GUZZO; HARAKAVA, 2007; GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; GUZZO et al., 2001).

Indutores de resistência normalmente não apresentam ou apresentam baixa ou nenhuma ação antimicrobiana direta sobre patógenos (DURRANT; DONG, 2004), mas atuam como moléculas sinalizadoras de respostas de defesa. Ao serem reconhecidos pelas células vegetais, induzem a expressão de genes que codificam para a síntese de proteínas de resistência e na formação de compostos envolvidos na resistência (DANTAS et al., 2004; MÉTRAUX, 2001; RYALS et al., 1996; SCHENK et al., 2000;).

Trabalhos evidenciam a ação do acibenzolar-S-metil como indutor de resistência em diferentes interações planta-patógeno. A SAR foi ativada, após a aplicação do ASM, em diversas espécies vegetais como, por exemplo, na batata (BOKSHI; MORRIS; DEVERALL, 2003), no feijoeiro (IRITI; FAORO, 2003), no cacauzeiro (RESENDE et al., 2002) e no cafeeiro (GUZZO et al., 2001; GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002; PATRÍCIO et al., 2007).

Para a cultura do cafeeiro, o produto ASM induziu resistência local e sistêmica à ferrugem e aumentou a atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase nos tecidos foliares (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009) e em outro estudo, o tratamento com BTH também provocou um aumento sistêmico na síntese de proteínas relacionadas à patogênese, no estresse oxidativo, e na parede celular (NARDI et al., 2006). Na variedade 'Catuaí Vermelho' também foi constatada por Marchi, Borges e Resende (2002) a eficácia do ASM em reduzir os sintomas da ferrugem alaranjada. A eficiência de redução da incidência e severidade da doença variou de 27,8 % a 100 % e de 45,7 % a 100 %,

respectivamente, sendo que a menor dose do ASM foi responsável pelos melhores resultados.

Na interação *Coffea arabica* – *C. coffeicola*, a SAR também foi ativada pelo tratamento prévio das plantas suscetíveis com o indutor ASM, acarretando uma diminuição dos sintomas da doença em 55 %, verificado por meio do aumento das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase (PATRÍCIO et al., 2007). Ainda com esta interação, o ASM foi capaz de proteger a planta contra a cercosporiose por até 60 dias, no entanto, testes *in vitro* verificaram que o mesmo não é capaz de impedir a germinação dos conídios de *C. coffeicola* (GALDEANO et al., 2010), o que também comprova sua ação como indutor e não diretamente sobre o patógeno.

Uma forma de controle de doenças em plantas que vem ganhando destaque é a utilização de formulações que têm em sua composição produtos naturais, como extratos vegetais ou de subprodutos da cadeia produtiva do café, como extratos de folhas ou de casca de frutos de cafeeiro. Resende et al. (2006) e Resende et al. 2007) solicitaram o depósito de patente para formulação à base de extratos de folhas e cascas de frutos de cafeeiro (Privilégio e Inovação 0603575-2 e P.I. 0705598-6). Tais formulações têm como principal matéria-prima folhas de cafeeiro que caem ao solo (devido a doenças, colheita de frutos, podas e outros estresses) e subproduto do beneficiamento dos grãos (endocarpo, mesocarpo e exocarpo). Estas formulações podem ser utilizadas com ou sem espalhantes adesivos ou outros adjuvantes, para o controle de doenças no cafeeiro (*Phoma* sp., *Cercospora coffeicola* e *Hemileia vastatrix*), cacaueteiro, algodoeiro e tomateiro (AMARAL, 2005; BARGUIL et al., 2005; COSTA et al., 2014; MEDEIROS et al., 2009; RESENDE et al., 2004). Amaral (2005) observou reduções de 40% e 37% na incidência da cercosporiose em cafeeiros de plantas tratadas com formulações à base de extrato de casca e de folhas de cafeeiros com ferrugem, respectivamente. Santos et al. (2008) observaram em

campo que o tratamento com formulações à base de extrato de folhas de cafeeiro reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha-de-phoma em 61%, comparada à testemunha pulverizada com água.

Concentrações crescentes do extrato de casca de cafeeiro apresentaram efeito tóxico *in vitro* ao crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*, porém não inibiram a germinação dos conídios (PEREIRA et al., 2008). Costa et al. (2014) verificaram que formulações à base de subprodutos da indústria de café controlaram a cercosporiose em condições de campo, além de promover uma redução da desfolha e aumento de produtividade.

3.3.1 Proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR)

As proteínas relacionadas à patogênese são classificadas em 17 famílias e são numeradas na ordem em que foram descobertas (Tabela 1). As proteínas PR foram classificadas com base nas suas características de proteínas vegetais induzidas ou relacionadas com situações patológicas. Dessa forma, o termo “proteínas relacionadas à patogênese” tornou-se mais abrangente, incluindo as proteínas induzidas por microrganismos ou pelo ataque de insetos (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Tabela 1 Principais famílias das proteínas PR, propriedades, genes envolvidos e plantas nas quais foram descobertas

Famílias	Plantas em que formam descobertas	Propriedades	Gene
PR-1	Tabaco	Desconhecida	<i>Ypr 1</i>
PR-2	Tabaco	B-1,3- glucanase	<i>Ypr 2</i>
PR-3	Tabaco	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr 3, Cbia</i>
PR-4	Tabaco	Quitinase tipo: I, II	<i>Ypr 4, Cbid</i>
PR-5	Tabaco	Taumatina –like/ Osmotina	<i>Ypr 5</i>
PR-6	Tomate	Inibidor de protease	<i>Ypr 6, Pis</i>
PR-7	Tomate	Endoproteinase	<i>Ypr 7</i>
PR-8	<i>Curcubitacea</i>	Quitinase tipo III	<i>Ypr 8, Cbib</i>
PR-9	Tabaco	Peroxidase	<i>Ypr 9, Prx</i>
PR-10	Salsa	Ribonuclease –like	<i>Ypr 10</i>
PR-11	Tabaco	Quitinase tipo I	<i>Ypr 11, Cbic</i>
PR-12	Rabanete	Defensina	<i>Ypr 12</i>
PR-13	<i>Arabidopsis</i>	Tionina	<i>Ypr 13, Tbi</i>
PR-14	Cevada	Proteína de transferência lipídica	<i>Ypr 14, Ltp</i>
PR-15	Cevada	Oxalato oxidase	<i>Ypr 15</i>
PR-16	Cevada	Oxalato oxidase like	<i>Ypr 16</i>
PR-17	Tabaco	Desconhecida	<i>Ypr 17</i>

Fonte: adaptado de Van Loon, Rep e Pieterse (2006).

As proteínas PR constituem-se de proteínas de plantas que se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou ataque por insetos herbívoros ou, também, em resposta ao tratamento com determinados compostos químicos (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; VAN LOON et al., 1994). Elas têm sido associadas à resistência induzida, acumulando-se em

tecidos vegetais no local de aplicação de indutores bióticos ou abióticos (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002; PIETERSE et al., 2001; RYALS et al., 1996). Elas também podem se acumular em locais de infecção e em sítios remotos, sendo sua produção estimulada por meio de eliciadores, a partir do estabelecimento do contato com a planta. Sua síntese e acúmulo possuem caráter de resposta ativa e sistêmica, em casos de resposta induzida (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Todas estas proteínas são solúveis em meio ácido, têm baixo peso molecular e resistem a proteases (enzimas que decompõem proteínas). Tais características são importantes na funcionalidade destas proteínas, já que estando presentes no fluido intercelular, estão sujeitas a condições de baixo pH e ação de enzimas proteolíticas durante a patogênese, como resultado do colapso de células hospedeiras e extravasamento do conteúdo dos vacúolos (SILVA et al., 2008).

Algumas destas proteínas já têm função caracterizada, tais como: quitinase (PR3, PR4, PR8 e PR11) e β -1,3-glucanase (PR2), que estão envolvidas na hidrólise das paredes das células fúngicas; a peroxidase (PR9), que pode atuar no enrijecimento da parede celular vegetal; e a oxalato oxidase (PR15) que está envolvida na transdução de sinais (PEREIRA et al., 2009a; PEREIRA et al., 2009b; SILVA et al., 2008). Proteínas PR (Tabela 1) também podem ser detectadas durante o desenvolvimento da planta e em fase de senescência (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006), o que pode indicar um papel na proteção física, atuando sobre as estruturas celulares, a fim de estabilizar membranas sensíveis ou macromoléculas (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Estudos demonstraram que o efeito das proteínas PR é aumentado quando as plantas são tratadas com eliciadores de respostas de defesa ou indutores de resistência (SCHWEIZER et al., 2000). Como exemplo, pode ser

citada a utilização do ácido jasmônico (AJ), que é uma molécula sinalizadora que desempenha um importante papel na resistência contra insetos e doenças causadas por patógenos necrotróficos, podendo ativar a expressão de proteínas antifúngicas tais como, osmotina (PR5) e tionina (PR13) ou induzir acúmulo de enzimas relacionadas à síntese de fitoalexinas e possui também efeito direto como antimicrobiano (PROST et al., 2005; VELLOSILO et al., 2007).

3.3.2 Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas, produzidas no caminho metabólico de transformação do oxigênio molecular (O_2) em água (H_2O) (MEHDY et al., 1996). Pela adição de um simples elétron, o oxigênio molecular é convertido ao radical ou ânion superóxido (O_2^-), um processo mediado por peroxidases ou NAD(P)H oxidases associadas à membrana, ou por lipoxigenases a partir de ácidos graxos e O_2 . O superóxido formado pode passar por reações de óxido-redução ou ser "dismutado" e regenerar O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que pode ocorrer espontaneamente em pH neutro ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 formado pode sofrer diferentes transformações: reduzido ao radical hidroxil (OH); convertido a H_2O e O_2 pela ação da catalase (CAT); convertido a H_2O pela oxidação de moléculas substratos, como ascorbato, via peroxidases (HEISER; OSSWALD, 2008). Espécies reativas de oxigênio podem se acumular rapidamente no início do processo infeccioso em interações patógeno-hospedeiro compatíveis ou incompatíveis, sendo um processo conhecido como explosão oxidativa (LAMB; DIXON, 1997).

Fitopatógenos e insetos, quando atacam as plantas, fazem com que estas respondam de forma rápida com uma explosão oxidativa, que constitui na

produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HU et al., 2009). O acúmulo destas substâncias nas células vegetais pode ser tóxico tanto para a planta quanto para os agentes estressores. O H_2O_2 é a principal espécie reativa de oxigênio que aciona moléculas para a indução de genes de defesa e a polimerização de proteínas que compõem a parede celular, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas ou de limpeza (ŁUKASIK; GOLAWSKA; WÓJCICKA, 2012). Existe uma variedade de enzimas oxidativas utilizadas nestes mecanismos que irão decompor estas espécies reativas de oxigênio. Dentre elas há a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutationa redutase (GSH), peroxiredoxina (Prx), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO), glutationa peroxidase (GPX), entre outras (MITTLER, 2002).

A catalase é responsável pela inativação do H_2O_2 formado durante a conversão do glicolato a glioxalato que ocorre durante a fotorrespiração, no qual o peróxido é convertido pela enzima a H_2O e O_2 (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). A catalase pode também decompor o peróxido formado durante a oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos em tecidos de armazenamento de gordura (HOLTMAN et al., 1994). A enzima é preferencialmente encontrada nos peroxissomos, mas também podem estar presentes em mitocôndrias e no citoplasma (MONTAVON; KUKIC; BORTILIK, 2006). Em geral as plantas possuem três genes codificadores da catalase, os quais são classificados de acordo com os locais em que são expressos: classe I, codificam proteínas presentes nos tecidos fotossintetizantes; os da classe II estão associados com os tecidos vasculares; e os da classe III são mais expressos em tecidos reprodutivos e sementes (MHAMDI et al., 2010).

As glutations peroxidases pertencem a uma ampla família de proteínas que, ao longo dos anos, foram descobertas em quase todos os reinos (PASSARDI et al., 2005). A enzima glutationa peroxidase possui uma

característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima (NAVROT et al., 2006). A principal função da GPX é a eliminação de hidroperóxidos de fosfolípidos, promovendo uma proteção das membranas celulares (GUETA-DAHAN et al., 1997).

Lipoxigenases são isoenzimas que catalisam a dioxigenação de ácidos graxos poliinsaturados, originando moléculas reativas, com atividades fisiológicas pronunciadas. Os produtos da via da lipoxigenase têm sido associados com várias funções, como no desenvolvimento vegetal (KOLOMIETS et al., 2001) e ataque de patógenos (RANCÉ et al., 1998).

Em cafeeiros, foram verificados aumentos nas atividades da SOD, CAT e APX em um clone tolerante à deficiência hídrica (PINHEIRO et al., 2005). Outros estudos elucidaram a atividade das enzimas antioxidantes como uma variável promissora para diferenciar a qualidade dos cafés submetidos a diferentes manejos pós-colheita (TAVEIRA et al., 2012). Em mudas de café pulverizadas com fosfito de potássio combinado com subproduto da agroindústria do *Citrus*, observou-se o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e as taxas fotossintéticas foram mantidas na ausência de agentes patogênicos (FERNANDES et al., 2014).

3.4 Transcriptoma

A análise da expressão gênica é de fundamental importância para o estudo das vias metabólicas e de sinalização, as quais sustentam processos celulares e de desenvolvimento. Embora vários métodos tenham sido utilizados para quantificar a expressão gênica, a PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) é considerada uma técnica padrão pela sua sensibilidade e especificidade (BUSTIN et al., 2005).

No estudo da expressão de genes por meio desta técnica, Guzzo, Harakava e Tsai (2009) quantificaram genes da β -1,3 glucanase relacionados à SAR em cafeeiro, em que foram identificadas diferenças no perfil de expressão dentro de 72 h após o tratamento com ASM. Em outro estudo, a expressão temporal avaliada por qRT-PCR revelou que o gene codificador da β -1,3-glucanase aumentou em cafeeiro tratado com ASM 48 e 72 horas após inoculação com *C. coffeicola*, quando comparado com as plantas controle tratadas com água ou apenas inoculadas com o patógeno nos mesmos intervalos de tempo. Porém, esse gene foi ativado pela presença de *C. coffeicola* em plantas não tratadas com o indutor de resistência somente 7 dias após inoculação (GALDEANO, 2011).

Guzzo, Harakava e Tsai (2009) utilizaram a técnica de qRT-PCR para avaliar a expressão temporal do gene codificador de β -1,3-glucanase em cafeeiros da cultivar Mundo Novo e tratados com ASM, na qual foi possível constatar que o aumento da expressão ocorre a partir das primeiras 12 horas após o tratamento com o indutor de resistência e seu maior nível de expressão ocorreu às 72 horas. Este trabalho demonstrou o efeito do ASM na ativação dos mecanismos de defesa, neste caso, envolvendo a ativação de gene associado às proteínas PR.

Estudos com genes que codificam proteínas funcionais bem como proteínas regulatórias ou fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação da transmissão de sinais e expressão gênica estão entre os principais alvos das pesquisas sobre a fisiologia do cafeeiro (AGARWAL et al., 2006).

Sequências de genes encontrados em cafeeiro foram obtidas para as espécies *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* (MONTTOYA et al., 2006; PONCET et al., 2006; VIEIRA et al., 2006). Novas sequências são constantemente depositadas e utilizadas em pesquisas para a identificação de perfis de expressão que fornecem informações a respeito das respostas

fisiológicas das plantas em situações de estresses bióticos e abióticos, bem como, relacionadas à qualidade da bebida (COSTA, 2014; VIEIRA et al., 2013).

3.5 Proteômica

A atividade proteica está associada à função do gene, uma vez que a proteína é o produto final da regulação da atividade gênica. Nesse sentido, a proteômica visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um dado momento (WILKINS; SANCHEZ; WILLIAMS, 1996). Esta análise é uma poderosa ferramenta, pois, diferentemente do que ocorre quando são utilizados marcadores fenotípicos ou baseados em DNA, ela fornece informação em nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa no tecido em estudo (PENNINGTON; DUNN, 2001), podendo ser aplicada com sucesso em sequenciamento, quantificação de proteínas (AEBERSOLD; MANN, 2003).

O estudo sistemático do proteoma expresso nas células em condições fisiológicas específicas tem por objetivo identificar e relacionar proteínas, bem como caracterizar modificações pós traducionais ou interações proteína-proteína (VAN WIJK, 2001). Elas também são física e quimicamente mais complexas que os ácidos nucleicos, e com interações funcionais que dependem da sua estrutura tridimensional (JORRÍN et al., 2006).

A capacidade em determinar a concentração absoluta de uma proteína em uma mistura proteica complexa é crucial para a compreensão de como as proteínas interagem dentro da célula em resposta a uma alteração adaptativa (SILVA et al., 2006). As proteínas podem sofrer modificações pós traducionais, tais como a fosforilação, metilação, acetilação, clivagem proteolítica, entre outras. Portanto, prever a estrutura final e função de diferentes proteínas é um desafio. Estudos recentes indicam que a correlação entre mRNA e os níveis de proteína é inexplicavelmente baixa (JORRÍN et al., 2006).

Para a investigação da expressão diferencial de proteínas em larga escala, uma técnica que foi bastante aprimorada e vem sendo muito utilizada é a análise de proteínas por meio da eletroforese bidimensional (2D) em gel de poliacrilamida. A técnica de eletroforese 2D oferece resolução para a análise de um mapa global, ou perfil de, teoricamente, todos os produtos gênicos presentes na célula num dado momento ou condição experimental (O'FARREL, 1975).

Na eletroforese 2D, para promover a separação de misturas complexas com melhor resolução, a massa e a carga das proteínas são separadas em duas etapas: focalização isoeletrica e eletroforese em gel de poliacrilamida. Essa técnica é capaz de separar centenas ou milhares de proteínas pelos seus pontos isoeletricos e massas moleculares. O resultado da eletroforese 2D é um perfil de distribuição de *spots* formados por proteínas únicas ou misturas simples de proteínas (PENNINGTON; DUNN, 2001).

Muitos estudos proteômicos foram relatados utilizando a eletroforese bidimensional em gel (2D) (CARPENTIER et al., 2008; GUERRA-GUIMARÃES, et al., 2009; LIVRAMENTO, 2014). No entanto, é uma técnica demorada, pois requer o uso de replicatas de géis, bem como procedimentos de excisão de gel e digestão. Como forma de minimizar as limitações sofridas pela eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, a cromatografia líquida tem sido integrada com a espectrometria de massa (LC-MS) e compõe uma nova plataforma para análise do proteoma (MURAD; RECH, 2012). Neste tipo de análise, a identificação e a quantificação das proteínas são obtidas a partir do extrato proteico digerido com uma enzima proteolítica, sem a necessidade de numerosos peptídeos externos de referência ou de métodos de radiomarcagem (SILVA et al., 2006). No entanto, a espectrometria de massas não é uma análise quantitativa porque peptídeos proteolíticos exibem uma vasta gama de propriedades físico-químicas, tais como tamanho, carga, hidrofobicidade, entre

outras, que levam às grandes diferenças na resposta de espectrometria de massas para uma precisa quantificação (BANTSCHOFF et al., 2007).

A identificação de proteínas por meio da espectrometria de massas depende da digestão proteolítica, que produz uma coleção de peptídeos que são ionizados por eletro nebulização ou por dessorção a laser, auxiliado por uma matriz (PENNINGTON; DUNN, 2001). Após a ionização, analisadores de massas detectam as relações massa/carga (m/z) e os espectros resultantes relacionam a abundância dos fragmentos *versus* a relação m/z , os quais são então confrontados nos bancos de dados para a identificação das proteínas. As análises podem ser realizadas a partir de íons de peptídeos intactos (espectrometria de massa ou MS) – *fingerprint* - ou de peptídeos fragmentados (espectrometria de massa em tandem ou MS/MS) (TWYMAN, 2004).

Estudos têm sido direcionados para a caracterização da dinâmica de proteínas envolvidas no desenvolvimento da planta, juntamente com o genoma e transcriptoma (CHEN; HARMON, 2006; ROBERTS, 2002; ROSSIGNOL et al., 2006). O estudo das proteínas expressas na planta, tecidos e órgãos tem sido aplicado para monitorar as alterações ou avaliar a influência dos estímulos ambientais em padrões de expressão da proteína (AGARWAL et al., 2006), as variações na resposta a eventos fisiológicos (GALLARDO et al., 2001), variações na interação patógeno-hospedeiro, incluindo o estudo das proteínas de defesa em plantas (ALVARENGA et al., 2010; ELVIRA et al., 2008).

Estas técnicas têm sido utilizadas para estudos em cafeeiro, porém muitas informações precisam ser acrescentadas ao aprimoramento da técnica, dentre estas o enriquecimento dos bancos de dados (COSTA, 2014; GIL et al., 2005; KOSHINO et al., 2008; LIVRAMENTO, 2008).

Em estudos com grãos de *C. arabica* submetidos a diferentes processamentos e secagem, foram observadas diferenças significativas entre os perfis proteicos de grãos secos em terreiro e secador, demonstrando claramente

os efeitos da temperatura sobre os peptídeos (LIVRAMENTO, 2008). Para grãos de *C. arabica* em diferentes altitudes, foram observadas alterações entre os perfis protéicos dos grãos, independente do processamento pós-colheita ao qual foi submetido. Estes resultados evidenciaram, pela primeira vez no cafeeiro, que as condições ambientais das diferentes altitudes estudadas (1000 e 1200m) têm um impacto significativo para diferentes proteínas durante o desenvolvimento dos grãos e processamento, alterando sua presença no perfil protéico dos grãos (LIVRAMENTO, 2014).

Taveira et al. (2012) realizaram análises bioquímicas de grãos processados por via seca ou via úmida, por meio da eletroforese de proteínas resistentes ao calor e de enzimas antioxidantes, e elucidaram a ideia de que proteínas podem ser marcadores de qualidade dos cafés.

Costa (2014), com proteínas diferencialmente expressas em raízes de clones de *C. canephora* submetidos à deficiência hídrica, identificou 598 proteínas em raízes, o que representa cerca de 1% do proteoma conhecido do cafeeiro. Quando integrou os perfis transcriptômico e proteômico das raízes de clones de cafeeiro (*C. canephora*) sensíveis e tolerantes ao estresse hídrico, verificou diferença de expressão gênica, bem como nos níveis de proteínas entre as condições avaliadas e esta expressão foi incrementada nos clones resistentes à seca. Contudo, os estudos proteômicos em plantas ainda são recentes, precisando de maiores informações visando ao maior entendimento dos aspectos metabólicos envolvidos nos sistemas de defesa das plantas.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, A. A. et al. Influência de safras agrícolas e tratamentos fungicidas no café cereja descascado e bóia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, nesp., p. 1919-1925, 2009.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, London, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar. 2003.

AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, July 2006.

ALVARENGA, S. H. et al. *In silico* identification of coffee genome expressed sequences potentially associated with resistance to diseases. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 795-806, jul. 2010.

AMARAL, D. R. et al. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 425-431, nov./dez. 2008.

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, 2005.

BANTSCHIEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, n. 4, p. 1017-1031, Oct. 2007.

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 118, n. 4, p. 1203-1212, Dec. 1998.

BOKSHI, A. I.; MORRIS, S. C.; DEVERALL, B. J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 52, n. 1, p. 22-27, Feb. 2003.

BUAINAIN, A. M.; SABATTO, A. D.; GUANZIROLI, C. E. Novíssimo retrato da agricultura familiar. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 06 out. 2009.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists. 2006. 1341 p.

BUDZINSKI, I. G. F. et al. Expression patterns of three α -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. **Plant Biology**, Germany, v.13, n. 3, p. 462- 471, 2011.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real time RT-PCR e a perspectiva. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, June 2005.

CAMPOS, M. A.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, M. S. Interações moleculares planta-patógeno. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JÚNIOR, F. B. (Org.). **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p. 355-377.

CARVALHO, A. O.; GOMES V. M. Plant defensins-Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, Los Angeles, v. 30, n. 5, p. 1007–1020, Feb. 2009.

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. **Cercospora**: doença do cafeeiro também chamada de “olho pardo” ou “olho de pomba”. Brasília: Epamig, 2001.

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-Verticillium em cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 67-71, jan./fev. 2005.

CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 20, p. 5504-5516, Oct. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café**. Brasília: Embrapa Café, 2014. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/Olala CMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_54_22_boletim_cafe_1a_estimativa\[1\].pdf](http://www.conab.gov.br/Olala CMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_54_22_boletim_cafe_1a_estimativa[1].pdf)>. Acesso em: 03 set. 2014.

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, May 2002.

COSTA, B. H. G. et al. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 635-642, Oct. 2014.

COSTA, T. S. **Análise do perfil transcriptômico e proteômico de raízes de diferentes clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico**. 2014. 238 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

DANTAS, S. A. F et al. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 4, p. 314-319, 2004.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, 2007.
Disponível em: <http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin/>. Acesso em: 27 de outubro de 2014.

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 461-490, Sept. 2000.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 252, n. 2, p. 197-206, Nov. 2005.

DAVIS, A. P. et al. Growing coffee: *Psilantus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data: implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 167, n. 4, p. 357-377, Dec. 2011.

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

ECCARDI, F.; SANDALJ, V. **O café: ambientes e diversidade**. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2003. 237 p.

ELVIRA, M. I. et al. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) I induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. **Journal of Experiment Botany**, Lancaster, v. 59, n. 6, p. 1253-1265, Mar. 2008.

FERNANDES, L. H. M. et al. Acibenzolar-s-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 24-32, jan./mar. 2013.

FERNANDES, L. H. M. et al. Inductors of resistance and their role in photosynthesis and antioxidant system activity of coffee seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, Washington, v. 5, n. 25, p. 3710-3716, Dec. 2014.

FEYS, B. J.; PARKER, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends Genetics**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 449-455, Oct. 2000.

GALDEANO, D. et al. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 7, p. 686-692, jul. 2010.

GALDEANO, D. M. **Indução de resistência e expressão de genes de defesa de cafeeiro a *Cercospora coffeicola***. 2011. 115 p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 2011.

GALLARDO, K. et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 2, p. 835-848, June 2001.

GANESH, D. et al. 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**, Shannon, v. 170, n. 6, p. 1045-1051, Jan. 2006.

GAZZANA, G.; BORLAK, J. Improved methods for proteome mapping of the Liver by 2-DE MALDI-TOF MS. **Journal of Proteome Research**, Boston, v. 6, n. 8, p. 3143-3151, Aug. 2007.

GIL, M. G. et al. The Arabidopsis *csb3* mutant reveals a regulatory link between salicylic acid-mediated disease resistance and the methyl-erythritol 4-phosphate pathway. **Plant Journal**, Oxford, v. 44, n. 1 p. 155-166, Oct. 2005.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205–227, July 2005.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**: volume 2. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 184–200.

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

GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, n. 4, p. 702–706, Dec. 2009.

GUETA-DAHAN, Y. et al. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. **Planta**, Berlin, v. 203, n. 4, p. 460–469, Dec. 1997.

GUIMARÃES, L. H. M. et al. Inductors of resistance and their role in photosynthesis and antioxidant system activity of coffee seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, Washington, v. 5, n. 25p. 3710-3716, Dec. 2014.

GUSMÁN, R. et al. Alguns aspectos biológicos de *Cercospora coffeicola*. **Cenicafé**, Chinchiná, v. 53, p. 169-177, set. 2002.

GUZZO, S. D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, jan./jun. 2001.

GUZZO, S. D. et al. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e β -1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 3, p. 376-381, 2004.

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: sinalização e expressão de genes de defesa. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Editora da UFV, 2007. Cap. 12, p. 281- 301.

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with

Hemileia vastatrix. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, Oct. 2009.

HAMMERSCHMIDT, R. Systemic acquired resistance. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 51, p. 173-222, 2009.

HEISER, H.; OSSWALD, W. F. Formação e função das espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Ed.). **Interação planta patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 249-283.

HOLTMAN W. L. et al. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science**, Limerick, v. 99, n. 1, p. 43-53, Jan. 1994.

HU, Z.-H. et al. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* 'Opera 8277' leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 995-1002, 2009.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, London, v. 60, n. 7, p. 651-674, Aug. 2002.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/cafecentrocafe3.php>>. Acesso em: 06 jan. 2015.

IRITI, M.; FAORO, F. Does Benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in Bean. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 85, n. 4, p. 265-270, Dec. 2003.

JIMENEZ-LOPEZ, J. C. et al. Specific conformational epitope features of pathogenesis-related proteins mediating cross-reactivity between pollen and food allergens. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n.1, p. 123-130, Jan. 2012.

JORRIN, J. V. et al. Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, n. 1-2, p. 37-47, Jan. 2006.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, Mar. 2002.

KOLOMIETS, M. V. et al. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 3, p. 613–626, Mar. 2001.

KOSHINO, L. L. et al. Comparative proteomical analysis of zygotic embryo and endosperm from *Coffea arabica* seeds. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 22, p. 10922-10926, Nov. 2008.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 4, p. 251-275, June 1997.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 261, n. 2, p. 259-266, Mar. 1999.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, n. 5, p. 199-208, May 2001.

LIVRAMENTO, K. G. **Proteômica comparativa da interação genótipo, ambiente e processamento de grãos de café arábica**. 2014. 97 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

LIVRAMENTO, K. G. **Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de Coffea canephora sob déficit hídrico**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LUKASIK, I.; GOLAWSKA, S.; WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale. **Polish Journal of Environmental Studies**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 1937-1941, June 2012.

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

MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendação**. Rio de Janeiro: MAPA, 2002. 434 p.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 1, p. 175-183, Jan. 2009.

MEHDY, M. C. et al. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 98, n. 2, p. 365-374, Oct. 1996.

MEHTA, A. et al. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 275, n. 15, p. 3731-3746, Aug. 2008.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-18, Jan. 2001.

MHAMDI, A. et al. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in Arabidopsis leaves. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1112-1123, July 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MONTAVON, P.; KUKIC, K. R.; BORTILIK, K. A simple method to measure effective catalase activities: optimization, validation, and application in green coffee. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 360, n. 2, p. 207-215, Jan. 2006.

MONTESINOS, E. et al. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, n. 4, p. 169-175, Dec. 2002.

MONTOYA, G. et al. Sequence analysis from leaves, flowers and fruits of *Coffea arabica* var Caturra. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 21., 2006, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: ASIC, 2006. 1 CD ROM.

MURAD, A. M.; RECH, E. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC Biotechnology**, London, v. 12, n. 82, p. 2-17, Nov. 2012.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 1594-1605, Dec. 2006.

NAVROT, N. et al. Identification of a new family of plant proteins loosely related to glutaredoxins with four CxxC motifs. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 89, n. 2-3, p. 71-79, Sept. 2006.

O'FARELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**. Baltimore, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, May 1975.

OGOSHI, C. et al. Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 3, p. 1558-1565, Nov. 2013.

PASSARDI, F., et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, n. 5, p. 255-265, July 2005.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, Sept. 2007.

PATRICIO, F. R. A. et al. Resistência de plantas de *coffea arabica*, *coffea canephora* e híbridos interespecíficos à cercosporiose. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 883-890, dez. 2010.

PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. **Proteomics: from protein sequence to function**. New York: Springer-Verlag, 2001. 344 p.

- PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.
- PEREIRA, S. C. et al. Aplicação foliar de silício na resistência de soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 164-170, maio/jun. 2009a.
- PEREIRA, S. C. et al. Efeito da aplicação foliar de silício na resistência à ferrugem e na potencialização da atividade de enzimas de defesa em cafeeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 223-230, jul./ago. 2009b.
- PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 52, p. 347-375, 2014.
- PIETERSE, C. M. J. et al. Rizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering signaling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 51-61, Jan. 2001.
- PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 101-108, 2005.
- PLECHAKOVA, O. et al. MoccaDB - an integrative database for functional, comparative and diversity studies in the Rubiaceae family. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 123-134, Sept. 2009.
- PONCET, V. et al. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 276, n. 5, p. 436-449, Aug. 2006.
- POZZA, E. A. A Importância das doenças foliares do cafeeiro. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA. **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. p. 81-94.
- PROST, S. D. et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 139, n. 4, p. 1902-1913, Dec. 2005.
- QUERINO, C. M. B. et al. Efeito de dois indutores de resistência sobre a severidade do Mal-do-Panamá. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 239-243, maio/jun. 2005.

RANCE' I. et al. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 11, p. 6554–6559, May 1998.

RESENDE, M. L. V. et al. **Composição para indução de resistência em plantas, a base de extratos de casca de frutos de café**. [S.l.: s.n.], 2007.

RESENDE, M. L. V. et al. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro**. [S.l.: s.n.], 2006.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-Smethyl (ASM). **Plant Pathology**, Bethesda, v. 51, n. 5, p. 621-628, Oct. 2002.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction or resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 2004, Elsinore. **Abstract...** Elsinore: Universitas Friburgensis, 2004. p. 79.

ROBERTS, J. K. M. Proteomics and a future generation of plant molecular biologists. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, n. 1-2, p. 143-154, Jan. 2002.

ROMERO, G. et al. Partial resistance to leaf rust (*Hemileia Vastatrix*) in coffee (*Coffea arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, n. 4, p. 685-697, Apr. 2010.

ROSSIGNOL, M. et al. Plant proteome analysis: a 2004 – 2006 update. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 20, p. 5529-5548, Sept. 2006.

RUESS, W. et al. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. In: BRINGTON CROP PROTECTION CONFERENCE-PEST AND DISEASES, 1996, Brighton. **Proceedings...** Brighton: Ciba's Contribution, 1996. p. 9-17.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809–1819, Oct. 1996.

SANTOS, F. da S. et al. Progresso da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke) em cafeeiros sob cultivos orgânico e convencional. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 48-54, jan./fev. 2008.

SCHENK, P. M. et al. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academia of Science of the United States of America**. Washington, v. 97, n. 21, p. 11655–11660, Oct. 2000.

SCHWEIZER, P. et al. Doublestranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. **Plant Journal**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 895-903, Dec. 2000.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal Plant Phisyology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 119-147, jan./mar. 2006.

SILVA, M. C. et al. Involvement of peroxidases in the hypersensitive reaction of coffee plants to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 29-38, Jan. 2008.

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis protéicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 10, p. 1511-1517, out. 2012.

TWYMAN, R. M. Strategies for protein identification. In: TWYMAN, R. M. **Principles of proteomics**. New York: BIOS Scientific, 2004. Cap. 3, p. 49-65.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, Londres, v. 422, p. 193-197, Mar. 2003.

VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 12, n. 3, p. 245-264, Sept. 1994.

VAN LOON, L. C.; 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 Mar. 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins.

Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 55, n. 2, p. 85-97, Aug. 1999.

VAN WIJK, K. J. Challenges and prospects of plant proteomics. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 2, p. 501-508, June 2001.

VELLOSILLO, T. et al. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense response through a specific signaling cascade. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 3, p. 831-846, Mar. 2007.

VENTURA, J. A. et al. Diagnóstico e manejo das doenças do cafeeiro conilon. In: FERRÃO, R. G. et al. **Café conilon**. Vitória: Incaper, 2007. p. 451-498.

VIEIRA, L. G. E. et al. 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.

VIEIRA, N. G. et al. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 6, n. 4, p. 181-190, Dec. 2013.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vectors maps in proteome projects. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 17, n. 5, p. 830-838, May 1996.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**ARTIGO 1 Indutores de resistência no controle da cercosporiose do
cafeiro: análise de genes relacionados à defesa**

Artigo formatado de acordo com o periódico *Coffee Science*.

1 **INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DA**
2 **CERCOSPORIOSE DO CAFEIEIRO: ANÁLISE DE GENES**
3 **RELACIONADOS À DEFESA**

4

5 Sandra Eliza Guimarães, Mário Lúcio Vilela Resende, Deila Magna dos

6 Santos, Ana Cristina Andrade Monteiro, Victor Augusto Maia

7 Vasconcelos, Manoel Batista da Silva Júnior

8 Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras

9

10 **RESUMO**

11 Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de indutores de
12 resistência, formulações à base de extratos vegetais e fungicida na
13 proteção de mudas de cafeeiro no controle de *Cercospora coffeicola*. Os
14 tratamentos aplicados foram: Greenforce CuCa, Greenforce KP, ET64-S,
15 O Fulland®, ASM (acibenzolar-S-metil), e como controle, o fungicida
16 Opera®. Foram realizadas avaliações semanais de incidência e severidade
17 da cercosporiose para cálculo da área abaixo da curva de progresso da
18 incidência (AACPID) da doença. Após análise deste experimento, foram
19 escolhidos os dois melhores tratamentos, sendo instalado o segundo

20 experimento para análise da expressão gênica das enzimas lipoxigenase,
21 catalase, glutathione peroxidase, quitinase. Observou-se que os produtos
22 Greenforce CuCa e ASM, na dose $0,05 \text{ g.L}^{-1}$, proporcionaram redução da
23 AACPSD da cercosporiose similar ao fungicida sistêmico Opera®. Já
24 para a incidência da doença, observou-se que a aplicação do fungicida
25 Opera® resultou em controle mais efetivo que os demais tratamentos
26 testados. Para o experimento de expressão gênica da resposta aos
27 indutores por 0, 24, 48 e 72 horas após aplicação observou-se que a maior
28 expressão dos genes que codificam as enzimas lipoxigenase e glutathione
29 peroxidase, ocorreu às 48 horas após aplicação do Greenforce CuCa e às
30 24 horas para o ASM. Para catalase e quitinase, a maior expressão
31 ocorreu às 24 horas após o tratamento com ASM e às 24 e 48 horas após
32 aplicação do produto Greenforce CuCa. Conclui-se que os produtos
33 testados induzem à resposta de defesa das plantas verificada por meio da
34 expressão das enzimas lipoxigenase, catalase, glutathione peroxidase e
35 quitinase

36 **Palavras-chaves:** indução de resistência, espécies reativas de oxigênio,
37 PR- proteína, oxidação de lipídeos

38

39 **RESISTANCE INDUCTORS IN CONTROL OF COFFEE**
40 **CERCOSPORIOSE: ANALYSIS OF GENES RELATED TO**
41 **DEFENSE**

42
43 **ABSTRACT**

44
45 The objective of this study was to evaluate the effect of resistance
46 inducers, plant extract-based formulations and fungicide over the
47 protection of coffee seedlings in controlling *Cercospora coffeicola*. The
48 treatments applied were: Greenforce CuCa, Greenforce KP, ET64-S, O
49 Fulland[®], ASM (acibenzolar-S-methyl), and, as control, the fungicide
50 Opera[®]. We conducted weekly evaluations of incidence and severity of
51 cercosporiose to calculate the area under the curve of disease incidence
52 progress (AUCDIP). After the analysis of this experiment, the two best
53 treatments were chosen, subsequently installing the second experiment to
54 analyze the gene expression of enzymes lipoxygenase, catalase,
55 glutathione peroxidase, chitinase. We observed that the Greenforce and
56 ASM, in a dose of 0.05 g/ L, resulted in a reduction of AUCDIP of
57 cercosporiose, similar to the systemic fungicide Opera[®]. For the incidence

58 of the disease, we observed that the application of the fungicide Opera®
59 resulted in a more effective control than the other treatments tested. For
60 the experiment on gene expression of the response to the inducers, over 0,
61 24, 48 and 72 hours after the application, we observed that the highest
62 expression of the genes that encoded the enzymes lipoxygenase and
63 glutathione peroxidase, occurred 48 hours after the application of
64 Greenforce CuCa and 24 hours after the application of ASM. For
65 chitinase and catalase, the highest expression occurred 24 hours after the
66 treatment with ASM and 24 and 48 hours after the application Greenforce
67 CuCa. We concluded that the tested products induce plant defense,
68 verified by means of the expression of enzymes lipoxygenase, catalase,
69 glutathione peroxidase and chitinase

70 **Keywords:** resistance induction, oxygen reactive species, PR-protein,
71 lipid oxidation

72

73 1. INTRODUÇÃO

74

75 A cercosporiose, também conhecida como mancha circular,
76 mancha parda ou olho de pombo, é uma doença bastante antiga nos

77 cafezais das Américas, e no Brasil sua ocorrência data de 1887 (GODOY
78 et al., 1997). O agente causal dessa doença é o fungo *Cercospora*
79 *coffeicola* Berk & Cook e suas perdas na produção podem atingir até 30%
80 (CARVALHO; CHALFOUN, 2001). Espécies do gênero *Cercospora*
81 produzem a toxina cercosporina, que é ativada na presença de alta
82 intensidade luminosa (DAUB et al., 2005). Essa toxina resulta em necrose
83 da célula vegetal, que é o sintoma típico da doença (DAUB;
84 EHRENSHAFT, 2000).

85 O controle da doença deve-se iniciar com cuidados desde a
86 formação das mudas, evitando condições favoráveis à doença por meio de
87 práticas culturais, tais como a formação de viveiros em local bem drenado
88 e arejado, a utilização de substratos com nutrientes balanceados, controle
89 da irrigação e do excesso de insolação nas mudas (CARVALHO;
90 CHALFOUN, 2001). Entretanto, a principal medida de controle é a
91 utilização de fungicidas de contato ou sistêmicos, tanto em aplicação via
92 solo como foliar (PATRICIO; BRAGHINI, 2011). Porém, devido aos
93 prejuízos causados pela utilização indiscriminada de fungicidas,
94 recentemente pesquisadores vêm buscando medidas de controle
95 alternativo, como a utilização de indutores de resistência, fertilizantes

96 foliares e formulações à base de extratos vegetais, que possuem
97 eliciadores que induzem resistência nas plantas.

98 Existem estudos elucidando a utilização de produtos à base de
99 extratos vegetais para o controle de doenças em plantas, como o extrato
100 de camomila (*Matricaria camomilla*), nim (*Azadirachta indica*) e santa-
101 bárbara (*Melia azedarach*), que reduzem a incidência da cercosporiose
102 nas folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) (COGO et al., 2011).

103 Os vegetais respondem ao estresse biótico e abiótico de várias
104 maneiras, dentre elas, formando uma explosão oxidativa, que resulta em
105 um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), antes mesmo que
106 apareçam os sintomas na planta (PITZSCHKE; FORZANI; HIRT, 2006).
107 Estes processos oxidativos têm papel crucial nos estágios iniciais da
108 indução de respostas de defesa por meio da expressão de genes de defesa
109 e respostas adaptativas (GECHEV et al., 2006).

110 Todas as EROs são extremamente reativas e citotóxicas, o OH e o
111 O₂ produzidos são tão reativos que suas produções devem ser
112 minimizadas rapidamente. O H₂O₂ quando em alta concentração na célula
113 inibe a fixação de carbono, uma vez que muitas enzimas do ciclo de
114 Calvin são extremamente sensíveis ao H₂O₂ (SCANDALIOS, 2000).

115 Essas moléculas causam peroxidação lipídica, desnaturação protéica, e
116 mutação no DNA podendo levar a disfunções metabólicas irreparáveis e
117 até morte celular (SCANDALIOS, 2000). A inativação efetiva das EROs
118 exige a ação de uma série de enzimas trabalhando em sincronia. Os
119 mecanismos de destruição das EROs envolvem as enzimas antioxidantes
120 e pró-oxidantes, tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT),
121 ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR),
122 monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutathiona redutase (GR),
123 glutathiona peroxidase (GPX) (ALSCHER et al., 2002), além dos
124 antioxidantes não enzimáticos.

125 Diante da necessidade de entender melhor a ação das formulações
126 utilizadas como indutores de resistência, bem como a respostas das
127 plantas a estes produtos, objetivou-se neste trabalho avaliar indutores de
128 resistência, formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira na
129 proteção de mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo contra *C. coffeicola*,
130 bem como avaliar as respostas destas plantas aos indutores de resistência
131 por meio da técnica de PCR em tempo real.

132

133 2. MATERIAL E MÉTODOS

134 2.1 Preparo das mudas de cafeeiro

135 As sementes de cafeeiro da espécie *Coffea arabica*, cultivar
136 Mundo Novo, seleção 376/4, utilizadas por apresentarem susceptibilidade
137 à cercosporiose, foram adquiridas na Empresa de Pesquisa Agropecuária
138 de Minas Gerais (Epamig), Centro Tecnológico do Sul de Minas, Lavras,
139 MG, semeadas em bandejas de plástico contendo areia lavada e, na fase
140 de “orelha de onça”, foram transplantadas para sacos de polietileno de 2,0
141 kg contendo substrato composto por terra, areia e esterco bovino (2:1:1,
142 v/v/v).

143 As mudas foram mantidas em casa de vegetação durante todo o
144 período experimental, irrigadas e adubadas periodicamente conforme
145 recomendação de Guimarães et al. (1999).

146

147 2.2 Obtenção do inóculo e inoculação de *Cercospora coffeicola*

148 Para obtenção do inóculo, oito discos de micélio de *C.*
149 *coffeicola* cultivadas em meio V8 foram depositados em 15 mL de
150 meio V8 líquido (20 mL de suco de V8 em 800 mL de água
151 destilada), seguido de incubação a 25 °C sob luz contínua e

152 agitação (110 rpm). Após quatro dias, o meio V8 contendo o fungo
153 foi vertido em placas de Petri contendo meio ágar-água (2%). Estas
154 placas foram mantidas abertas, em BOD a 25 °C, sob luz contínua.
155 Após secagem do meio (3-4 dias) foram adicionados 10 mL de
156 água destilada esterilizada para a remoção dos conídios formados.

157 A inoculação foi realizada apenas para o experimento de
158 avaliação de produtos alternativos no controle da cercosporiose.
159 Foi realizada pulverização foliar da suspensão de conídios de *C.*
160 *coffeicola* (concentração 2×10^4 conídios por mL). Após a
161 inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida, por 24
162 horas.

163

164 **2.3 Obtenção de formulações e produtos comerciais**

165 As formulações à base de subprodutos da indústria cafeeira
166 testadas neste trabalho foram: Greenforce CuCa, Greenforce KP e ET64-
167 DT, cedidos pela Agrofiness Tecnologia Agrícola (empresa incubada na
168 Universidade Federal de Lavras). Também foi utilizado o produto
169 Fulland[®], adquirido da Empresa Satis Ltda. Como padrão de indução de
170 resistência, foi escolhido o produto Bion[®] (acibenzolar-S-metil - ASM),

171 adquirido da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda e, como padrão de
172 controle convencional foi utilizado o fungicida Opera[®] (epoxiconazole +
173 azoxistrobina), adquirido da Basf SA.

174

175 **2.4 Produtos alternativos na proteção de mudas de cafeeiro contra a** 176 **cercosporiose**

177 Para o experimento de avaliação do controle da cercosporiose,
178 foram utilizados os tratamentos descritos na Tabela 1. As doses dos
179 produtos foram utilizadas seguindo as recomendações dos fabricantes,
180 exceto para o ASM, onde as doses utilizadas foram sugeridas de acordo
181 com estudos anteriores testes de dose e subdoses para mudas. As mudas
182 de cafeeiro, com quatro pares de folhas, foram pulverizadas com os
183 tratamentos até o ponto de escorrimento, quinzenalmente, totalizando 3
184 aplicações. Sete dias após a primeira aplicação do produto foi realizada a
185 inoculação com *C. coffeicola*, conforme metodologia descrita
186 anteriormente.

187 Foram realizadas avaliações semanais dos sintomas, verificando a
188 incidência e severidade da cercosporiose, com o auxílio da escala
189 diagramática proposta por Custódio et al. (2011). A partir desses dados,

190 foi calculada a área abaixo da curva de progresso da incidência
 191 (AACPID) da doença em cada tratamento, segundo a fórmula de Shaner e
 192 Finney (1977).

193

194 **Tabela 1** Tratamentos e doses utilizados na proteção de mudas de
 195 cafeeiro contra a cercosporiose em casa de vegetação

Tratamento	Produto	Dose (L⁻¹)
1	ASM	0,05 g
2	ASM	0,1 g
3	Fulland [®]	5 mL
4	Greenforce CuCa	1,53 mL
5	Greenforce KP	15 mL
6	ET64 – Dióxido de Titânio	15 mL
7	Opera [®]	1,5mL
8	Testemunha inoculada	---

196 [®]marca registrada

197

198 **2.5 Estudo de expressão gênica**

199 Para o experimento de análise da expressão gênica da resposta das
 200 plantas aos agentes indutores de resistência, foram utilizadas mudas de
 201 cafeeiro produzidas conforme descrito no item 2.1, cultivadas em
 202 condições controladas em casa de vegetação do Departamento de
 203 Fitopatologia da UFLA, e transferidas para câmara de crescimento
 204 vegetal do tipo Fitotron, com 4 pares de folhas totalmente expandidas,

205 aclimatadas por uma semana sob as seguintes condições: temperatura
206 média de 25 °C, umidade relativa de 70% e luminosidade de 12 horas
207 claro/escuro. A partir dos resultados do experimento anterior, foram
208 selecionados os tratamentos Greenforce CuCa e ASM na dose 0,05gL⁻¹
209 para a realização do experimento de expressão gênica, além da
210 testemunha pulverizada com água. Os tratamentos foram aplicados em
211 uma única dose, conforme tabela 1, até o ponto de escorrimento nas
212 folhas.

213 As coletas das folhas foram realizadas após a aplicação dos
214 produtos nos tempos: 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (haa). Foram
215 coletados 2 pares de folhas superiores totalmente expandidas, em cada
216 tempo de coleta, envolvidas em papel alumínio, identificadas,
217 imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em
218 freezer, a -80 °C, até o momento das extrações do RNA total.

219 O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e,
220 aproximadamente, 30 mg de cada amostra macerada foi utilizada para a
221 extração de RNA total, a qual foi realizada utilizando o kit SV Total RNA
222 Isolation System (Promega[®]), seguindo o protocolo do fabricante para
223 tecidos de plantas.

224 As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza
225 verificadas através de uma PCR convencional foram usadas para a síntese
226 de cDNA, em que se utilizou o kit ‘SuperScript[®] III First-Strand
227 Synthesis SuperMix’ (Invitrogen), seguindo protocolo sugerido pelo
228 fabricante. As amostras (cDNA) foram armazenadas a -20 °C até o uso.

229 Primers específicos de genes de sinalização e defesa na interação
230 cafeeiro-patógeno foram desenhados com o auxílio do *software*
231 *Integrated DNA Technologies (IDT)* (<http://www.idtdna.com/site>) e
232 sintetizados pela Sigma Aldrich (Tabela 2). Os genes utilizados neste
233 estudo foram selecionados a partir de estudos em café arábica e após
234 resultados positivos para não formação de dímeros, eficiência de
235 anelamento, verificados através de PCR convencional. Os genes *GAPDH*
236 e *RPL7* foram utilizados como constitutivos, por serem estáveis e
237 constituintes normais das células, foram selecionados a partir dos estudos
238 de Barsalobres et al. (2009), além de também apresentarem eficientes nos
239 testes descritos acima.

240 A análise da expressão gênica por qRT-PCR foi realizada em
241 sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7500 Real-Time PCR
242 (Applied Biosystems), usando SYBR Green[®].

243 Para cada reação, as amostras que continham o cDNA foram
244 diluídas 10 vezes, adicionando 0,4 µL de cada par *primer* e 5,0 µL de
245 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied BiosystemsTM). A
246 reação foi completada com 3,6 µL de água livre de nuclease (*nuclease-*
247 *free water*) (AmbionTM), para um volume final de 10,0 µL por amostra.
248 As amostras foram processadas em tréplicas e as condições térmicas da
249 reação foram 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40
250 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, finalizando com 15
251 segundos a 95 °C. Os dados gerados foram armazenados e analisados no
252 programa 7500 Fast Software (Versão 2.1).
253

254 **Tabela 2** Sequências dos primers utilizados para a análise de qRT-PCR.

Genes	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Nº acesso
<i>Catalase</i> (CAT) MN-SSH2-H06	F: CAGGCACATGGATGGATCTGGTG R: TGGCTATGATTTGCTCCACCAACC	153	DQ124022 ^a
<i>Glutathione peroxidase</i> (GPX) HT-SSH2-F10	F: GCGTGTCGAAGCAATTCTCGATTCT R: GTGGCCATCGTACGATCTGACC	172	DQ123923 ^a
<i>Lipoxigenase</i> (LPX) HT-SSH1-C08	F: CGGCGACTAATCCCTAATGAAA R: GTCTAACACGGCCAAGTATT	136	DQ123948 ^a
<i>Quitinase</i> (CHI)	F: GGAAGAAGTGGCAGCCTA R: GCAGGGTCAGGATAGGA	169	DQ124034 ^b
<i>GAPDH</i>	F: TTGAAGGGCGGTGCAAA R: AACATGGGTGCATCCTTGCT	59	SGN-U347734 ^b
<i>Rpl 7</i>	F: GACCTTGCCCATGAGATCCTGAC R: CCAGCATCGCCTCCTTCAACATAG	136	SGN-U351477 ^b

255 Legenda: ^aNúmero de acesso de acordo com o GenBank; ^bNúmero de
256 acesso de acordo com SOL Genomics Network; F: sequência do *primer*
257 *forward*; R: sequência do *primer reverse*.

258

259 Os resultados foram normalizados usando CTs (ciclo *Threshold*)
260 obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação. O CT foi
261 determinado pelo número de ciclos nos quais a fluorescência gerada
262 dentro de uma reação cruza a linha *Threshold*. O método usado foi o C_T
263 comparativo.

264 A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta C_T = C_T$
265 (gene alvo) - C_T (controle endógeno). A calibração foi determinada pela
266 fórmula $\Delta \Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) - ΔC_T (calibrador). O calibrador é uma
267 amostra usada como base para resultados de expressão comparativa, neste
268 caso, o calibrador foi a testemunha em cada tempo de coleta. A
269 quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta \Delta C_T}$ (LIVAK;
270 SCHMITTGEN, 2001).

271

272 **2.6 Delineamento experimental**

273 O experimento de avaliação do controle da cercosporiose em
274 mudas de cafeeiro foi instalado em delineamento de blocos casualizados
275 (DBC), com 8 tratamentos, três blocos (repetições) e a parcela
276 experimental foi constituída por seis plantas. As mudas selecionadas
277 continham quatro pares de folhas totalmente expandidas, sendo que foram
278 selecionadas para avaliação apenas os dois pares de folhas superiores
279 totalmente expandidos. Este experimento foi repetido e as análises
280 estatísticas foram feitas utilizando as médias dos dois experimentos. Os
281 resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação

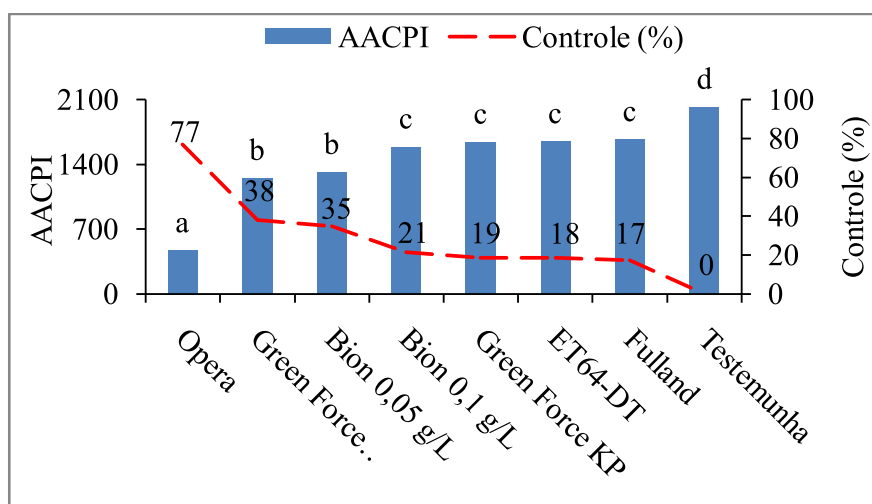
282 de médias realizada pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade
283 utilizando o programa estatístico Sisvar v. 4.3 (FERREIRA, 2000).

284 No experimento de expressão gênica, o delineamento
285 experimental utilizado foi blocos casualizados com 3 repetições, 3 plantas
286 por parcela e 3 tratamentos, analisados em 4 tempos (0, 24, 48 e 72 horas
287 após aplicação -haa), as folhas referentes às 3 plantas da parcela foram
288 misturadas, formando um *pool*, totalizando 36 amostras a serem
289 analisadas. As análises dos efeitos das interações tratamento e tempo
290 foram feitas através do teste de Tukey, 5% de probabilidade utilizando o
291 software Sisvar v.4.3 (FERREIRA, 2000).

292

293 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

294 Na análise da AACPID, observou-se que o fungicida Opera[®]
295 proporcionou um controle da doença mais efetivo quando comparado aos
296 demais tratamentos testados (Figura 1). A aplicação do Greenforce CuCa
297 e do ASM na dose 0,05 g.L⁻¹, também resultou em redução na severidade
298 da doença, diferindo dos demais tratamentos. O fungicida Opera[®]
299 proporcionou controle de 77%, seguido do Greenforce CuCa com 38% e
300 ASM, na dose 0,05 g/L, com 35% (Figura 1).



301

302 **Figura 1** Efeito dos tratamentos sobre a cercosporiose em mudas de
 303 cafeeiro. Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) e da
 304 incidência (AACPI) da doença. Controle da cercosporiose em
 305 porcentagem após os tratamentos com produtos químicos e extratos à
 306 base de subprodutos da cadeia produtiva do café. Barras com mesma letra
 307 não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

308 Os resultados para o experimento de expressão gênica da resposta
 309 aos indutores Greenforce CuCa e ASM ao longo de 0, 24, 48 e 72 horas
 310 após os tratamentos estão mostrados na Figura 2. De acordo com
 311 resultados apresentados, pode-se observar que para os genes que
 312 codificam as enzimas lipoxigenase e glutathione peroxidase, a maior
 313 expressão ocorreu às 48 horas, após o tratamento com Greenforce CuCa
 314 e, para o ASM a maior expressão ocorreu às 24 horas, correspondendo a 4
 315 vezes mais que o tratamento greenforce CuCa no mesmo tempo,
 316 observando um declínio com o passar das horas. Já para os níveis

317 transcritos dos genes que codificam as enzimas catalase e quitinase, a
318 maior expressão ocorreu às 24 horas após a aplicação do produto ASM,
319 correspondendo ao dobro da expressão para Greenforce CuCa, no mesmo
320 período. Para o tratamento Greenforce CuCa, os maiores níveis de
321 expressão ocorreram às 24 e 48 horas após o tratamento. De uma maneira
322 geral, o produto Greenforce CuCa promove um aumento na expressão 48
323 horas após a aplicação e o ASM tem respostas mais significativas às 24
324 horas.

325 A utilização de indutores de resistência atua de maneira efetiva no
326 controle da cercosporiose do cafeeiro. Estudos comprovam que tanto em
327 campo quanto em casa de vegetação, o uso de produtos à base de extratos
328 provenientes da cadeia produtiva do café e o indutor ASM são efetivos
329 agentes de controle contra doenças do café (COSTA et al., 2014).

330 No trabalho de Patrício et al. (2007), foi observada uma
331 diminuição dos sintomas da cercosporiose em 55% com aplicação do
332 ASM, na dose 0,025g L⁻¹ enquanto que no presente trabalho o mesmo
333 produto proporcionou redução dos sintomas em torno de 36% na dose de
334 0,05 g L⁻¹.

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

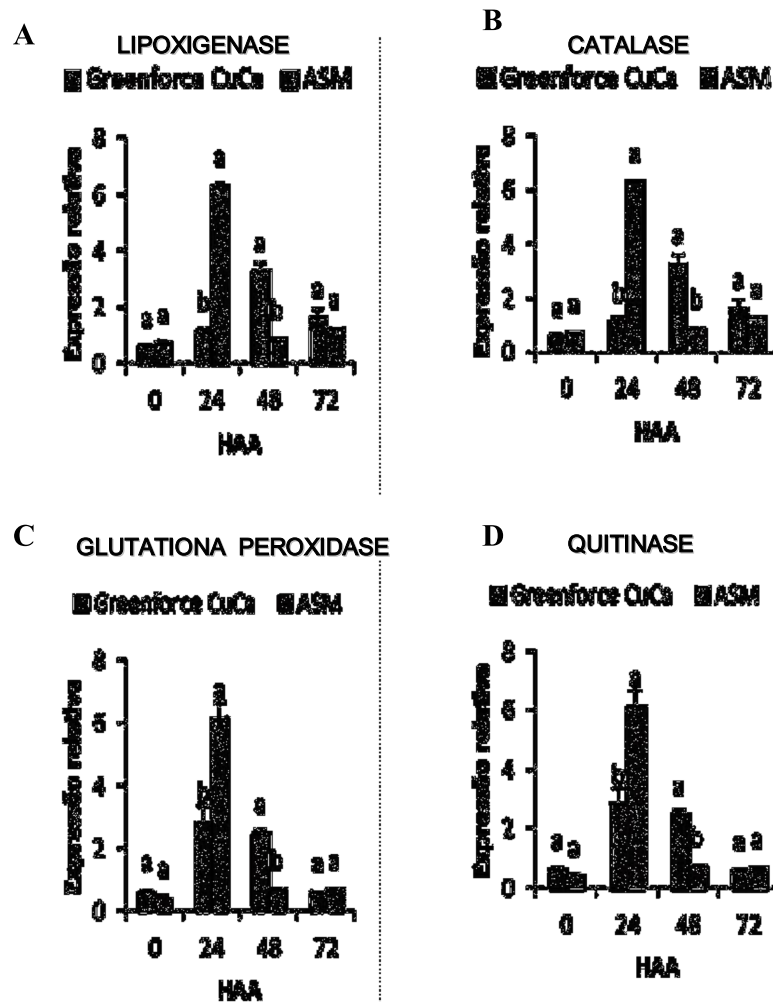
348

349

350

351 **Figura 2** Efeito dos tratamentos Greenforce CuCa e ASM em mudas de
 352 cafeeiro. Expressão relativa dos genes que codificam para as enzimas
 353 lipoxigenase (A), catalase (B), glutaciona peroxidase (C), quitinase (D),
 354 nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos com os produtos. O
 355 gene GAPDH e o RPL7 foram usados como controle endógeno. Barras de
 356 erros representam o erro padrão da média de três repetições. As letras nas
 357 barras de erros representam a análise os efeitos de cada produto aplicados
 358 ao longo do tempo conforme Tukey 5% de probabilidade.

359



360 Com relação às duas concentrações do ASM testadas neste
361 trabalho, observou-se que a menor concentração ($0,05\text{g L}^{-1}$) proporcionou
362 maior controle da cercosporiose. Patrício et al. (2007) avaliaram o efeito
363 do ASM, nas concentrações 25, 50 e $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$, na proteção de
364 cafeeiros 'Catuaí' e 'Obatã' contra o fungo *C. coffeicola*; eles verificaram
365 um menor controle para a maior dose, correspondendo, respectivamente,
366 a uma proteção de 47, 74 e 25%, nas aplicações em intervalo de 96 horas
367 entre tratamento e inoculação do patógeno. Segundo Barguil et al. (2004),
368 a falta de resposta ao aumento da dosagem é um indicativo da indução de
369 resistência em plantas.

370 Em relação aos extratos à base de subprodutos da cadeia produtiva
371 do café, observou-se neste trabalho que o Greenforce CuCa proporcionou
372 uma significativa redução dos sintomas da doença, com valores
373 equiparados ao controle químico padrão e ao indutor comercial ASM,
374 dado não evidenciado para o outro extrato ET-64 Dióxido de Titânio. Este
375 efeito pode ser atribuído a alguns dos componentes do Greenforce CuCa:
376 cobre e cálcio, que supre a planta nestes elementos e pode intervir no
377 desenvolvimento da cercosporiose, uma vez que esta doença tem relação
378 com o estado nutricional da planta (POZZA et al., 2000).

379 Nos estudos de Amaral (2005), observou-se redução na severidade
380 da cercosporiose de 40% e 37% em mudas tratadas com formulações à
381 base de extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem,
382 respectivamente. Costa et al. (2014) verificaram que formulação à base de
383 subprodutos das indústrias de café controla a cercosporiose em condições
384 de campo, além de promover uma redução da desfolha e aumento de
385 produtividade, o que comprova a atuação destes produtos em mudas e em
386 plantas adultas, corroborando com este estudo em que os níveis de
387 controle foram semelhantes.

388 Em estudos de mecanismos moleculares envolvidos na indução de
389 resistência de plantas contra patógenos, observa-se expressão de
390 diferentes genes de defesa, que estão associados com a indução de
391 resistência em plantas (HAMMERSCHMIDT et al., 2001).
392 Semelhantemente, observou-se neste trabalho que os produtos ASM e
393 Greenforce CuCa induzem a expressão de genes de defesa em cafeeiro.

394 Os dados apresentados mostram que o Greenforce CuCa
395 proporcionou uma resposta rápida com a expressão do gene que codifica
396 para a enzima lipoxigenase. Os tecidos vegetais, quando danificados
397 mecanicamente ou por patógenos, sofrem degradação de lipídios, cujos

398 produtos iniciais são os hidroperóxidos resultantes da ação das
399 lipoxigenases (SILVA et al., 2001). Os hidroperóxidos produzem
400 aldeídos, que inibem o crescimento de fungos, insetos e protozoários na
401 planta (CROFT et al., 1993). A lipoxigenase é uma enzima chave para a
402 formação do ácido jasmônico, a partir do ácido α -linolênico, levando à
403 formação do ácido jasmônico, um importante hormônio que sinaliza para
404 respostas a patógenos necrotróficos (PIETERSE et al., 2014).

405 O mecanismo antioxidante é importante para as plantas, uma vez
406 que expor as plantas a estresses bióticos e abióticos pode aumentar a
407 produção das espécies reativas de oxigênio. Para sua própria proteção
408 contra espécies intermediárias de oxigênio, as células das plantas e suas
409 organelas, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, empregam
410 um sistema de defesa antioxidante (HENG-MOSS et al., 2004).

411 Este sistema enzimático de defesa antioxidante tem limitado a
412 propagação dos processos oxidativos, permitindo que as células
413 mantenham a sua viabilidade contra a penetração de fungos em tecidos
414 vegetais (DJEBALI et al., 2011); que seria fundamental para o controle da
415 cercosporiose, uma vez que esta inicia sua penetração cerca de 36 horas
416 após a contato com os tecidos (SOUZA et al., 2011), indicando que

417 quanto mais rápida for a defesa das plantas induzida pelos agentes
418 indutores, maior será o sucesso de controle desta doença.

419 Com relação ao gene que codifica a enzima catalase, o produto
420 ASM promoveu maior expressão às 24 horas após sua aplicação. Esta
421 enzima está envolvida na decomposição das espécies reativas de oxigênio
422 que são também uma das respostas de defesa associada à SAR
423 (ALVAREZ et al., 1998). Com relação ao produto Greenforce CuCa, sua
424 maior expressão para catalase foi verificada 24 e 48 horas após a
425 aplicação.

426 Catalases são enzimas indispensáveis para desintoxificação das
427 células das plantas em condições de estresse, uma vez que elas são
428 responsáveis pela dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo
429 este peróxido gerado nos peroxissomos por oxidases envolvidas na
430 oxidação de ácidos graxos, fotorespiração e catabolismo de purinas
431 (GILL; TUTEJA, 2010). Níveis elevados de H_2O_2 são tóxicos para a
432 planta, enquanto que as concentrações mais baixas desempenham um
433 papel muito importante na transdução de sinal nas plantas atacadas e nos
434 seus estressores bióticos, como fungos e insetos (PRASAD et al., 1994).

435 Com relação à glutathione peroxidase, sua maior expressão ocorreu
436 também com o indutor ASM após 24 horas de aplicação. Esta enzima atua
437 nos mecanismos antioxidantes eliminando as espécies reativas de
438 oxigênio. A glutathione é um marcador da saúde celular e sua queda é
439 indicativa de lesão oxidante. A inativação efetiva das EROs exige a ação
440 de uma série de enzimas trabalhando em sincronia, e neste caso a ação
441 conjunta da CAT e GPX é de fundamental importância para este
442 mecanismo.

443 A enzima quitinase apresentou maior expressão com aplicação
444 do ASM às 24 haa. Em estudos de expressão gênica relacionando o
445 indutor ASM, observa-se que para a quitinase, este agente induz uma
446 resposta rápida, logo nas primeiras horas após a aplicação. Porém, para o
447 Greenforce CuCa, a quitinase teve uma expressão mais prolongada, fato
448 observado também nos perfis proteicos (capítulo 3). Extratos vegetais
449 apresentam atividade eliciadora em plantas, e são capazes de aumentar a
450 atividade de enzimas relacionadas à defesa induzida como a quitinase
451 (CAVALCANTI et al., 2005). Em estudos cujas plantas foram
452 posteriormente inoculadas com o patógeno, o ASM não foi tão efetivo no
453 controle, porque a atividade da enzima já havia baixado quando ocorreu o

454 aparecimento dos sintomas (MARCHI et al., 2002). Provavelmente neste
455 caso, o Greenforce ofereceria proteção mais duradoura, uma vez que a
456 quitinase foi super expressa por mais tempo.

457 Os dados apresentados neste trabalho, juntamente com as
458 pesquisas que estão sendo feitas, evidenciam que a cercosporiose em
459 mudas pode ser controlada com agente de indução de resistência,
460 incluindo os produtos à base de extratos provenientes da cadeia produtiva
461 do café, tornado uma ferramenta importante no manejo de doenças de
462 forma segura e menos tóxica ao ambiente. Além disso, é possível inferir
463 que o uso de eliciadores abióticos, como o Greenforce CuCa e ASM, é
464 capaz de ativar os mecanismos de defesa da planta através da produção
465 expressiva de genes relacionados às enzimas do sistema antioxidante, que
466 protege a célula dos danos causados pelo patógeno.

467

468 **4. CONCLUSÃO**

469 O Greenforce CuCa e o ASM foram efetivos agentes de controle
470 da cercosporiose do cafeeiro, comparados ao fungicida padrão.

471 Greenforce CuCa e ASM atuam de forma diferente sobre a
472 expressão de genes que codificam para enzimas relacionadas à

473 resistência, sendo que o produto Greenforce CuCa promove uma maior
474 expressão da lipoxigenase às 48 haa, e o para o ASM a maior expressão
475 foi às 24 haa, para as enzimas glutathione peroxidase, catalase e da
476 quitinase.

477 Com relação aos genes que codificam para as enzimas de defesa
478 estudadas, o ASM ativa a expressão mais rápida de genes, enquanto que o
479 Greenforce CuCa promoveu um aumento na expressão destes genes de
480 forma mais lenta, porém mais duradoura.

481

482 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

483

484 ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide
485 dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of**
486 **Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331–1341, May. 2002.

487

488 ALVAREZ, M. E. et al. Reactive oxygen intermediates mediate a
489 systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, v.
490 92, n. 6, p. 773-784, Mar. 1998.

491

492 AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra**
493 ***Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais.**
494 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal
495 de Lavras, Lavras, 2005.

496

497 BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted
498 coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee

- 499 plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537,
500 Set./Out. 2005.
- 501
- 502 BARSALOBRES-CAVALLARI, et al. Identification of suitable internal
503 control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different
504 experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, v.10, n. 1, Doi:
505 10.1186/1471-2199-10-1. 2009.
- 506
- 507 CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Cercospora: Doença do
508 cafeeiro também chamada de "olho pardo" ou "olho de pomba".
509 (EPAMIG). **Informe tecnológico**, n. 026, 2001.
- 510
- 511 CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da época de aplicação
512 e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-
513 Verticillium em cacaueteiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1,
514 p. 67-71, Jan./Fev., 2005.
- 515
- 516 COGO, F. D. et al. Propriedades do solo em cafezais e suas sucessões no
517 sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO
518 BRASIL, 7., 2011, Araxá, MG. **Anais...** Brasília: Embrapa-Café, 2011.
- 519
- 520 COSTA, B. H. G. et al. Suppression of Rust and Brown Eye Spot
521 Diseases on Coffee by Phosphites and By-products of Coffee and Citrus
522 Industries. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 10, p. 635-642, Oct.
523 2014.
- 524
- 525 CROFT, K. P. C.; JUTTNER, A. J.; SLUSARENKO, F. Volatile
526 products of the lipoxygenase, pathway evolved from *Phaseolus vulgaris*
527 L. leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Plant**
528 **Physiology**, v. 101, n. 1, p. 13-24, Jan. 1993.
- 529
- 530 DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated Cercospora toxin
531 cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology.
532 **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 461-490, Sep.
533 2000.
- 534

- 535 DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated
536 perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS**
537 **Microbiology Letters**, Birmingham, v. 252, n. 2, p. 197-206, Nov. 2005.
538
- 539 DJÉBALI, N. et al. Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are
540 components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces*
541 *euteiches*. **European Journal Plant Pathology**, v. 131, n. 4, p. 559-571,
542 Jul. 2011.
543
- 544 FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**.
545 Lavras: UFLA, 2000. 66p.
546
- 547 **GECHEV, T. S.** et al. Reactive oxygen species as signals that modulate
548 plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, v. 28, n. 11,
549 p. 1091-1101, 2006.
550
- 551 GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant
552 machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology**
553 **and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.
554
- 555 GODOY C. V.; BERGAMIN FILHO A.; SALGADO C. L. Doenças do
556 cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia,**
557 **Doenças das plantas cultivadas**. Viçosa: Editora Agronômica Ceres,
558 1997. V. 2, 3rd Ed., p. 184-200.
559
- 560 GUIMARÃES, P. T. G. et al. Cafeeiro. In: RIBEIRO, A. C.;
561 GUIMARÃES, P. T. G.; VENEGA, V. H. A. (Eds.). **Recomendações**
562 **para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5^a**
563 **aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999, p. 289-302.
564
- 565 HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; LOON, L. C. Inducing
566 resistance: a summary of papers presented at the First International
567 Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. **European Journal**
568 **of Plant Pathology**, v. 107, p. 1-6, Jan. 2001.
569
- 570 HENG-MOSS, T. et al. Characterization of oxidative enzyme changes in
571 buffalograsses challenged by *Blissus occiduus*. **Journal Economic**
572 **entomology**, v. 97, p. 1086-1095, 2004.

- 573
574 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene
575 expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C T}$.
576 **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402 – 408, Dec. 2001.
577
- 578 MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V. Proteção
579 induzida por benzotiadiazole contra a ferrugem-laranjada (*Hemileia*
580 *vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p.
581 1103-1106, 2002.
582
- 583 PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl,
584 fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial
585 blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied**
586 **Biology**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, Sep. 2007.
587
- 588 PATRICIO, F. R. A.; BRAGHINI, M. T. Efeito de fungicidas triazóis
589 sobre o controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro. **Arquivo**
590 **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 241-249, Abr./Jun., 2011.
591
- 592 PIETERSE, C. M. J. et al. Induced Systemic Resistance by Beneficial
593 Microbes, **Annual Review Phytopathology**, v. 52, p. 347–375, Aug.
594 2014.
595
- 596 PITZSCHKE, A.; FORZANI, C.; HIRT, H. Reactive oxygen species
597 signaling in plant. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 8, n. 9/10, p.
598 1756-1764, Oct. 2006.
599
- 600 POZZA, A. A. A. et al. Intensidade da mancha de olho pardo em mudas
601 de cafeeiro em função de doses de N e K em solução nutritiva. **Summa**
602 **Phytopathologica**, v. 26, n. 1, p. 29-33, Jan. 2000.
603
- 604 PRASAD, T. K. et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in
605 maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **The Plant**
606 **Cell**, v. 6, n. 1, p. 65-74, Jan. 1994.
607
- 608 SCANDALIOS, J. G., ACEVEDO, A., RUZSA, S. Catalase gene
609 expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant**
610 **Science**, v. 156, n. 1, p. 103-110, Jan. 2000.

- 611
612 SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the
613 expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**,
614 v. 70, p. 1183-1186, 1977.
- 615
616 SILVA I. R.; SMYTH, T. J.; RAPER, C. D. Differential aluminum
617 tolerance in soybean: an evaluation of the role of organic acids.
618 **Physiology Plantarum**, v. 112, n. 2, p. 200–210, Jun. 2001.
- 619
620 SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on
621 coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 159, n. 1, p. 6–11,
622 Jan. 2011.

(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 2 Proteínas diferencialmente expressas em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) após tratamento com indutores de resistência

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

A análise da proteômica vem sendo cada vez mais aplicada para elucidar os mecanismos envolvidos na indução de resistência em plantas. Assim, a realização deste trabalho teve como objetivo analisar as proteínas diferencialmente expressas em mudas de café *Coffea arabica*, cultivar Mundo Novo, após aplicação de formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira (Greenforce CuCa), e de acibenzolar-S-metil (ASM), visto que estes produtos induzem resistência no café contra doenças. Mudas de café foram pulverizadas com Greenforce CuCa, ASM e água (testemunha) e o material foliar foi coletado às 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos produtos. Foi realizada a extração das proteínas totais das amostras e, em seguida, feita a eletroforese bidimensional. Os *spots* diferencialmente expressos foram excisados dos géis e realizada a espectrometria de massa para identificação dos mesmos. Após análise dos géis, foi possível encontrar 21 *spots* diferencialmente expressos referentes ao tratamento Greenforce CuCa e 17 *spots* nos géis referentes aos tratamentos ASM. No total destes *spots*, 51% das proteínas apresentaram *score* significativo, sendo que destas, 47% correspondem ao tratamento com ASM e 53% correspondem ao tratamento com Greenforce CuCa. Na correlação de qual processo biológico as proteínas identificadas fazem parte, observou-se que 44% das proteínas estão envolvidas em processos fotossintéticos, 28% relacionadas ao estresse biótico, 11% relacionadas à via glicolítica, 6% ao metabolismo secundário, 6% relacionadas à regulação da transcrição e 5% ao estresse biótico. Isto comprova que o Greenforce CuCa e o ASM proporcionam alterações no metabolismo de mudas de café, induzindo a expressão diferencial de proteínas de defesa.

Palavras chave: Proteômica; Indução de resistência; Espectrometria de massas; Gel 2D.

1 INTRODUÇÃO

As principais doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil (*Coffea arabica* L.) são a ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, e a cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke (VENTURA et al., 2007; ROMERO et al., 2010). A medida de controle mais utilizada pelos produtores para estas doenças é o manejo químico, com a utilização de fungicidas sistêmicos e protetores. Entretanto, o uso indiscriminado de fungicidas pode causar danos ao meio ambiente e aos seres vivos, além da possibilidade de surgimento de raças e isolados dos patógenos resistentes a estes produtos (AMARAL et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2009). Assim, nos últimos anos, têm se intensificado pesquisas que buscam medidas alternativas de controle destas doenças.

Estudos têm demonstrado que a utilização de agentes que induzem a resistência da planta, como o acibenzolar-S-metil (ASM) (GUZZO et al., 2009, PATRICIO et al., 2007, GALDEANO et al., 2010) e formulações à base de subprodutos da cadeia produtiva do café, provocam uma redução dos sintomas de doenças em cafeeiro e, em alguns casos, melhoram o desenvolvimento e enfolhamento das plantas (MONTEIRO, 2014; COSTA et al., 2014).

Diante do controle observado pela utilização destes produtos, surge a necessidade de entender os mecanismos envolvidos na resposta das plantas aos mesmos. Estudos moleculares, como transcriptômica e proteômica, são importantes ferramentas que estão sendo cada vez mais aplicadas e aprimoradas para elucidar os mecanismos envolvidos na

indução de resistência. Nos estudos de Pôssa (2015), com os indutores de resistência Greenforce CuCa e Bion[®], mostraram uma alteração na abundância relativa de proteínas envolvidas no metabolismo energético (fotossíntese e respiração) e estresse/defesa, o que sugere alterações ao nível do metabolismo primário das células após os tratamentos. Assim, a análise proteômica pode complementar a transcriptômica, pois possibilita identificar proteínas de uma célula ou tecido, bem como caracterizar modificações pós-traducionais ou interações proteína-proteína envolvidas na resposta a estresses bióticos e abióticos (QUIRINO et al., 2010).

Em estudo do patossistema *Arabidopsis thaliana-Plasmodiophora brassicae* realizado por Devos et al. (2006), foi possível verificar que o perfil proteico associado com defesa celular, metabolismo e diferenciação celular, apresentou-se alterado entre raízes e caules infectados e não-infectados. A identificação de proteínas expressas nas plantas ainda carece de mais estudos (BINDSCHEDLER et al., 2006; YAN et al., 2006), uma vez que, os dados obtidos são cruciais para a melhoria das anotações genômicas, possibilitando a validação de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) por meio da comparação entre o gene transcrito e a expressão da proteína correspondente (VIEIRA et al., 2006).

Estudos recentes de proteômica em cafeeiro ressaltam o potencial desta análise para uma melhor compreensão e abordagem do que ocorre no complexo celular durante a germinação, enchimento de grãos, maturação das sementes e grãos de café (FRANCO et al 2010; KOSHINO et al. 2008; GIL-AGUSTI et al. 2005; TAVEIRA et al., 2012; LIVRAMENTO, 2014), além de outros processos importantes, como nos mecanismos envolvidos na defesa das plantas de cafeeiro (GUERRA-

GUIMARAES et al., 2009). Taveira et al. (2012), após realização de análises de grãos de café processados por via seca ou via úmida, elucidaram a ideia de que proteínas podem ser marcadores de qualidade dos cafés, pois foram identificadas proteínas resistentes ao calor, por eletroforese bidimensional.

Trabalhos relatam a análise transcriptômica realizada em cafeeiro, após aplicação de ASM (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; NARDI et al., 2006), e em tomateiro, após aplicação de formulação à base de folhas de cafeeiro (MEDEIROS et al., 2009), mostrando o efeito indutor de resistência destes produtos. Visando o melhor entendimento do processo de resposta das plantas à ação do ASM e de formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira (Greenforce CuCa), propôs-se com este trabalho analisar as proteínas diferencialmente expressas em mudas de cafeeiro após aplicação destes produtos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das mudas de cafeeiro

As sementes de cafeeiro da espécie *Coffea arabica*, cultivar Mundo Novo, seleção 376/4, foram adquiridas na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epagig), Centro Tecnológico do Sul de Minas, Lavras, MG, semeadas em bandejas de plástico contendo areia lavada e, na fase de “orelha de onça”, foram transplantadas para sacos de polietileno de 2,0 kg contendo substrato composto por terra, areia e esterco bovino, na proporção 2:1:1 (v/v/v).

As mudas foram mantidas em casa de vegetação durante todo o período experimental, irrigadas periodicamente e adubadas conforme recomendação de Guimarães et al. (1999). Posteriormente foram transferidas para o câmara de crescimento do tipo Fitotron, mantidas a 25°C, umidade em torno de 70%, 12 horas claro/escuro para aclimação e instalação do experimento.

2.2 Obtenção dos produtos

Utilizou-se a formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira (Greenforce CuCa), cedida pela Agrofitness- Tecnologia Agrícola (empresa incubada na Universidade Federal de Lavras), na dose 1,53 mL/L⁻¹, e o produto Bion[®] (acibenzolar-S-metil - ASM), na dose 0,05g/L⁻¹, adquirido da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.

2.3 Aplicação dos tratamentos e coleta do material vegetal

Realizou-se a aplicação do ASM, do Greenforce CuCa e da água (testemunha) e, em seguida, foram realizadas as coletas do material nos tempos: 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (haa) dos tratamentos. Foram coletados 2 pares de folhas superiores totalmente expandidas, em cada tempo de coleta, envolvidas em papel alumínio, identificadas, imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C , até o momento da extração das proteínas totais.

2.4 Extração de proteínas totais

Para a obtenção do extrato proteico, foi utilizado o protocolo descrito por Ramagli (1999), adaptado para cafeeiro por Guimarães et al. (2009). O material foliar foi triturado em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo, até formar um pó fino. Em tubos contendo aproximadamente um grama do macerado, para cada amostra biológica, foi adicionado 1,5mL de tampão de extração (100mM de Tris-HCL pH 8,3, 5mM EDTA, 100 mM KCL, 1% DTT e 250 mM de β -mercaptoetanol). Esses tubos foram agitados por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, para a precipitação das proteínas, foram adicionados 1,5mL de solução de ácido tricloroacético/acetona com 0,07% (v/v) de β -mercaptoetanol aos tubos, que foram mantidos em overnight, por 12horas. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas (20min, 4°C , 16.000 x g). O *pellet* formado foi lavado quatro vezes com acetona e β -mercaptoetanol (0,07% v/v). As amostras foram filtradas em colunas do tipo PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences), seguindo recomendações do fabricante. A concentração de

proteína de cada amostra foi estimada de acordo com Bradford (1976), modificado por Ramagli (1999) e adaptado às placas de ELISA, utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA). Após essa etapa as amostras foram mantidas em freezer a -20°C , para posteriores análises.

2.5 Eletroforese bidimensional

As proteínas foram então separadas por focalização isoeletrica (IEF) utilizando fitas de gel de 13cm (Immobiline DryStrips), com gradiente de pH não linear variando de 3 a 10. As tiras de gel foram rehidratadas durante 14 horas a 20°C em tampão contendo tiourea 2M, uréia 7M, 1,2% (v/v) do reagente DeStreak (Amersham Biosciences), acrescido de traços de azul de bromofenol, CHAPS 2% (p/v) e 0,5% do tampão IPG (pH de 3 a 10 NL), para um volume final de $250\mu\text{l}$ de solução e $100\mu\text{g}$ de proteínas.

Para a focalização isoeletrica, as fitas foram posicionadas no Manifold e cobertas com *Cover Fluid* (GE Healthcare). A focalização isoeletrica ocorreu a 20°C , a 300V, por 0,01 minuto; 3500V, por 1,5 hora; 3500V, por 4 horas utilizando sistema IPGpsor III- GE Helthcare. Ao final da focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas a -80°C para posterior eletroforese de segunda dimensão.

Antes da eletroforese de segunda dimensão, as fitas de gel foram equilibradas em 10 mL de solução contendo uréia 6 M, 30% (v/v) de glicerol, 2% (w/v) SDS, Trizma base 75 mM pH 8,8 e com DTT 65 mM e iodoacetamida 0,2M, sendo realizado em três etapas: (1) tampão com DTT, em que as fitas foram deixadas em contato com a solução por 15

minutos; (2) tampão sem DDT e iodoacetamida, por 10 minutos; e (3) as fitas foram mantidas em tampão com iodoacetamida por 15 minutos.

Para a realização da eletroforese SDS-PAGE, as fitas de gel foram colocadas no topo de géis de acrilamida 10% (v / v), com Bis acrilamida 40% 7,5mM, base Trizma 0,3mM, persulfato de amônio a 0,08% (w/v) e 0,04% (v/v) de TEMED. Tiras de gel foram seladas com agarose 1% (w/v) de baixo ponto de fusão, contendo agarose 0,2%, SDS, base Trizma 50 mM, 0,4M de glicina com traço de azul de bromofenol. Os géis foram deixados durante 5 minutos para permitir a solidificação de agarose. A eletroforese foi realizada a 20° C em tampão de SDS, glicina 95 mM, Trizma base 12,5 mM, no Sistema Hoefer SE600 (GE Healthcare). As condições para a corrida foram: 15mA a 80V por 30 minutos, 25mA e 250V por 4,5 horas.

2.6 Coloração da proteína e análise dos géis 2D

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250, seguindo protocolo estabelecido para uso no laboratório Biotecnologia Florestal da UFLA. Em seguida, os géis corados foram digitalizados (ImageScanner Amersham Biosciences equipado com Ulmax MagiScan 4,6 no modo transmissivo com 300 dpi. Imagem). A análise dos *spots* nos géis foi realizada com ImageMaster 2D Platinum 5.0 (Amersham Biosciences). Análises de grupos, classes e teste estatístico foram então realizadas pelo *software* teste t-Student ($P < 0,05$) sendo considerados diferencialmente abundantes os *spots* com Anova $> 0,05$, presente em todas as amostras para cada tratamento.

2.7 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Os *spots* diferencialmente expressos foram manualmente excisados da mancha de Coomassie Blue no gel 2D, utilizando um escalpelo estéril, desidratados com acetonitrila 100%, secos em *speed vac* e tratados com a enzima tripsina (Promega[®]), a 58°C, por 30 minutos. Os peptídeos foram ressuspensos em solução contendo acetonitrila 5% com ácido fórmico 0,1%.

Para a espectrometria de massas, 40µL da solução peptídica foi injetada, com o auxílio do injetor automático (SL 20A HT), equipado com um loop de 100µL, no UFLC (Modelo Prominence, marca SHIMADZU). O sistema foi operado através do software Hystar (Bruker Daltonik, v. 3.2.44.0). Uma pré-coluna de 5 mm analítica de 150 mm×75 µm preenchida com fase estacionária C18, 2,7 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, Estados Unidos) foi utilizada para a separação dos peptídeos, conectada diretamente ao espectrômetro de massa (tipo Q-TOF, modelo micrOTOF QII, marca BRUKER DALTONICS). As amostras foram injetadas através de um fluxo de 200 µL min⁻¹ em uma solução a 5 % (v/v) acetonitrila e 0.1 % (v/v) AF em água (Fluka, Buchs, Suíça). A fase móvel (A) utilizada para separação foi um gradiente entre água, contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka, e acetonitrila, contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv-Fluka (B).

O fluxo para separação dos peptídeos foi de 200 µL min⁻¹. As configurações utilizadas na espectrometria de massa foram: intervalo de massa: 50–2500m/z; voltagem do spray: 2000 V; gás de secagem (N₂) temperatura: 180°C; fluxo: 9 L min⁻¹; funnel 1 RF 300.0 Vpp; funnel 2 RF 400.0 Vpp; Hexapolo RF 400.0 Vpp; energia do quadrupolo 5.0 eV;

menor massa do quadrupolo 322.00 m/z; energia de colisão 10.0 eV; RF da colisão 800.0 Vpp; tempo de transferência 150us; armazenamento pré-pulso 5.0 us.

Os dados cromatográficos obtidos via LC-MS-MS foram analisados com o software Bruker Data Analysis, version 4.0 (Build 253). O espectro de MS/MS obtido utilizado para busca em banco de dados, utilizando o software Biotoools Version 3.2 (Bruker Daltonik).

Os espectros das amostras obtidas por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa, utilizando-se o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), para a comparação das massas de peptídeos observados com bancos de dados e para a identificação das proteínas mais prováveis. Os bancos de dados utilizados nas análises foram o do Genoma Café (VIEIRA et al., 2006), do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e SWISSPROT 2010.

2.8 Instalação do experimento e delineamento experimental

Para o experimento de análise proteômica da resposta das plantas aos agentes indutores, foram utilizadas mudas de cafeeiro produzidas conforme descrito no item 2.1, cultivadas em condições controladas na casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFLA, e transferidas para câmara de crescimento vegetal do tipo Fitotron, com 4 pares de folhas totalmente expandidas, aclimatadas por uma semana sob as seguintes condições: temperatura média de 25°C, umidade relativa de 70% e luminosidade de 12 horas claro/escuro. O delineamento experimental foi conduzido em blocos casualizados com 3 repetições constituídos de: 3 plantas por parcela (as folhas coletadas de cada planta

foram juntadas formando o *pool*), com 3 tratamentos, analisados em 4 tempos (0, 24, 48 e 72 haa), totalizando 36 amostras a serem analisadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi analisado um total de 36 géis, sendo 12 para cada tratamento: Greenforce CuCa, ASM e testemunha. Com o resultado foi possível verificar que a maioria das proteínas se concentraram nos géis entre os pontos isoeletricos de 3-7 e com massas entre 20 e 100 kDa. Os géis apresentaram uma média de 240 *spots* detectados.

Um total de 37 *spots* diferencialmente expressos nas imagens dos géis de ambos os tratamentos foram excisados para o sequenciamento das proteínas (ANEXO A). Destas, foram identificadas com *score* significativo (acima do recomendado para cada proteína no que se refere à confiança dos dados na sequência peptídica) 51% das proteínas, sendo que 47% correspondem ao tratamento com ASM, listadas na Tabela 1, e 53% correspondem ao tratamento com Greenforce CuCa, listadas na Tabela 2.

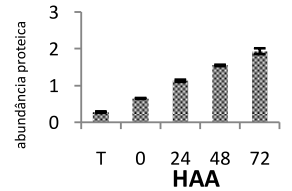
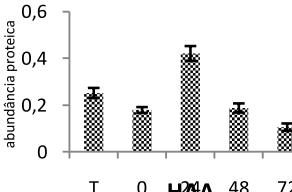
Pode-se observar que ambos os tratamentos alteram a abundância das proteínas listadas, quando comparados com a testemunha, ao menos em um período de tempo analisado. Em plantas tratadas com ASM, as proteínas correspondentes aos *spots* 26b (Polypeptide fotossistem II 23 kDa) e 8b (Chitinase class III) tiveram sua abundância crescente ao longo do tempo após a aplicação do indutor. Já as proteínas 50b (ATP syntase subunit beta), 41b (Unknown), 11b (Full Sedoheptulose-1,7-bisphosphate chloroplast) e 201b (Stromal Protein 70 kDa heat shock chloroplast) tiveram sua maior abundância à 0 haa, decrescendo ao longo do tempo. Já as proteínas 28b (Hypothetical Protein), 2b (ATP syntase chloroplast) e

75b (Protein predicted) obtiveram suas maiores abundâncias entre 24 e 48 haa (Tabela 1).

Para o tratamento Greenforce CuCa, as proteínas correspondentes aos *spots* 20c (Glyceraldeide dehydrogenase phosphate), 51c (Chitinase class III), 71c (Ribulose biphosphate) e 82c (Malate dehydrogenase mitochondrial), tiveram sua abundância crescente ao longo do tempo e as demais proteínas, como 131c (Subunidade IV reaction central, chloroplast), 7c (Rieske iron-sulphur protein precursor) 8c (Cytochrome b6-f complex iron-sulfer subunit, chloroplastic), 50c (Isoflavone reductase-like), 86c (Glyceraldeide 3-phosphate dehydrogenase, cytosol) e 145c (Protein ribossomal L12, chloroplast), foram mais abundantes às 24 e/ou 48 haa, apresentando redução às 72 haa (Tabela 2). Este comportamento da abundância proteica evidencia o período e a permanência de resposta ativada pelos indutores, que neste caso, é evidenciado que o ASM promove uma resposta, mas esta não se mantém ao longo do tempo. Já o Greenforce CuCa mostrou que as respostas se iniciaram entre às 24 e que estas foram crescentes até às 72 haa para um maior número de proteínas analisadas neste trabalho.

Tabela 1 Proteínas diferencialmente abundantes encontradas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo após aplicação de acibenzolar-S-metil e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray

Legenda: IS - Identificação dos spots; IP – Identificação das proteínas; SE – score encontrado; GI – Identificação do acesso no GenBank; Exp/Th Mr - Massa molecular (Mr) teórica (Th) e experimental (Exp) dos peptídeos identificados; HAA: horas após aplicação, e (T) Testemunha.

IS	Volume relativo das médias dos spots ao longo do tempo	IP	SE	Organismo	GI	Sequência dos peptídeos	Exp/Th Mr
26b		Polypeptide fotossystem II 23 kDa	36	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 19896	K.EVEFPGQVLR.Y	1172.6195 1172.6190
28b		Protein hypothetical	40	<i>Vitis vinifera</i>	gi 147861524	K.MSELENGKR.E	1078.5338 1078.5077

“Tabela 1, continuação”

IS	Volume relativo das médias dos spots ao longo do tempo	IP	SE	Organismo	GI	Sequência dos peptídeos	Exp/Th Mr
201b	<p>abundância proteica</p> <p>T 0 HAA 48 72</p>	Stromal Proteín 70 kDa heat shock Chloroplast	275	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 1143427	R.NTTLPSTK .S	860.4605 860.4603
2b	<p>abundância proteica</p> <p>T 0 HAA 48 72</p>	ATP syntase Chloroplast	132	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 114584	K.TVIDPSLV AGFTIR.Y	1487.8229 1487.8348
11b	<p>abundância proteica</p> <p>T 0 HAA 48 72</p>	Full Sedoheptulose -1,7- byphosphate Chloroplast	84	<i>Triticum aestivum</i>	gi 1173347	K.MFSPGNL R.A	936.4548 936.4487

“Tabela 1, continuação”

IS	Volume relativo das médias dos spots ao longo do tempo	IP	SE	Organismo	GI	Sequência dos peptídeos	Exp/Th Mr
41b		Unknown	150	<i>Populous trichocarpa</i>	gi 118488941	K.ENFEDLPEK. F	
75b		Predicted protein	98	<i>Populous trichocarpa</i>	gi 224141565	K.TAGGLLTE ATK.E	
8b		Chitinase class III	30	<i>Coffea arabica</i>	gi18200080	K.MTACLRPLF L.V	

“Tabela 1, conclusão”

IS	Volume relativo das médias dos spots ao longo do tempo	IP	SE	Organismo	GI	Sequência dos peptídeos	Exp/Th Mr
50b	<p>abundância proteica</p> <p>T 0 24 48 72</p> <p>HAA</p>	ATP syntase subunit beta	14	<i>Coffea arabica</i>	gi 7708197	K.LSIFETGIK.V	1006.5788 1006.5696

Tabela 2 Proteínas diferencialmente abundantes encontradas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo após aplicação de Greenforce CuCa e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray

Legenda: IS - Identificação dos spots; IP – Identificação das proteínas; SE – score encontrado;, GI – Identificação do acesso no GenBank; Exp/Th Mr - Massa molecular (Mr) teórica (Th) e experimental (Exp) dos peptídeos identificados; HAA: horas após aplicação.

IS	Volume relativo das médias dos spots ao longo do tempo	IP	Score>	SE	Organismo	GI	Sequência dos peptídeos	Exp/Th Mr
20c		Glyceraldeide dehydrogenase phosphate	12	16	<i>Coffea arabica</i>	gi 9140281065 1	R.AASFNIIPSS	1433.7480
							TGAAK.A	1433.7514
51c		Chitinase class III	42	104	<i>Coffea arabica</i>	gi 296399179	R.TGVVDQVR.	872.4752
							V	872.4716

“Tabela 2, continuação”

IS	Volume relativo das médias dos spots ao longo do tempo	IP	Score>	SE	Organismo	GI	Sequência dos peptídeos	Exp/Th Mr
131c		Subunit IV central reaction, Chloroplast	26	64	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 1311178	K.GVGSVVAV DQDPK.T	1269.6572 1269.6565
7c		Rieske iron- sulphur protein precursor	25	231	<i>Pinellia ternata</i>	gi 158935 081	R.GPAPLSLAL AHADIDE GK	1773.9355 1773.9261
8c		Cytochrome b6-f complex iron-sulfer subunit, chloroplastic	27	137	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	gi 269593 9	K.GDPTYLVVE K	1119.5606 1119.5812

“Tabela 2, continuação”

IS	Volume relativo das médias dos spots ao longo do tempo	IP	Score>	SE	Organismo	GI	Sequência dos peptídeos	Exp/Th Mr
50c		Isoflavone reductase-like	8	9	<i>Coffea arabica</i>	gi 255529745	K. MAVKSKILII .V	1367.6434 1367.6358
71c		Ribulose biphosphate			<i>Cucumis sativus</i>	gi 100614	R.KYDFDNTMG GFYIAPAFMDK. L	2346.0475 2346.0337
82c		Malate dehydrogenase mitochondrial	26	188	<i>Citrullus lanatus</i>	gi 21388550	K.LFGVTTLDVV R.A	1218.6959 1218.6972

“Tabela 2, continuação”

IS	Volume relativo das médias dos spots ao longo do tempo	IP	Score>	SE	Organismo	GI	Sequência dos peptídeos	Exp/Th Mr
86c	<p>abundância proteica</p> <p>T 0 H2A 48</p>	Glyceraldeide 3-phosphate dehydrogenase, cytosol	25	28	<i>Antirrhinum majus</i>	gi 120666	R.AASFNIIPSS TGAAK.A	1433.7568 1433.7514
145c	<p>abundância proteica</p> <p>T 0 H2A 48</p>	Protein ribossomal L12,	26	321	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 20020	K.DAPMFVVG VNEK.E	1320.6475 1320.6384

Em análise realizada com o auxílio do *Software* Mercator, por meio do número de acesso no Genbank das proteínas identificadas, foi possível correlacionar estas ao processo biológico que estão associadas (Figura 1). As proteínas identificadas correspondem, em sua maioria, a processos fotossintéticos, correspondendo a 44%, seguido de 28% de proteínas envolvidas em resposta ao estresse abiótico, 11% correspondem a via glicolítica, 6% ao metabolismo secundário, 6% relacionadas à regulação da transcrição e 5% ao estresse biótico (Figura 1).

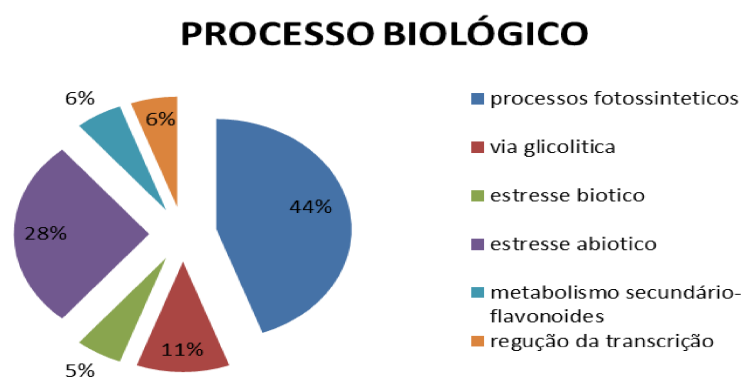


Figura 1 Relação biológica das proteínas diferencialmente abundantes, encontradas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo e identificadas por análise dos peptídeos em espectrometria de massa por eletrospray. Análise realizada no Programa Mercator, acessado através do link: <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator>

Para a análise relacionada aos componentes celulares (Figura 2), nota-se uma correlação com a figura 1, visto que a maioria das proteínas identificadas está envolvida nos processos fotossintéticos. Pode-se observar uma maior predominância de proteínas que atuam nas organelas

celulares e citosol, tais como mitocôndrias, cloroplastos, tilacóides, entre outras, correspondendo a 82% das proteínas identificadas. As demais atuações proteicas foram no núcleo, sistema de endomembrana e ribossomo, correspondendo cada componente celular a 6% das proteínas totais identificadas (Figura 2).

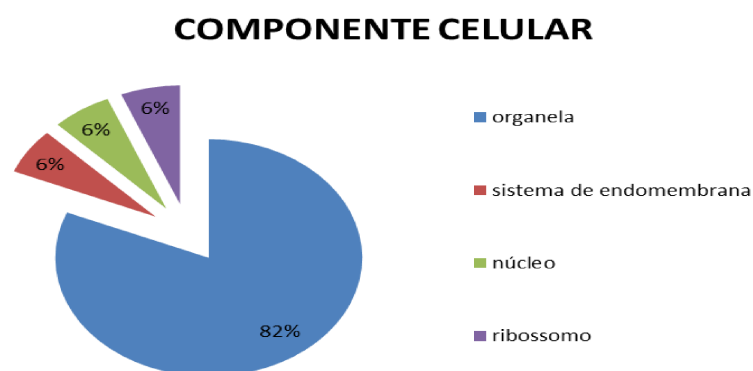


Figura 2 Localização celular das proteínas diferencialmente abundantes, encontradas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo, e identificadas por análise dos peptídeos por espectrometria de massa por eletrospray. Análise realizada no Programa Mercator, acessado através do link: <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator>

As proteínas têm funções bioquímicas e fisiológicas fundamentais no metabolismo dos organismos e qualquer alteração por meios bióticos e abióticos interfere em seu perfil proteico. Os avanços na proteômica têm possibilitado o estudo de processos biológicos dinâmicos com a análise sistemática do perfil proteico expresso sob determinada condição em um organismo, e ainda possibilita mapear os caminhos metabólicos (PANDEY; MANN, 2000; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

A maioria das proteínas identificadas apresentou homologia com sequências de outras plantas, tais como *Triticum aestivum*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana tabacum*, *Vitis vinífera*, entre outras (Tabela 1 e 2). Essas espécies apresentam um grande número de sequências de proteínas depositadas em bancos públicos, como o NCBI, e só a homologia indica que essas proteínas são altamente conservadas entre as espécies lenhosas e não lenhosas.

Cinco proteínas tiveram homologia com *Coffea arabica*. Um estudo da evolução e composição genômica de *C. canephora* revelou considerável conservação da microcolinearidade entre esta espécie e *V. vinífera* (GUYOT et al., 2009). Lin et al. (2005) também relataram um alto nível de conservação entre o genoma de *C. canephora* e de outras espécies dicotiledôneas, tais como *Solanum lycopersicon* e *Populus trichocarpa*. Embora recentemente foi anunciado o sequenciamento completo do genoma de *C. canephora* (DENOEUDE et al., 2014), o sistema de busca em banco de dados precisa ser atualizado para que possam ser feitas as homologias, fato que até a realização destas análises ainda não havia sido feito.

Em estudo do proteoma de plantas após aplicação de eliciadores abióticos, Hao et al. (2014) identificaram 37 proteínas em cotilédones de pepino após tratamento com glucohexaose. As proteínas identificadas estavam envolvidas na fotossíntese, respiração, tradução, fosforilação e antioxidante. Além disso, foi observado um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) ativando o mecanismo de resistência induzida e abundância de NADPH oxidase, que inicia a explosão oxidativa. Em outro estudo com aplicação de ácido salicílico, observou-se abundância de

proteínas relacionadas à defesa, como peroxidases classe III e β -1,3-glucanase, em videira (BELCHI-NAVARRO, et al., 2013).

Neste trabalho, observou-se que 44% das proteínas diferencialmente expressas estão relacionadas à processos fotossintéticos. Isto já era esperado, uma vez que o material em estudo foi folhas. Estudos têm evidenciado esta abundância de proteínas, em que a maioria das proteínas identificadas está relacionada à fotossíntese. No estudo do proteoma de folhas de *Medicago truncatula*, Castillejo et al. (2010) observaram que 33% das proteínas identificadas atuam na fotossíntese. Na análise do proteoma de folhas de videira, também foi identificado um percentual de 20% (LIU et al., 2014), o que em ambos os estudos correspondia a maioria das proteínas identificadas.

Há uma correlação entre sistema fotossintético e defesa das plantas, principalmente em relação a processos oxidativos. Takahashi et al. (2003), em experimento com *Arabidopsis*, concluíram que o consumo de energia fotoquímica, como ATP e NADPH, através da via fotorespiratória, ajuda a evitar danos fotooxidativos no fotossistema II. No presente trabalho, observou-se que a proteína Polipeptídeo fotossistema II (*Spot 26b*) foi diferencialmente expressa em folhas de cafeeiro após tratamento com ASM. O aumento da abundância desta proteína ao longo do tempo, possivelmente, é devido à proteção da maquinaria fotossintética contra estresses oxidativos. As plantas precisam dissipar o excesso de energia luminosa, o que pode ser alcançado também mediante aumento nos níveis de xantofilas e carotenos ou por atuação do sistema de defesa antioxidativo (ASADA, 1999).

Neste trabalho, foi observado, ao longo do tempo, maior abundância da proteína Malato desidrogenase mitocondrial (*spot* 82c) em plantas tratadas com Greenforce CuCa. Esta proteína atua no ciclo do ácido cítrico e na mitocôndria, sendo que a conversão de malato a oxaloacetato é catalisada por esta enzima.

Enzimas envolvidas na via glicolítica, como a Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, observada neste trabalho pelo *spot* 86c, após tratamento com Greenforce CuCa, também atuam no sistema de defesa das plantas. Estudos verificaram um aumento dos níveis de metabólitos envolvidos na via glicolítica durante a interação incompatível entre *Phytophthora nicotianae* e *Nicotiana tabacum* (SCHARTE et al., 2005).

O aumento de enzimas relacionadas à resistência é uma excelente fonte de estudos proteômicos, visto que estas alteram o estado fisiológico da célula (KOLOMIETS et al. 2001). Proteínas relacionadas ao estresse têm sido as mais estudadas em café, principalmente em estudos proteômicos relacionados ao estresse hídrico (COSTA, 2014, MARRACCINI et al., 2012). No presente estudo, observou-se proteínas relacionadas ao estresse biótico e abiótico, que foram diferencialmente expressas, como as proteínas que correspondem aos *spots* 201b (Proteína estromática 70 kDa heat shock cloroplasto), 51c e 8b (Quitinases classe III).

As quitinases são proteínas envolvidas no sistema de defesa de vários organismos em resposta ao estresse biótico e abiótico (VAN LOON, et al., 1994; KWON et al., 2007). Neste trabalho foi identificado quitinase do tipo III em plantas tratadas com ASM e Greenforce CuCa, através do *spots* 8b e 51c, respectivamente. Em ambos os tratamentos foram observados aumento crescente da abundância desta enzima ao

longo do tempo. O *spot* 8 provavelmente se refere a uma isoforma, pois não corresponde ao ponto isoelétrico comum a quitinase (GERRA-GUIMARAES et al., 2009). Muitas proteínas sofrem modificações pós-traducionais como remoção de peptídeos sinais, fosforilação, glicosilação, e entre outros que são extremamente importantes para atividade e localização sub-celular (KRISHNA; WOLD, 1993; GARAVELLI *et al.*, 2001).

As quitinases podem ser requisitadas tanto para a morfogênese das paredes celulares como para a lise da quitina, quando há demanda de energia pela célula (GOODAY, 1977), o que explica o fato desta ser encontrada nas testemunhas, embora menos abundante que nos demais tratamentos. Em estudos de expressão de quitinases em condições normais pode também ser devido ao fato de que estas enzimas também estarem entre os genes mais expressos em café (LIN et al., 2005).

As quitinases são proteínas indicativas do estado de indução (SILVA et al., 2004), e para este trabalho o Greenforce CuCa foi o maior ativador do estado de indução quando se verifica os dados do perfil proteico. Estudos proteômicos evidenciam os níveis de inibição e de superexpressão dessas proteínas focalizando o monitoramento e a análise de suas propriedades e seus envolvimento em redes moleculares de sinalização e defesa de plantas contra estresses (MONTI et al., 2005).

É evidente que este estudo mostra uma condição parcial sobre o que acontece nas plantas sob uma determinada condição. Problemas na identificação de sequências em análises proteômicas estão relacionados a não produção de *scores* significativos, já que vários destes estão incompletos ou não foram estabelecidos nos bancos de dados (MEDINA

et al., 2005). *Scores* com baixo valor também não foram considerados por seus resultados não serem confiáveis.

Este trabalho evidencia a presença de proteínas relacionadas a defesa das plantas que se mostraram abundantes após tratamento com indutores de resistência. No entanto, muitos peptídeos não apresentaram homologia significativa nos bancos de dados pesquisados, ressaltando a necessidade de aperfeiçoar as técnicas empregadas e atualizar os dados para um maior conhecimento.

3 CONCLUSÃO

O tratamento com indutores de resistência altera o perfil proteico da maior parte das proteínas diferencialmente abundantes estão envolvidas em processos fisiológicos.

Foram encontradas proteínas relacionadas aos processos de defesa das plantas em resposta à estresse biótico e abiótico, como a Chitinase class III e a Stromal Protein heat shock;

ASM provocou aumento das proteínas Polypeptide photosystem II e Chitinase Class III, comparado com a testemunha enquanto, o Greenforce CuCa provocou aumento das proteínas GAPDH, Chitinase Class III, Malate dehydrogenase mitochondrial e Ribulose biphosphate carboxilase, comparado à testemunha.

ARTICLE 2 PROTEINS DIFFERENTIALLY EXPRESS IN COFFEE (*Coffea arabica* L.) AFTER TREATMENT WITH RESISTANCE INDUCERS

ABSTRACT

Proteomics has been increasingly applied to elucidate the mechanisms involved in the resistance induction of plants. Thus, this work aimed to analyze the differentially expressed proteins in *Coffea arabica* seedlings, cultivar Mundo Novo, after the application of the sub products-based formulation of coffee plantations (Greenforce CuCa), and acibenzolar-S-methyl (ASM), as these products provide control of major diseases of the coffee plantations and induce resistance., Coffee seedlings were sprayed with Greenforce CuCa, ASM and water (control) and the leaf material was collected 0, 24, 48 and 72 hours after the application of the products. The extraction of total proteins of the samples was performed and then taken to two-dimensional electrophoresis. The differentially expressed spots were excised from the gels and mass spectrometry performed for identification. After the analysis of the gels, 21 differentially expressed spots were found in the gels related to the Greeforce Cuca treatment and 17 spots in the gels related to the ASM treatments. In all these spots, 51% of the proteins showed a significant score, and of these, 47% correspond to treatment with ASM and 53% correspond to treatment with Greenforce CuCa. In the correlation of which biological process the identified proteins are part of, it was observed that 44% of the proteins are involved in the photosynthetic processes, 28% related to biotic stress, 11% related to the glycolytic pathway, 6% related to secondary metabolism, 6% related to transcriptional regulation and 5% to biotic stress. This proves that the Greenforce CuCa and ASM provide changes in coffee seedlings metabolism, inducing the differential expression of defense proteins.

Keywords: Proteomics. Resistance induction. Mass spectrometry. 2D gel.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, A. A. et al. Influência de safras agrícolas e tratamentos fungicidas no café cereja descascado e bóia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. Edição Especial, p. 1919-1925, 2009.
- AMARAL, D. R. et al. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 425-431, Nov./Dez. 2008.
- ASADA, K., The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601–639. 1999.
- BAZZO, B. R. et al. Gene Expression Analysis Suggests Temporal Differential Response to Aluminum in *Coffea arabica* Cultivars. **Tropical Plant Biology**, v. 6, p. 191-198, Feb. 2013.
- BELCHI-NAVARRO, S. et al. Induction of trans-resveratrol and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited suspension cultured cells of *Vitis vinifera* cv Monastrell. **Journal of Plant Physiology**, p. 258-264. October, 2013
- BINDSCHEDLER, L. V. et al. Peroxidase dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. **The Plant Journal**, v. 47, p. 851–863, 2006.
- CASTILLEJO, M. A. et al. Two-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis of the *Medicago truncatula*-rust (*Uromyces striatus*) interaction. **Annals of Applied Biology**, v. 157, p. 243-257, Apr. 2010.
- COSTA, T. S. **Análise do perfil transcriptômico e proteômico de raízes de diferentes clones de *Coffea canephora* em condições de**

déficit hídrico. 238p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal).
Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2014.

COSTA, B. H. G. et al. Suppression of Rust and Brown Eye Spot Diseases on Coffee by Phosphites and By-products of Coffee and Citrus Industries. **Journal of Phytopathology**, v. 162, p. 635-642, 2014.

DENOUE, F. et al. The coffee genomes provides insight into the convergent evolution caffeine biosynthesis. **Science**, v. 354, p. 1181-1184, sept, 2014

DEVOS, S. et al. A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events during *Plasmodiophora brassicae* infection on *Arabidopsis*. **Mol. Plant Microbe Interact**, v. 19, p. 1431–1443, 2006.

FRANCO, O. L. et al. Methodological evaluation of 2-DE to study root proteomics during nematode infection in cotton and coffee plants. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v.40, p. 152–163, 2010.

GARAVELLI, J. S. et al. The resid data of protein structure modifications and the NRL-3D sequence-structure database. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 199-201, 2001.

GALDEANO, D. et al. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.7, p. 686-692, 2010.

GIL-AGUSTI, M. T. et al. Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species. **Proteomics**, v. 5, p. 710-718, Feb. 2005.

GUERRA-GUIMARAES, L. et al., Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. **BIOLOGIA PLANTARUM**, vol 53 (4): pag.702-706, 2009.

GUYOT, R., et al. Microcollinearity in an ethylene receptor coding gene region of the *Coffea canephora* genome is extensively conserved with *Vitis vinifera* and other distant dicotyledonous sequenced genomes. **BMC Plant Biol**, v. 9, p. 22-36, 2009.

GUIMARÃES, P. T. G. et al. Cafeeiro. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VENEGA, V. H. A. (Ed.). **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª** aproximação. Viçosa, MG: CFSEMG, p. 289-302. 1999

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, Oct. 2009.

HAO, Y. et al. Proteomic analysis of *Cucumis sativus* cotyledons after glucohexase treatment as a part of ROS accumulation related resistance mechanism. *Proteome Science*. P.. 12-34, disponível em: <http://www.proteomesci.com/content/12/1/34>, 2014.

KOLOMIETS, M. V. et al. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. **Plant Cell**, v. 13, p. 613–626, 2001.

KOSHINO, L. L. et al. Comparative proteomical analysis of zygotic embryo and endosperm from *Coffea arabica* seeds, **Journal Agricultural Food Chemistry**, p. 10922 – 10926, 2008.

KRISHNA, R. G.; WOLD, F. Post-translational modification of proteins. *Adv. Enzymol relat areas molecular biology*, v. 67, p. 265-295, 1993.

KWON Y. R. et al. *Arabidopsis hot2* encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. **Plant Journal**, v. 49, p. 184-193, 2007

LIN, C. et al. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Applied Genetics**, v. 112, p. 114-130, 2005.

LIU, G. T. et al. Differential proteomic analysis of grapevine leaves by iTRAQ reveals responses to heat stress and subsequent recovery. **Plant Biology**, v. 14, p. 110. 2014.

LIVRAMENTO, K. G. **Proteômica comparativa da interação genótipo, ambiente e processamento de grãos de café arábica**. 2014. 97p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2014.

MARRACCINI, P. *et al.* Differentially expressed genes and proteins upon drought stress in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 4191-4212, 2012

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 1, p. 175-183, Jan. 2009.

MEDINA, M. L. et al. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Proteomics**, v. 5, p. 3153-3161, 2005.

MONTEIRO, A. C. A. **Indutores de resistência no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*): análises bioquímicas e moleculares**. 2014. 132 p. Tese (Doutorado em

Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, v. 49, p. 1594-1605, 2006.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, Sep. 2007.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**. v. 405, n. 6788, p.837-846, 2000.

PETTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H., Proteomics: the first decade and beyond. **Nature**, v. 33, p. 311-323, mar. 2003.

PÔSSA, K. F., **Abordagem proteômica de folhas da cultivar mundo novo (*Coffea arabica* L.) induzida para a resistência à ferrugem**, 2015, 140 P. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2015.

QUIRINO, B. F. et al. Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. **Phytochemistry**, v.71, p 351-362, aug 2010.

RAMAGLI, L.S. Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. **Methods in MolecularBiology**, v. 112, p. 99-103, 1999.

ROMERO, G. et al. Partial Resistance to Leaf Rust (*Hemileia Vastatrix*) in Coffee (*Coffea arabica* L.): Genetic Analysis and Molecular Characterization of Putative Candidate Genes. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, n. 4, p. 685-697, Apr. 2010.

SCHARTE, J., SCHÖN, H., WEIS, E. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. **Plant Cell Environmental**, v. 28, p. 1421-1435, 2005.

TAKAHASHI, A. et al. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. **Natural Academy Science**, v. 100, p. 11777–11782. 2003.

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis protéicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 47, p. 1511-1517, 2012.

YAN, S. P. et al. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. **Molecular Cell Proteomics**, v. 5, p. 484–496, 2006.

VAN LOON, L. C., et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 12, n. 3, p. 245-264, Sep. 1994.

VENTURA, J. A. et al. Diagnóstico e manejo das doenças do cafeeiro conilon. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. **Café conilon**. Vitória: Incaper, 2007. p. 451-498.

VIEIRA, L. G. E. et al. 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.

ANEXO A - Gel 2-DE corado com *Colloidal Coomassie Blue G-250*, representando proteínas diferencialmente expressa de folhas cafeeiro após o tratamento com indutores de resistência GreenForce CuCa ou ASM. Os números indicados na imagem correspondem aos *spots* das proteínas isoladas do gel e, subsequentemente identificadas (maiores detalhes, ver tabela 1)

