

**CYNTHIA DE MELO ROCHA**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS NA INTERAÇÃO COMPATÍVEL  
*Hemileia vastatrix* - CAFEIRO POR MEIO DE SEQUENCIAMENTO DE  
cDNAs**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R672i  
2010

Rocha, Cynthia de Melo, 1978-  
Identificação de genes expressos na interação compatível  
*Hermileia vastatrix* - cafeeiro por meio de sequenciamento  
de cDNAs / Cynthia de Melo Rocha. – Viçosa, MG, 2010.  
viii, 66f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 57-66.

1. Café - Resistência a *Hermileia vastatrix*. 2. Banco de  
genes de plantas. 3. Genética molecular. 4. Café - Genética.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

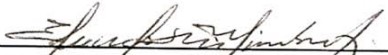
CDD 22.ed. 633.7394

CYNTHIA DE MELO ROCHA

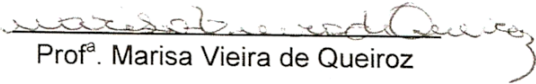
**IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS NA INTERAÇÃO COMPATÍVEL *Hemileia vastatrix* – CAFEEIRO POR MEIO DE SEQUENCIAMENTO DE cDNAs.**

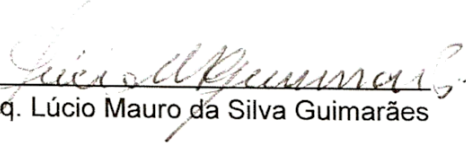
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

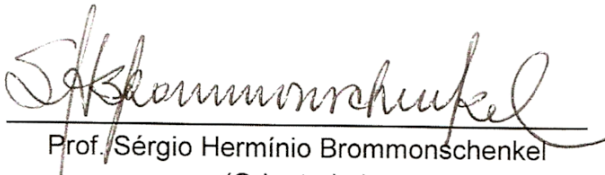
**APROVADA: 30 de março de 2010.**

  
Prof. Eduardo Setti Gomide Mizubuti  
(Co-Orientador)

  
Prof. Olinto Liparini Pereira  
(Co-Orientador)

  
Prof.ª Marisa Vieira de Queiroz

  
Peşq. Lúcio Mauro da Silva Guimarães

  
Prof. Sérgio Herminio Brommonschenkel  
(Orientador)

*A Deus, toda honra e toda glória*

*A Walnir Jr.*

*A Mariana*

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do programa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel pela orientação.

Aos professores Olinto Liparini Pereira, Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Marisa Vieira de Queiroz e ao pesquisador Lúcio Mauro da Silva Guimarães pelas críticas e sugestões.

Aos colegas de laboratório Jamile, Lívia, Sandra, Ricardo, Yukari, Poliene, Daniela, Gustavo pelos momentos de descontração e companheirismo, em especial para Michelle por toda a amizade e a disponibilidade de sempre ajudar.

Ao Tadeu e ao Luiz, pelo auxílio na execução desse trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 – OBTENÇÃO DO INÓCULO E MATERIAL INFECTADO PARA A CONSTRUÇÃO DA     BIBLIOTECA DE CDNA. ....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE CDNA. ....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 - SEQUENCIAMENTO DOS CDNAS E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....</b>	<b>15</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## RESUMO

ROCHA, Cynthia de Melo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Identificação de genes expressos na interação compatível *Hemileia vastatrix* - cafeeiro por meio de sequenciamento de cDNAs.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Olinto Liparini Pereira.

Mudanças no padrão de expressão de genes no patógeno e na planta hospedeira são fatores determinantes do fenótipo da interação planta-patógeno. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar genes do cafeeiro e de *Hemileia vastatrix* expressos em uma interação compatível por meio do sequenciamento de clones de uma biblioteca de cDNA de tecido infectado. A biblioteca de cDNA foi construída a partir de mRNA isolado de folhas do cafeeiro infectadas com *H. vastatrix* aos 25 dias após a inoculação. Foi efetuado o sequenciamento de passagem única de 8274 clones da biblioteca de cDNA da interação *C. arabica* e *H. vastatrix* e 6479 etiquetas de seqüências expressas (ESTs) foram obtidas. Dentre elas, 5091 (78,6%) seqüências representam genes de plantas depositadas no GenBank/NCBI e 562 (8,7%) seqüências representam genes de fungos e 826 (12,7%) representam genes ainda não caracterizados (e-value  $\leq 10^{-5}$ ). O alinhamento realizado com as 5091 seqüências que apresentaram similaridade com genes de plantas resultou em 1891 seqüências únicas, constituídas por 887 contíguos e 1004 singletos. A maioria dessas seqüências representa genes com função desconhecida. Dentre as seqüências com similaridade a genes que codificam proteínas com funções conhecidas, verificou-se maior número de genes que codificam proteínas ribossomais, seguido do grupo de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo primário e produção de energia, sendo

que 27 sequências apresentaram similaridade a genes que codificam proteínas relacionadas ao processo de defesa tais como os fatores de transcrição WRKY, proteínas cinases, fosfatases, metalotioneína, PRs, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanase, enzimas como fenilalanina-amônia liase, glutathiona S-transferase. Das 562 sequências que apresentaram similaridade a genes de fungos, 254 foram sequências únicas, representadas por 79 contíguos e 175 singletos. A maioria das sequências representou genes que codificam proteínas com função conhecida. O maior grupo dos genes com função conhecida codifica proteínas ribossomais, seguido do grupo de genes que codifica proteínas envolvidas no metabolismo primário e produção de energia, sendo que 13 sequências apresentaram similaridade a genes relacionados ao processo de infecção tais como PIG1, PIG4 e PIG8 (*Planta-induced genes*), RTP1 (*Rust transferred protein 1*), proteínas cinases e MRPs (*Multidrug resistance-associated protein 1 transporter*). Observa-se ainda que ESTs representando genes não caracterizados e não depositados somaram 52% do total. Esses genes podem incluir genes da planta e genes do fungo, neste caso possíveis efetores ainda não caracterizados. A construção da biblioteca de cDNA de tecidos infectados da interação cafeeiro – *H. vastatrix* foi eficiente para identificar possíveis genes da planta e do patógeno expressos nessa interação, porém estudos funcionais deverão ser realizados para confirmar e quantificar o papel de cada um desses genes na interação.



## ABSTRACT

ROCHA, Cynthia de Melo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2010. **Identification of genes expressed in the compatible interaction *Hemileia vastatrix* - coffee through sequencing of cDNAs.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Olinto Liparini Pereira.

Changes in the expression pattern of genes in the pathogen and host plant factors are determinates of the phenotype of plant-pathogen interaction. Thus, the objective was to identify and characterize genes and coffee *Hemileia vastatrix* expressed in a compatible interaction through the sequencing of clones from a cDNA library of infected tissue. The cDNA library was constructed from mRNA isolated from coffee leaves infected with *H. vastatrix* to 25 days after inoculation. We performed single pass sequencing of 8274 clones from the cDNA library of *H. vastatrix* and *Coffea arabica* interaction and 6479 expressed sequence tags (ESTs) were obtained. Among them, 5 091 (78.6%) sequences represent plant genes deposited in GenBank / NCBI and 562 (8.7%) sequences represent genes of fungi and 826 (12.7%) represent genes not yet characterized characterized ( $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ ). The alignment achieved with the 5091 sequences that showed similarity to plant genes resulted in 1891 unique sequences, comprised of 887 contiguous and 1004 singlets. Most of these sequences represent genes with unknown function. Among the sequences similar to genes that encode proteins with known functions, there was a larger number of genes that encode ribosomal proteins, followed by the group of genes that encode proteins involved in primary metabolism and energy production, and 27 sequences showed similarity to genes that encode proteins related to defense process such as WRKY transcription factors, protein kinases,

phosphatases, metallothionein, PRs, chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanase, enzymes such as phenylalanine ammonia-lyase, glutathione S-transferase. Of the 562 sequences that showed similarity to genes of fungi, 254 were unique sequences, represented by 79 and 175 contiguous singlets. Most sequences represented genes encoding proteins of known function. The biggest group of genes with known function encodes ribosomal protein, followed by the group of genes that encode proteins involved in primary metabolism and energy production, while 13 sequences showed similarity to genes related to the process of infection such as PIG1, and PIG4 PIG8 (plant-induced genes), RTP1 (Rust Transferred Protein 1), protein kinases and MRP (Multidrug resistance-associated protein 1 transporter). Elsewhere it is noted that ESTs representing genes not characterized and not deposited totaled 52% of the total. These genes may include plant genes and genes of the fungus, in this case possible effectors have not yet characterized. Construction of cDNA library from infected tissues of *H. vastatrix* - coffee interaction was effective for identifying potential genes of the plant and the pathogen expressed in this interaction, but functional studies should be conducted to confirm and quantify the role of each of these genes in interaction.

## 1. INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome pertencente à ordem Pucciniales e família Chaconiaceae. Trata-se de um parasita biotrófico que infecta apenas o cafeeiro. A ferrugem do cafeeiro se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de café no Brasil, podendo em condições favoráveis e na ausência de controle, causar perdas de 35 a 50% da produção, principalmente em *Coffea arabica* L., espécie mais cultivada (70% da produção) e também a mais suscetível a ferrugem (Zambolim *et al.*, 2005).

As principais estratégias de controle são a nutrição equilibrada das plantas, pulverizações com fungicidas protetores a base de cobre ou sistêmicos do grupo químico dos triazóis, isoladamente ou em misturas com estrobilurinas. Para *C. arabica*, o número recomendado de aplicações de fungicidas para controlar a ferrugem é de quatro a cinco aplicações do fungicida a base de cobre ou uma a três aplicações de fungicidas sistêmicos do grupo dos triazóis isoladamente ou em mistura com estrobilurinas. Utilizam-se também aplicações de triazóis via solo (Lopes *et al.*, 2009).

O uso de variedades resistentes é a medida de controle mais desejável, por ser de fácil adoção pelo produtor, além de diminuir o uso de agrotóxicos e custo de produção. Os genes de resistência provenientes de híbridos interespecíficos são normalmente incorporados via retrocruzamentos sucessivos em cultivares comerciais de *C. arabica*. O Híbrido de Timor proveniente do cruzamento entre *C. canephora* e *C. arabica* é a principal fonte de resistência utilizada em programas de melhoramento (Fazuoli, 2002). Porém, a obtenção de variedades resistentes à ferrugem tem sido difícil devido

à grande variabilidade do patógeno. São conhecidas mais de 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix*. A caracterização fisiológica das raças é baseada na utilização de um conjunto de 18 variedades diferenciadoras de café (Zambolim, *et al.*, 2005).

A resistência de plantas contra doenças está associada a um conjunto de respostas de defesa ativadas pelo hospedeiro após o contato com o patógeno. O conhecimento dos componentes genéticos e das mudanças transcricionais que ocorrem no patógeno e na planta hospedeira são chaves para o entendimento da interação. Plantas desenvolveram mecanismos para reconhecer e responder a moléculas particulares dos patógenos. Por outro lado, em patógenos biotróficos, como *H. vastatrix*, foram selecionadas estratégias para manipular o metabolismo, morfologia e desenvolvimento celular do hospedeiro, através da indução de um grupo essencial de genes para patogenicidade (Hogenhout *et al.*, 2009, Hahn & Menden, 2001, Menden & Hahn, 2002, Panstruga, 2003, Voegelé & Mendgen, 2003).

A ativação da resposta de defesa depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno por mecanismos de percepção e transdução de sinais, que envolvem alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas. Como consequência desse processo, ocorre ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal, com a expressão subsequente de genes de defesa (Hammond-Kosack & Jones, 1997, Hammond-Kosack & Parker, 2003, Bolton, 2009).

Em resposta à infecção por patógenos, as plantas desenvolveram duas linhas principais de defesa. A primeira linha que fornece a defesa basal contra vários patógenos é baseada no reconhecimento de moléculas conservadas do patógeno essenciais para o seu desenvolvimento (PAMPs – *Pathogen-associated molecular pattern*). Um dos PAMPs mais conhecidos e estudados é a quitina, o principal componente estrutural da parede celular dos fungos (Kaku *et al.*, 2006). Esse reconhecimento se dá por meio de receptores extracelulares altamente sensíveis e específicos presentes na membrana plasmática do hospedeiro (PRRs – *PAMP recognition receptors*), ativando a resposta de imunidade (PTI – *PAMP-triggered immunity*) impedindo, dessa forma, a

colonização do hospedeiro pelo patógeno. A indução do PTI também está associada com a sinalização de proteínas quinases, produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) e reforço da parede celular por meio da deposição de calose no sítio de infecção (Zipfel, *et al.* 2009; Postel & Kemmerling, 2009).

Muitos genes de avirulência (*Avr*) codificam proteínas efetoras capazes de suprimir PTI, permitindo que o patógeno infecte a planta hospedeira e cause doença (Boller & Yang He, 2009; Bolton, 2009; Chisholm *et al.*, 2006). Esses efetores são proteínas secretadas pelo patógeno que manipulam as funções celulares do hospedeiro (Van der Hoorn & Kamoun, 2008), promovendo a patogenicidade e mantendo o desenvolvimento do patógeno. Proteínas efetoras, tanto de fungo quanto de bactérias, podem possuir atividade enzimática sendo responsáveis por modificações nas proteínas do hospedeiro evitando assim reconhecimento pelo hospedeiro (Chisholm *et al.*, 2006). A principal função das proteínas efetoras é suprimir a via de transdução de sinais relacionada a respostas de defesa em plantas (Tyler, 2009).

As plantas desenvolveram uma segunda linha de defesa que se contrapõe a atuação dos efetores. Esta defesa é fundamentada no reconhecimento de efetores (proteínas AVR) por proteínas de resistência R e denominada de Imunidade Ativada por Efetores - ETI (*Effector-Triggered Immunity*). Este reconhecimento leva à rápida ativação das respostas de defesa nas plantas, incluindo a morte celular rápida no sítio de infecção (Reação de Hipersensibilidade ou HR). O patógeno por sua vez, durante o processo de coevolução é capaz de suplantar esse reconhecimento por meio de modificações como mutações, perdas de suas proteínas efetoras ou pelo desenvolvimento de novos efetores que suprimem a ETI (De Wit *et al.*, 2009; Boller & Yang He, 2009; Bolton, 2009; Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). Em resposta a essa corrida evolucionária entre patógeno e planta, há o desenvolvimento de novas proteínas R que por sua vez reconhecem novos efetores.

Os genes R que na grande maioria codificam proteínas contendo domínios de ligação a nucleotídeos ('Nucleotide binding', NB) e repetições ricas em leucina ('Leucine-rich repeat', LRR) (Dangl & Jones, 2001; Rathjen &

Moffett, 2003; Hammond-Kosack & Parker 2003) reconhecem direta ou indiretamente as proteínas Avr produzidas pelos fitopatógenos, ativando a resposta de defesa na planta e o confinamento do patógeno no sítio inicial de infecção. São poucos os exemplos de interação direta da proteína R e proteína AVR: a proteína de resistência *Pi-ta* de arroz com AvrPita de *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.*, 2000), RRS1 de *Arabidopsis thaliana* com PopP2 de *Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2003) e as proteínas L5, L6 e L7 de linho com a proteína Avr567 de *Melampsora lini* (Dodds *et al.*, 2006).

No reconhecimento indireto, as proteínas R aparentemente são capazes de monitorar a perturbação decorrente da interação da proteína AVR com seu alvo celular. Ao fazê-lo sofre uma mudança conformacional e desencadeia a resposta de resistência no hospedeiro (De Wit *et al.*, 2009; Jones & Dangl, 2006). Um exemplo clássico desse modelo é a interação indireta entre a proteína de avirulência Avr2 e a proteína de resistência Cf-2 no patossistema *Cladosporium fulvum* e tomateiro (Rooney *et al.*, 2005)

Quando genes R e Avr estão presentes na planta e no patógeno, respectivamente, o fenótipo da interação é resistência e a interação é dita incompatível. Quando este reconhecimento não é estabelecido, o resultado é suscetibilidade e a interação é dita compatível (Flor, 1971; Hammond-Kosack & Parker, 2003; Jones & Dangl, 2006). Reação de hipersensibilidade (HR) é a expressão mais comum da incompatibilidade na interação gene a gene, sendo uma forma de morte celular programada envolvida especificamente com a defesa contra o ataque de patógenos, sendo também associada a indução da resistência local e sistêmica (Kiraly *et al.* 2007). Dessa maneira, genes de defesa da planta contra diferentes patógenos que são associados com HR incluem aqueles envolvidos na biossíntese de fitoalexinas, produção de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) e deposição de lignina.

O modelo gene a gene de reconhecimento tem sido aplicado na interação cafeeiro e *H. vastatrix*, onde a resistência das plantas de cafeeiro é condicionada por no mínimo nove genes dominantes de efeito principal (S<sub>H</sub>1 – S<sub>H</sub>9). Seguindo o modelo gene a gene, tem-se inferido a existência de nove genes de avirulência (v1 – v9) em *H. vastatrix* (Silva *et al.*, 2006). Estudos citológicos demonstraram que para determinados genótipos de café (*Coffea*

spp.), a resistência a *H. vastatrix* envolve a indução da HR, visualizada 2 dias após a inoculação que resulta na morte de células guardas e subsidiárias do estômato, onde o fungo desenvolve o apressório e a hifa de penetração (Silva *et al.*, 2002). Várias respostas de defesa do cafeeiro estão associadas à HR, incluindo encapsulamento dos haustórios com calose e 1,4- $\beta$ -glucanos, deposição de compostos fenólicos, lignificação da parede celular da planta, acúmulo intercelular de polissacarídeos e fenóis bem como hipertrofia das células infectadas da planta. O aumento da atividade de enzimas oxidativas, como a lipoxigenase e peroxidase, de enzimas da via dos fenilpropanóides (fenilalanina amônia liase) e proteínas relacionadas com a patogênese ( $\beta$ -glucanases e quitinases) estão associados à expressão de resistência do cafeeiro (Silva *et al.*, 2002, Guzzo & Martins, 1996, Rojas *et al.*, 1993). O crescimento do fungo em plantas resistentes normalmente é interrompido geralmente antes da formação do primeiro haustório (Silva *et al.*, 2002).

Guerra-Guimarães *et al.* (2009), estudaram a histopatologia do desenvolvimento da ferrugem do café e acompanharam a expressão de isoformas de quitinases presentes no fluido intercelular de dois genótipos de café diferindo em somente um gene de resistência a *H. vastatrix*. Foi detectado o aumento da atividade de quitinases na interação incompatível associado com a restrição do crescimento do fungo. Esse aumento no nível de expressão coincide com a ocorrência de HR, sendo dessa forma sugerido que as quitinases fazem parte dessa resposta. Já na interação compatível o acúmulo foi menor e mais lento.

Fernandez *et al.* (2004), construíram bibliotecas subtrativas utilizando a técnica de hibridização subtrativa por supressão (SSH - *Subtractive Suppressive Hybridization*) com o objetivo de isolar genes do cafeeiro envolvidos na resistência à ferrugem, causada por *H. vastatrix*, nos primeiros estágios de HR. Neste estudo, períodos de 12, 24 e 48 horas após a infecção foram escolhidos como tempos apropriados para isolamento de RNA total que foi utilizado para construir as bibliotecas subtrativas. Foram anotadas 402 ESTs (Etiquetas de Sequências Expressas), sendo que no mínimo 13% representavam genes envolvidos na resposta de defesa e outros 13% nos processos de sinalização. Os ESTs similares a genes relacionados à resposta de defesa codificam

proteínas envolvidas na regulação da apoptose em células animais e também a várias vias oxidativas. Outros clones corresponderam a proteínas envolvidas em reações de defesa incluindo proteínas PR (quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, PR-10) e lipoxigenases.

O acúmulo de transcritos foi examinado durante as interações compatível e incompatível. Vários genes tiveram aumento do acúmulo de transcritos em cafeeiro inoculados com *H. vastatrix* (interação compatível e incompatível) quando comparadas com plantas não inoculadas. Dentre eles, alguns genes tiveram aumento no acúmulo de transcrito durante a reação incompatível (HR) quando comparado a reação compatível. Quatro desses genes foram similares a genes relacionados a componentes da via de sinalização envolvidas na resistência de plantas a doenças como o citocromo P450 envolvido na biossíntese de compostos relacionados com a resistência de *Arabidopsis* a *Alternaria brassicicola* (Zhou *et al.*, 1999), HPS70 componente essencial na via de transdução de sinal na resposta de defesa em *Nicotiana benthamiana* (Kanzaki *et al.*, 2003), DND1 (*Defense, no Death 1*) que é uma proteína envolvida na HR em *Pseudomonas syringae* (Clough *et al.*, 2000) e NDR1 (*non race-specific disease resistance protein*), componente chave na via sinalização de muitas proteínas de resistência do tipo CC-NBS-LRR (Century *et al.*, 1997). Finalmente, foram relatados outros quatro genes similares a genes que codificam proteínas relacionadas a mecanismos de defesa como quinases (Du & Chen, 2000, Morris & Walker, 2003), UDP-glicose: ácido salicílico glicosiltransferase e fatores de transcrição como os do tipo APS e WRKY envolvidos na resposta de planta a infecção por fitopatógenos (Dong *et al.*, 2003, Ülker & Somssich, 2004, Eulgem & Somssich, 2007).

Utilizando a mesma técnica de construção de biblioteca subtrativa por supressão (SSH), Guzzo *et al.* (2009) identificaram genes diferencialmente expressos em cafeeiro associados à resistência sistêmica adquirida (SAR – *Systemic Acquired Resistance*) e em uma interação incompatível entre o cafeeiro e o fungo *H. vastatrix*. Foram geradas duas bibliotecas de cDNA, uma enriquecida com sequências provenientes da interação incompatível entre um cultivar resistente de café inoculado com *H. vastatrix* e outra biblioteca



enriquecida com sequências provenientes de um cultivar de café suscetível a *H. vastatrix* respondendo ao tratamento com o indutor de resistência Acibenzolar-S-methyl (ASM) que, de acordo com Guzzo *et al.* (2004), induz resistência local e sistêmica e aumenta a atividade das enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases em tecidos foliares de cafeeiro suscetíveis a *H. vastatrix*. Neste trabalho, características comuns e diferenciadas foram identificadas entre plantas com resistência genética ou induzida. Análise de 384 clones de cada biblioteca de cDNA identificou genes envolvidos na HR, na síntese de proteínas antimicrobianas, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, tradução e percepção de sinais, metabolismo de lipídeos, degradação de proteínas, manutenção e desenvolvimento celular.

A maioria dos genes ativados no tratamento com ASM codificam proteínas antimicrobianas (22%) ou são relacionados à resposta de hipersensibilidade (18%) ao lado daqueles genes que são pressupostamente envolvidos no reconhecimento e transdução de sinais. Dentre eles estão proteínas PR (quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases) que têm a função de restringir o desenvolvimento do patógeno; cisteína proteinase, responsável pela regulação da morte celular programada em cultura de células de plantas tais como soja, *Arabidopsis* e tomate (Solomon *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2000); superóxido desmutases, responsável pela produção de  $H_2O_2$  que pode atuar como molécula sinal ou como composto antimicrobiano (Borden & Higgins, 2002) e enzimas oxidativas como catalases, glutathione S-transferases e peroxidases. Dos genes ativados na interação incompatível, 44% estão envolvidos na transdução e reconhecimento de sinais e 23% na síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos. Entre os genes isolados desta biblioteca estão aqueles que codificam lipoxigenases (LOX), genes pertencentes à família de proteínas induzida em resposta a hipersensibilidade (Xiao *et al.*, 2001), vários tipos de proteínas cinases incluindo MAP cinase e sequências que codificam proteínas antimicrobianas como  $\beta$ -1,3-glucanases.

Ganesh *et al.* (2006) avaliaram o nível de expressão de três genes candidatos na interação cafeeiro x *H. vastatrix*: *CaWRKY1*, que codifica um possível fator de transcrição da família WRKY, *CaR111* que codifica uma proteína de função ainda desconhecida e *CaNDR1*, gene homólogo a *NDR1*

em *Arabidopsis*. Para os três genes avaliados, o aumento do nível de mRNA foi observado nos primeiros estádios da infecção (12 a 20 horas pós inoculação – hpi) sendo a sua indução transitória. Diferenças estatísticas foram encontradas entre a interação compatível e incompatível para os genes *CaR111* e *CaWRKY1*. O gene *CaR111* foi induzido na interação incompatível entre 12 – 16 hpi, mas fracamente induzido na interação compatível. A ativação do gene *CaWRKY1* ocorreu nas duas interações, porém foi mais alta na incompatível (16 hpi) e ocorreu mais tardiamente na interação compatível (24 hpi). Para o gene *CaNDR1* uma fraca indução foi observada em 12 – 16 hpi em ambas as interações. Os três genes analisados retornaram ao seu nível basal em 24 hpi para *CaR111* e *CaNDR1*, e 48 hpi para *CaWRKY1*. Esse trabalho mostra que respostas transcricionais específicas do cafeeiro foram detectadas antes que a penetração do fungo ocorresse, já que nesse período as análises de microscopia revelaram somente um número limitado de estruturas diferenciadas de penetração através do estômato (Ganesh *et al.*, 2006).

Em diferentes interações planta – patógeno, a indução de peroxidases está associada à resistência em plantas pela produção de compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) bem como na lignificação da parede celular da planta (Nyochembeng *et al.*, 2007, Do *et al.*, 2003). Estudos citológicos e bioquímicos foram realizados por Silva *et al.* (2008) para investigar a associação de peroxidases na resistência de café a *H. vastatrix*. Cafeeiros com genótipos  $S_H5$  e  $S_H4S_H5$  foram inoculados com isolados de *H. vastatrix* raça II e VI com objetivo de estabelecer duas interações incompatíveis e uma compatível. Nas interações incompatíveis, ao contrário da interação compatível, verificou-se alta atividade de peroxidases no início da morte celular. Estudos citoquímicos puderam localizar peroxidases e  $H_2O_2$  na interface entre a cutícula e as estruturas de penetração do fungo, no sítio de penetração.

Patógenos biotróficos como *H. vastatrix* são dependentes de células vivas da planta para seu desenvolvimento e reprodução (Heath, 1997, Shulze-Lefert & Panstruga, 2003). O processo de infecção por *H. vastatrix* nos tecidos foliares do cafeeiro, inicia-se com a germinação dos urediniósporos dicarióticos depositados na superfície do hospedeiro, produção de um tubo germinativo e a

diferenciação dos apressórios sobre os estômatos. É a partir do apressório, que o fungo penetra no interior dos tecidos foliares (12 hpi), formando uma hifa de penetração, que cresce em direção à câmara subestomática e se ramifica, dando origem a uma estrutura semelhante a uma âncora denominada células-mãe do haustório (CMHs), da qual irradiam hifas para as células subsidiárias e as do mesofilo, onde se formam haustórios, dando início à fase biotrófica (essa formação inicia 36 hpi). Em cafeeiros suscetíveis, a colonização do mesofilo caracteriza-se por numerosas hifas intercelulares, com muitos haustórios, que acabam por originar soros urediniospóricos que saem através do estômato (Silva, *et al.*, 2006).

Estudo recente realizado por Ramiro *et al.* (2009), mostrou que *H. vastatrix* possui um padrão de desenvolvimento de estruturas de infecção único dentre as ferrugens que penetram via estômato. No tecido do hospedeiro, *H. vastatrix* raça II diferenciou haustório nas células subsidiárias do estômato e nas epidérmicas adjacentes nos primeiros estágios de infecção logo após a entrada no estômato e provavelmente antes de o fungo atingir a cavidade subestomática, sendo mais cedo do que é previsto anteriormente na literatura. Tais observações revelaram a presença do haustório dentro das células subsidiárias do estômato e adjacentes em sítios de infecção tanto em cultivares resistentes quanto em suscetíveis em 24 h após a inoculação (hpi).

Segundo os autores, depois da germinação do urediniosporo e do apressório, ocorre a diferenciação de uma hifa de infecção intercelular, denominada pelos autores de hifa primária (*Pioneer infection hypha*), a partir da qual é formada a célula mãe do haustório (CMH) que diferencia haustórios também denominados de haustórios primários (*pioneer haustoria*) dentro de células subsidiárias e adjacentes do estômato antes da penetração nas células do mesofilo. Quando a hifa de infecção alcança o mesofilo, há o desenvolvimento da estrutura típica semelhante a uma âncora dentro da câmara subestomática onde são formadas as CMH no qual são produzidos os haustórios secundários que invadem as células do mesofilo. Esses resultados sugerem que *H. vastatrix* estabelece a interação biotrófica com o hospedeiro dentro de poucas horas depois da inoculação (menos que 24 h), porém, o número reduzido de sítios de infecção com a presença do haustório primário e

da hifa de penetração indica que o desenvolvimento do fungo ocorre dentro das células do mesofilo.

Esses autores verificaram uma geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forte e transitória nos sítios de infecção da interação incompatível detectado 39 hpi, durante a formação do haustório secundário. Transcritos de genes PR como *CaPR1b* e *CaPR10* apresentaram o máximo de acúmulo a 39 hpi na interação incompatível, porém apresentaram baixos níveis na interação compatível. Desse modo, a diferença na expressão de genes de defesa entre interações compatíveis e incompatíveis foi observada somente durante a formação do haustório secundário sugerindo a ausência de reconhecimento específico do fungo pelo hospedeiro no estágio de formação do haustório primário. Assim, é sugerido que os componentes do haustório não são reconhecidos ou não são secretados dentro das células subsidiárias e adjacentes do estômato.

O haustório consiste em uma projeção da hifa altamente especializada, circundada por uma membrana plasmática e parede celular. O desenvolvimento do haustório ocorre sem que haja ruptura da membrana plasmática, não ocorrendo dessa maneira contato com o citoplasma do hospedeiro, resultando em danos estruturais mínimos, de tal forma que a célula invadida permanece completamente funcional e ativa. Com o crescimento do haustório, a membrana do hospedeiro se torna invaginada, formando a chamada membrana extra-haustorial circundando o haustório. Entre a membrana extra-haustorial e a parede celular do haustório é formada uma camada semelhante a um gel, enriquecida de carboidratos denominada matriz extra-haustorial (Catanzariti *et al.*, 2007; Panstruga, 2003; Voegelé & Mendgen, 2003; Mendgen & Hahn, 2002). A função principal do haustório está na aquisição de nutrientes do hospedeiro. Porém, há evidências que sugerem que essa estrutura está envolvida em mudanças do metabolismo e na supressão da defesa do hospedeiro e também como centro de uma comunicação celular permitindo uma troca de informação entre o hospedeiro e o patógeno para o estabelecimento e manutenção da fase biotrófica (Voegelé & Mendgen, 2003).

A construção de uma biblioteca de cDNA específica de haustório por Hahn & Mendgen (1997), fez possível a análise da função do haustório em termos moleculares. Recentemente, proteínas de avirulência (Avr) expressas

no haustório foram identificadas, sendo essas proteínas alvos de proteínas de resistência, componentes do sistema de defesa da planta. Todas essas proteínas são ativas dentro da célula do hospedeiro, levando a conclusão que esses patógenos podem transportar diretamente essas proteínas para dentro do citoplasma do hospedeiro durante o processo de infecção (Catanzariti *et al.*, 2007).

O primeiro gene Avr expresso no haustório clonado e caracterizado foi o *AvrL567* da ferrugem do linho *Melampsora lini* (Dodds *et al.*, 2004). Esse gene foi identificado mediante o uso de uma biblioteca subtrativa de cDNA enriquecida para genes expressos pela ferrugem durante a infecção. O gene *AvrL567* codifica uma proteína pequena que é secretada e expressa no haustório e a sua co-expressão com o gene de resistência do linho *L6* em folhas infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens*, induziu necrose nas células vegetais (HR). Dodds *et al.* (2006), demonstraram ainda que a proteína *AvrL567* interage diretamente com as proteínas de resistência *L5* e *L6* do linho.

Catanzariti *et al.* (2006), analisando genes Avr candidatos da ferrugem do linho, mediante a purificação de haustórios em plantas infectadas, identificaram 21 proteínas secretadas específicas do haustório. Esse trabalho resultou no isolamento dos genes *AvrM*, *AvrP123* e *AvrP4* expressos no haustório e que codificam pequenas proteínas secretadas. A proteína *Avr123* possui similaridade com inibidores de serinoproteases do tipo Kazal, sugerindo um possível papel dessa proteína na patogênese de *M. lini*, por meio da inibição de proteases do hospedeiro. A proteínas *AvrP4* e *AvrM* induziram a morte celular quando expressas intracelularmente, sugerindo que ocorre a translocação dessas proteínas durante a infecção para dentro das células vegetais que possuem os genes de resistência *P4* e *M*, respectivamente. Catanzariti *et al.* (2010) demonstraram que as proteínas *AvrM* e *M* interagem diretamente e que essa interação está correlacionada com um reconhecimento específico da planta. Foi também demonstrado que o domínio C-terminal do gene *AvrM* é necessário para a morte celular e interage fisicamente com o gene *M* em ensaios de duplo híbrido em leveduras.

A expressão de proteínas Avr em haustórios de ferrugens e juntamente a indução de HR com a formação do haustório sugere que este tem importante

função na transferência de proteínas efetoras para dentro das células infectadas. Essa hipótese foi confirmada por estudos de imunolocalização de proteínas secretadas pelo haustório de *Uromyces fabae*. Kemen *et al.* (2005), demonstraram que a proteína Uf-RTP1 (*Rust transferred protein 1*), específica de haustório de *U. fabae* é transferida para o hospedeiro durante o processo de infecção. Essa proteína foi detectada na matrix extra-haustorial e durante o processo de infecção, ocorreu seu acúmulo no citoplasma e no núcleo das células infectadas do hospedeiro. Isso condiz com a presença de um sinal de localização nuclear, sugerindo que essa proteína tem como alvo o núcleo do hospedeiro e pode influenciar a expressão de genes do hospedeiro durante o processo de infecção.

Como visto, foi documentado que proteínas efetoras muitas vezes realizam sua função dentro das células do hospedeiro. Em bactérias, a transferência de proteínas efetoras se dá por meio do sistema de secreção tipo III (Block *et al.*, 2008) enquanto efetores de nematóides entram na célula do hospedeiro via estilete (Davis *et al.*, 2008). O mecanismo de transferência das proteínas efetoras de fungos ainda é desconhecido, enquanto que em oomicetos recentemente houve a elucidação de uma sequência conservada em proteínas efetoras que tem como alvo as células do hospedeiro. Essas proteínas efetoras dividem um motivo N-terminal RXLR-EER conservado que é similar ao motivo RXLXE/Q presente em proteínas de *Plasmodium falciparum* (agente causal da malária) que são translocadas para dentro das células dos eritrócitos do hospedeiro. O motivo RXLR-EER parece funcionar como um sinal que media o tráfico de proteínas efetoras para dentro da célula do hospedeiro, talvez atuando mediante a translocação da proteína na membrana plasmática da planta ou estimulando a endocitose na interface haustório - célula do hospedeiro (Dodds *et al.*, 2009).

Genes R que codificam proteínas receptoras foram isolados de várias de plantas, e os genes Avr correspondentes também têm sido caracterizados. No entanto, poucos estudos são dirigidos para interação compatível. Até o momento, não foi efetuada análise detalhada dos genes de *H. vastatrix* expressos na interação com o cafeeiro, onde praticamente são inexistentes sequências de genes para essa espécie de fungo. Trabalhamos com a

hipótese de que nessa interação ocorre a expressão de genes de *H. vastatrix* responsivos ao processo de infecção e que as proteínas efetoras codificadas por esses genes são secretadas para dentro da célula do hospedeiro que por sua vez ativa a transcrição de genes de resposta de defesa de modo a impedir a infecção pelo patógeno.

Uma vez que descobertas recentes sugerem que os patógenos induzem respostas de defesa diferentes no hospedeiro e que isto pode refletir em uma resposta diferencial para os mecanismos empregados pelos patógenos, elucidar alguns eventos da interação cafeeiro x *H. vastatrix*, por meio de estudos dessa interação pode ser de grande importância para alcançar resistência durável da planta, bem como no desenvolvimento de estratégias de controle da doença.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi identificar genes do cafeeiro e de *H. vastatrix* expressos na interação compatível por meio do sequenciamento de clones de cDNA de biblioteca de cDNA do tecido infectado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Obtenção do inóculo e material infectado para a construção da biblioteca de cDNA.

O inóculo inicial foi obtido de cafeeiros variedade Catuaí vermelho 144 infectados naturalmente. Posteriormente, foi obtido um isolado monopustular HV-01 do fungo, a partir do isolamento de urediniósporos obtidos de uma única pústula e inoculados em uma planta de café. Este inóculo foi multiplicado por sucessivas coletas dos urediniósporos e inoculações até se obter quantidade suficiente de esporos para que o trabalho fosse realizado.

A espécie *Hemileia vastatrix* é parasita obrigatório e assim foram feitas inoculações periódicas em mudas de cafeeiro Catuaí vermelho 144 para manutenção do inóculo. Após esporulação, os urediniósporos foram coletados com o auxílio de um coletor de esporos acoplado a um compressor e armazenados em freezer -80 °C até que fossem utilizados, de maneira que não percam a viabilidade.

Com a finalidade de isolar genes envolvidos na resposta de defesa, mudas de cafeeiro foram inoculadas de acordo com Silva *et al.* (2002), no qual urediniósporos (aproximadamente 1 mg por folha) foram distribuídos na face abaxial do par de folhas mais novo com o crescimento já completo, em seguida aspergidas com água destilada e mantidas em câmara de nevoeiro, a 25°C, no escuro durante 48 h e posteriormente transferidas para câmara de crescimento a 22 °C. Folhas com sintomas de infecção e antes do início da esporulação (aproximadamente 25 dpi) foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e



armazenadas em ultrafreezer até o processamento de acordo com a metodologia para a construção da biblioteca de cDNA.

## **2.2. Construção da biblioteca de cDNA.**

A extração de RNA total foi conforme protocolo do kit Concert™ (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). A purificação do RNA mensageiro (mRNA) foi realizada a partir de 500 µg de RNA total utilizando o kit nucleotrap® Nucleic Acid Purification (Clontech, Palo Alto, CA, EUA). O mRNA foi liofilizado e ressuspendido em Tris-HCl 5mM, pH 7,5. A qualidade e quantidade das amostras de mRNA purificadas foram analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2% e em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm respectivamente.

A biblioteca de cDNA foi construída conforme instruções do SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, Palo Alto, CA, EUA) utilizando-se 5µg de mRNA.

Os cDNAs resultantes foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em *Escherichia coli* estirpe EC-100 (Epicentre, Madison, WI, EUA) por eletroporação. Os clones recombinantes foram selecionados em meio LB contendo clorofenicol (150 mg.mL<sup>-1</sup>), IPTG (100 mg.mL<sup>-1</sup>) e X-GAL (20 mg.mL<sup>-1</sup>) após incubação a 37°C por 16 h. Os clones foram então transferidos para placas de 96 cavidades contendo meio Freeze media (Budimann, 2000) e ampicilina (100 mg.mL<sup>-1</sup>), incubadas a 37°C por 16 h e estocados a -80°C.

## **2.3 - Sequenciamento dos cDNAs e análise das sequências obtidas**

A extração do DNA plasmidial foi realizada repicando-se as colônias para placas de microcultura contendo 1 mL de meio Circle Grow acrescido de 150 mg.mL<sup>-1</sup> de clorofenicol. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h a 280 rpm. Após esse período, as placas foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min e descartado o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em 240 mL de solução G.E.T pH 7,4 (EDTA pH 8,0 0,5 M, Tris-HCl 1 M, Glicose 20%) e

centrifugadas a 3000 rpm por 7 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 80 mL de solução G.E.T contendo RNase (150 mg.mL<sup>-1</sup>) e agitadas por 2 min. Uma alíquota de 60 mL da suspensão de células foi transferida para placas de polipropileno e adicionado a cada poço 80 mL de NaOH 0,2 N e SDS 1% (1:1), homogeneizadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, centrifugou-se as placas a 3700 rpm por 2 min, fez-se a adição de 80 mL de KOAc 3 M pH 4,8, homogeneizou-se por inversão e incubou-se no gelo por 10 min. As placas foram então mantidas em estufa a 90°C por 30 min, novamente no gelo por 10 min e centrifugadas a 3700 rpm por 9 min. Uma alíquota de 100 mL do sobrenadante foi filtrado em uma placa Millipore (MAGV N22) por meio de centrifugação (3000 rpm por 6 min). Por fim, foi adicionado 100 mL de isopropanol, homogeneizado por inversão e centrifugado a 3700 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com etanol 70% e ressuspendido em água milli-Q. A quantidade e qualidade do DNA extraído foram analisados em gel de agarose 1%.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Foram utilizados nestas reações 100 a 150 ng de DNA, 0,5 mM do oligonucleotídeo M13F, 2,0 mL de DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Pré-mix em volume final de 5 mL. As condições da PCR foram 95°C por 10 s, 50°C por 5 s e 60°C por 2 min repetidas 35 vezes. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando-se 27,5 mL de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 M. Após 10 min a temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 min a 3700 rpm. O DNA foi então lavado com 100 mL de etanol 70%, centrifugado a 3700 rpm por 10 min e deixado secar por 10 min. Após a precipitação, o DNA foi ressuspendido em 5 mL de Loading Buffer (GE Healthcare). A leitura das amostras foi realizada em sequenciador automático MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare).

A qualidade das sequências foi verificada através do pacote phred/phrap/consed ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)), instalado no Laboratório de Genômica – BIOAGRO-UFV. Após a remoção de sequências do vetor pelo programa *Cross\_match* ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)), as sequências obtidas foram alinhadas pelo

programa CAP3, que agrupou-as em contigs quando representadas mais de uma vez. Os contíguos e os singletos obtidos foram comparados a sequências depositadas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando os algoritmos BLASTx e BLASTn e ao *Puccinia graminis f. sp. tritici Genomic Database* (<http://www.broad.mit.edu>) utilizando o algoritmo BLASTx. A similaridade foi considerada significativa quando o valor esperado (*e-value*) for menor do que  $1e^{-5}$ .

Para definir as categorias funcionais dos possíveis genes encontrados, foram utilizadas as ferramentas disponíveis nos bancos de dados *Expert Protein Analysis System* (Expasy) (<http://bo.expasy.org/>) e InterPRO (<http://www2.ebi.ac.uk/interpro/>).

Como existem poucas sequências de genes e proteínas de fungos causadores de ferrugens depositadas em bancos de dados, foi efetuada a identificação de proteínas secretadas por meio da análise *in silico* dos contíguos de ESTs e sequências únicas. Essas sequências foram traduzidas nas seis possíveis sequências abertas de leitura ou ORFs (*open-reading-frame*) através do programa *ORF Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

A ORF mais longa, que se inicia preferencialmente com uma metionina, foi selecionada e analisada pelo programa SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Bendtsen *et al.*, 2004). Este programa combina dois métodos de predição de sinal de secreção, SignalP-NN (fundamentado em redes neurais) e SignalP-HMM (fundamentado em modelos ocultos de Markov – *Hidden Markov Models*). Uma sequência de peptídeo sinal será considerada presente quando for identificada pelos dois métodos. As ORFs que contenham essas sequências de peptídeo sinais foram também analisadas utilizando o programa de predição de topologia de membrana Phobius (<http://phobius.cbr.su.se/>), para identificar genes que codificam proteínas com domínio transmembrana.

### 3. RESULTADOS

Foram sequenciados 8274 clones da biblioteca de cDNA da interação *C. arabica* e *H. vastatrix* e 6479 sequências de qualidade foram obtidas. A análise das sequências com os algoritmos BLASTx e BLASTn resultou na identificação de cerca de 5091 (78,6%) sequências similares a genes de plantas depositadas no GenBank/NCBI, 562 (8,7%) sequências que representaram genes de fungos e 826 (12,7%) representam genes ainda não caracterizados (e-value  $\leq 10^{-5}$ ).

O alinhamento realizado pelo programa *Phred/phrap/consed* das 5091 sequências que apresentaram similaridade com genes de plantas resultou em 1891 sequências únicas, representadas por 887 contigs e 1004 singletos. A maioria dos contigs possuía 1, 2 e 3 ESTs (Figura 1). Todas as 1891 sequências únicas foram comparadas a sequências depositadas no NCBI utilizando o algoritmo BLASTx. Dessas sequências, aquelas que apresentaram similaridade significativa (e-value  $\leq 10^{-5}$ ) a genes que codificam proteínas com funções conhecidas, foram agrupadas de acordo com suas possíveis funções, sendo 178 (9,4%) similares a genes que codificam proteínas de funções conhecidas, 969 (51,2%) mostrou similaridade a genes que codificam possíveis proteínas cujas funções são ainda desconhecidas e 744 (39,3%) sequências não demonstraram similaridade a genes depositadas no banco de dados (Tabela 1). Dessa forma, a maioria das sequências representa genes com função desconhecida. O maior grupo dos genes com função conhecida codifica proteínas ribossomais, seguido do grupo de genes que codifica proteínas envolvidas no metabolismo primário e produção de energia (Figura 2), sendo

que 27 sequências apresentaram similaridade a genes relacionados ao processo de defesa (Tabela 1).

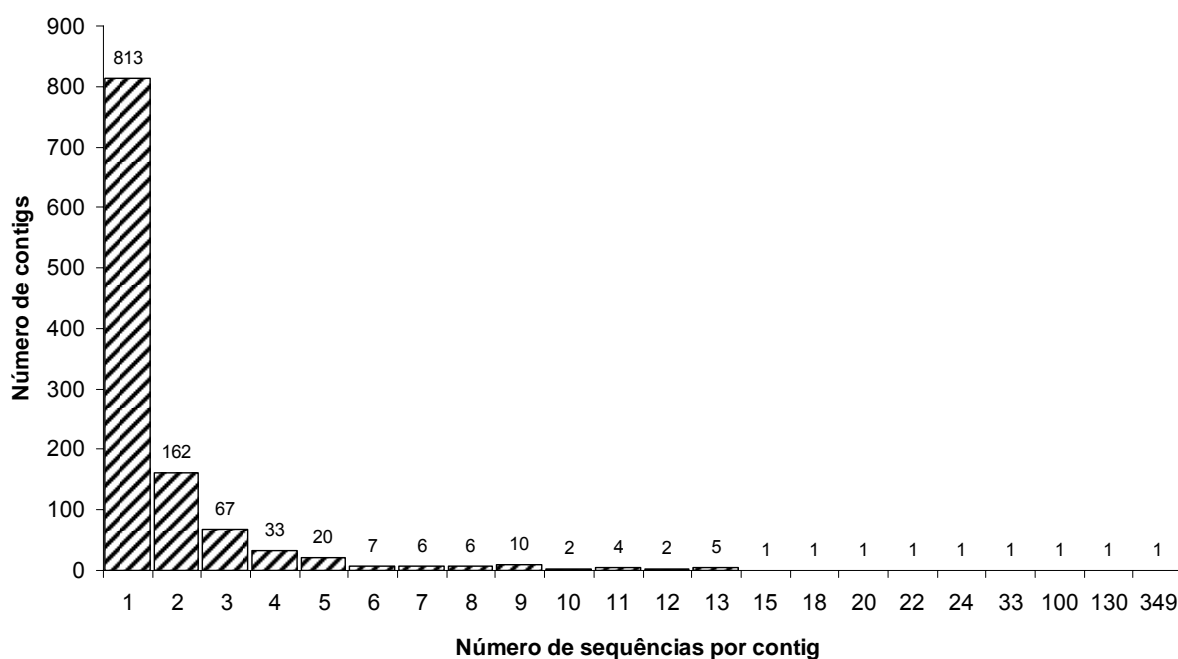


Figura 1. Distribuição da frequência de sequências de similaridade a sequências de plantas pertencente ao mesmo contig ou singleto.

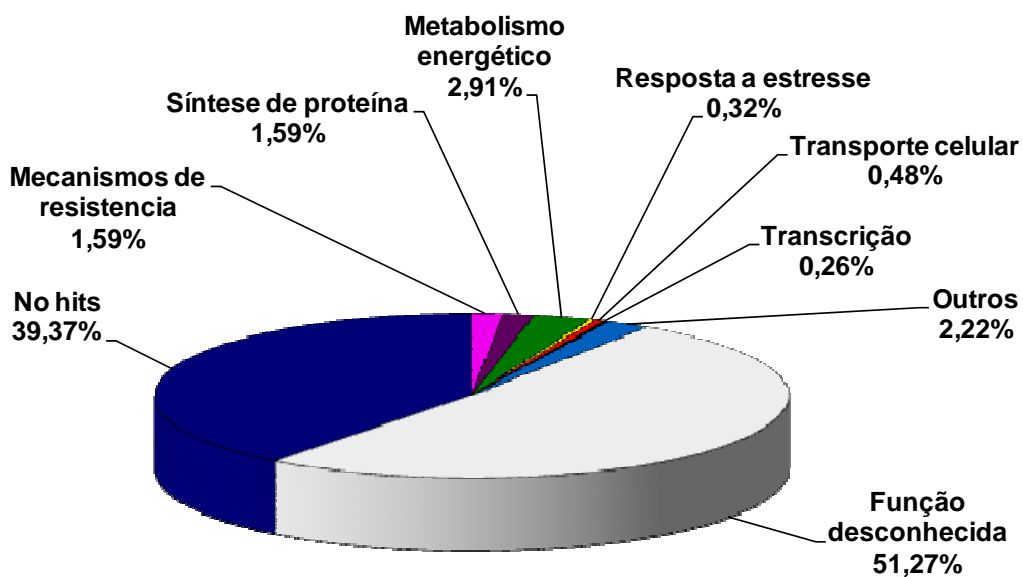


Figura 2. Classificação funcional das sequências únicas referentes a possíveis genes de *Coffea arabica*.

Dentre as sequências que representam genes relacionados ao processo de defesa, destacam-se aquelas que apresentam similaridade a genes que codificam fatores de transcrição do tipo WRKY1b de *C. arabica* (CAHV-CT-01, e-value:  $9 e^{-45}$ ), WRKY30 de *Capsicum annuum* (CAHV-CD-01-003-M13F-G11, e-value:  $9 e^{-29}$ ) e WRKY8 de *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* (CAHV-CD-02-042-M13F-D12, e-value:  $2 e^{-33}$ ).

Foram identificadas sequências que apresentam similaridade a genes que codificam proteínas cinases envolvidas na percepção e transdução de sinais como as proteínas MAPK3 de *Catharanthus roseus* (CAHV-CT-508, e-value:  $1 e^{-109}$ ), CDPK4 de *Capsicum annuum* (CAHV-CD-01-028-M13F-H04, e-value:  $6 e^{-62}$ ) e proteína como Serina/treonina cinase de *Ricinus communis* (CAHV-CD-01-008-M13F-E10, e-value:  $1 e^{-94}$ ). Juntamente com as proteínas cinases, as fosfatases também possuem importante função na via de transdução de sinais. Os clones CAHV-CD-01-029-M13F-C02, CAHV-CD-02-014-M13F-A07 e CAHV-CD-01-023-M13F-D05 apresentaram similaridade a genes que codificam as proteínas fosfatases 2A de *Lycopersicon esculentum* (e-value:  $3 e^{-94}$ ) e fosfatase 2A (e-value:  $1 e^{-46}$ ) e 2C (e-value:  $1 e^{-83}$ ) de *Ricinus communis*, respectivamente.

O clone CAHV-CD-01-009-M13F-C09 e o contig CAHV-CT-02 apresentam similaridade a genes que codificam lipoxigenases de *Nicotiana attenuata* (e-value:  $5 e^{-56}$ ) e *Corylus avellana* (e-value:  $6 e^{-53}$ ), respectivamente. Também se destaca o contig CAHV-CT-646 com similaridade a genes que codificam a enzima fenilalanina-amônia liase (PAL) de *Capsicum annuum* (e-value:  $1 e^{-133}$ ). Outra enzima representada por quatro sequências únicas CAHV-CD-02-003-M13F-D09, CAHV-CT-672, CAHV-CD-01-039-M13F-A12 e CAHV-CD-02-043-M13F-B11, foi a enzima glutatona S-transferase de *Catharanthus roseus* (e-value:  $5 e^{-28}$ ), *Panax ginseng* (e-value:  $3 e^{-19}$ ), *Malva pusila* (e-value:  $2 e^{-55}$ ) e *Ricinus communis* (e-value:  $4 e^{-85}$ ), respectivamente.

Foram encontradas sequências que apresentaram similaridade a genes que codificam proteínas PRs que são expressas nas plantas principalmente em resposta a infecção por patógenos. O clone CAHV-CD-02-005-M13F-C12 e os dois contigs CAHV-CT-311 e CAHV-CT-682 apresentam similaridade a genes que codificam as proteínas PR-1 de *Capsicum annuum*, PR-5 de *Coffea*

*arabica* e PR4-A de *Nicotiana tabacum*, respectivamente. O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução dos genes representados pelo clone CAHV-CD-02-005-M13F-C12 e pelo contigs CAHV-CT-311 e CAHV-CT-682 comparadas com a sequência de aminoácidos deduzidas das proteínas PR-1, PR-5 e PR4-A, respectivamente, é demonstrado na Figura 3. Por meio dessa análise, podemos inferir que o clone CAHV-CD-02-005-M13F-C12 e os contigs CAHV-CT-311 e CAHV-CT-682 representam as sequências parcialmente completas dos mRNAs das proteínas PR-1, PR-5 e PR4-A em *C. arabica*.

Os contigs CAHV-CT-03, CAHV-CT-04 e CAHV-CT-06 apresentam similaridade a genes que codificam quitinases de *C. arabica* (e-value:  $1 \times 10^{-39}$ ), *Nicotiana tabacum* (e-value:  $8 \times 10^{-44}$ ) e *Mormodica charantia* (e-value:  $5 \times 10^{-57}$ ), respectivamente. Dentre esses contigs, destacam-se CAHV-CT-03, CAHV-CT-04 por representarem sequências parcialmente completas dos mRNAs de quitinase de *C. arabica* e *N. tabacum* (Figura 4). Seguindo a mesma linha de sequências que apresentaram similaridade a proteínas com atividade antifúngica, o clone CAHV-CD-01-043-M13F-D02 apresentou similaridade ao gene que codifica a proteína  $\beta$ -1,3-glucanase ácida de *C. arabica*. Por último, o clone CAHV-CD-01-027-M13F-E04 apresentou similaridade em nível de proteína ao gene que codificam a proteína metalotioneína de *Mimulus guttatus* (e-value:  $8 \times 10^{-16}$ ) e também representa a sequência parcialmente completa do mRNA dessa proteína (Figura 5). Observa-se ainda que a presença de ESTs representando genes não caracterizados e não depositados somam 90,64% do total (Figura 2).

Já o alinhamento realizado pelo programa *Phred/phrap/consed* as 562 sequências que apresentaram similaridade a genes de fungos resultou em 254 sequências únicas, no qual 79 contigs e 175 singletos foram formados. A maioria dos contigs possui 1 e 2 ESTs (Figura 6).

```

a)
PR-1          MGHSNIA-LIVCFITFAIFHSTQAQNSPQDYLNAHNAARRQVGVGPMPTWD 49
CAHV-02-005-C12 MGSFKISSAIFCFVLLAMFWPSRAQNSQQDYLDVHNAARAQVNVSRIAWD 50
                **  *:  *.** :*: * .:**** ***: .***** **.* .:***

PR-1          NRLAAFAQNYANQRIGDCRMQHSGGPYGENLAAAFQQLNAAGAVKMWVNE 99
CAHV-02-005-C12 DRLAAYAKNYATQRMNDCQLMHSGGPYGENLACRLWRLHGGP----- 92
                :****:***:*.**.:*:*: ***** . :*:..*

PR-1          KQWYNYSNSCAPGKVCGHYTQVVWRNSVRLGCARVRCNNGWYFITCNYD 149
CAHV-02-005-C12 -----C-----RQSVR----- 98
                *           *:***

PR-1          PPGNWRGQRPYGDLEDQPAFDSKLELPTDV 179
CAHV-02-005-C12 -----

b)
PR-5          -----RGINNCPYTVWAAAVPGGGRRLD 23
CAHV-CT-311    MKTFNSFAFSTLLIAAFLSASAAHATFDIRNNCPYTVWAAAVPGGGQSLD 50
                *****: **

PR-5          RGQWTWINVAAGTAGARIWARTNCNFDGNGRGSCQTGDCGGVLQCTAYGR 73
CAHV-CT-311    NGQWTWTLNVAAGTTGGRVWGRTRNCNFDGSGHGSCQTGDCGGLLQCTAYGA 100
                .*****:*****:*.**.:*.*.*****.*:*****:*****

PR-5          PPNTLAEYALNQFNLDFFDISLVDGFNVPMDFSPYTSNGCTRGIRCTADI 123
CAHV-CT-311    PPNTLAEFALNQFNSLDFDISLVDGFNVPMDFSPYTSNGCTRGISCTADI 150
                *****:*****.*****:*****

PR-5          NGQCPSVLKAPGGCNPCTVFKTDQYCCNSGSCSATDYSRFFKTRCPDAY 173
CAHV-CT-311    NGQCPSSELKAPGGCNPCTVFKTDQYCCNSGSCSATDYSKFFNDRCPCDAY 200
                ***** *****:***: *****

PR-5          SYPQDDP 180
CAHV-CT-311    SYP---- 203
                ***

c)
PR4-A         MERVNNYKLCVALLIISMVMAMAAQSATNVRSTYHLYNPQNINWDLRAA 50
CAHV-CT-682   MERVP---LILCIVSFTLFVAVADSQSASNVRATYNLYNPQNINWDLNAA 47
                **** * :.: :.:*: * :*:***:*.*****.***

PR4-A         SAFCATWDADKPLAWRQKYGWTAFCGPAGPRGQVSCGRCLRVTNTGTGTQ 100
CAHV-CT-682   RVFCATWDANKPLSWRRQYGWTAFCGPAGPRQAACGRCLRVTNTATRAQ 97
                .*****:***:*.**.:*****:*****.* :*

PR4-A         TTVRIVDQCSNGGLDLVDNVFNQLDTNGVGYQQGHLTVNYEFVNCND 147
CAHV-CT-682   VVVRIVDQCSNGGLDLDIGPFRQIDTNGQGNANGFLTVNYEFVNC-- 142
                ..*****:*.**.:*** * :*.*****

```

Figura 3. Alinhamento pelo programa ClustalW2 das seqüências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução dos possíveis genes de *Coffea arabica* representados pelo clone CAHV-CD-02-005-M13F-C12 (a) e pelos contigs CAHV-CT-311 (b) e CAHV-CT-682 (c), quando comparadas com as seqüências de aminoácidos das proteínas PR-1, PR-5 e PR4-A, respectivamente que apresentaram similaridade de seqüência quando comparadas pelo algoritmo BlastX.



```

a)
C. arabica      MTACLRLPLFLAIISLLMISSLTRSSEGAGIAVYWGQNGNE-GSLEEACRS 49
CCAHV-03      MAASLQPLFSAITFLLLIASLIGPSEAAGIVQYWGRGHKEPSSLAEFCRQ 50
               *:.*:*** **  *:*:* * .**.*. *:*:. :* .** * **

C. arabica      GYYDYVNIAFLVSFGSGQTPELNLAGHCIPSPCTFLSSQIEVCQSLGIKV 99
CCAHV-03      EFATDVNIAFLEDFGSGHMPNELNIS-HPLPS-----ASDIESCQKHQTKV 94
               :  ***** .****: ****: * :**      :*:** **  **

C. arabica      LLSLGGGGAGAGRGPILASPEDARGVAAAYLWNNYLGGQSDSRPLGAAVLD 149
CCAHV-03      FISIAGQ-----PSLSSVEDAQEVAAYVWNTYLGGKSSDRPFKAVLD 137
               :*:.*      * *:* ***: ****:*.*.***:*.* **

C. arabica      GIDFDIEYGSNLYWDDLARALSGYSTAERKVYLSAAPQCFPPDYLDVAI 199
CCAHV-03      GVELHIHSGNTTYLDDLARALKGYP---NVILAVAAECPIDPALDTTI 183
               *:::.*. *.. * *****.*.      :* *:.*: * ** **:*

C. arabica      RTGLFDFVWVQFYNNPPCQYGTSTGNADNLLNSWSNDWAPHPGVNKLFLG 249
CCAHV-03      RTGVVDQVRVEFFDNPSCQFNPPK-DTSLLFRSWDN-WSDYPGVNKLKYL 231
               ***:.* * *:*:*:**.*:.... :. :*.**.* * :*****:**

C. arabica      LPAAPEAAPSGGYIPPEVLINQILPVVQSYPKYGGVMLWSRFY-DRNYSP 298
CCAHV-03      IPINPTIAPEGGYIPPNELVYQVLPYLKNSPVYGGIMVFPYLHHEVNFQS 281
               :* * **.******: * :*:** :. * **:*:.. : : *:.

C. arabica      AIRPYVNGDPLTYTTKSVKSHAVA 323
CCAHV-03      MLRSYARAA----- 290
               :*.*...

b)
N. tabacum      -----MMRFLVSLFCLFCLKYALAQDVGALVSKNLFERILLHRNDANC 44
CCAHV-04      LKEREKKMRFWAVVLCFSLVGVFAQDVSSIITKPLFEQMLKHRNDANC 50
               **** * * .:.* .:*****:::* ***:* *****

N. tabacum      PAKGFYTYEAFVTATRSFGAFGTTGDTNTRKKEIAAFLAQTSHETTGGWA 94
CCAHV-04      PAHGFYTYEAFIAAARSNGAFGTTGDITARKREIAAFLAQTSHETTGGWA 100
               **:******:*:** ***** .:***:*****

N. tabacum      TAPDGPYSWGFCFKQEQGSPPNYCVANQQWPCAPGKTYFGRGPIQISYNY 144
CCAHV-04      TAPDGPYAWGYCFKQEQGNPPDYCVANQQWPCAPGKYYGRGPIQISYNY 150
               *****:*****.*:*:*****.*:*:*****

N. tabacum      NYGPAGRAIGSDLLNPNLDVANDEPVVSKTALWFWMTPQQPK-PSAHDVI 193
CCAHV-04      NYGPAGRAIGSDLLNPNLDVATDPTTSFRLPFVWLDAPGQSLPGHDVM 200
               *****:*****.*.*.*: .:* . * : .***:

N. tabacum      TGRWTPSAADSAARRVPGFVITNIINGGIECNKGSNAQMQSRIGFYRRY 243
CCAHV-04      TGDGPRPKLIIAAGRPP-----RIR 220
               ** . . ** * * * * *

N. tabacum      CQILGVDPGNNLDCANQKPFQ 265
CCAHV-04      CSLPHL----- 226
               *.: :

```

Figura 4. Alinhamento pelo programa ClustalW2 das sequências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução dos possíveis genes de *Coffea arabica* representados pelos contigs CAHV-CT-03 (a) e CAHV-CT-04 (b), quando comparadas com as sequências de aminoácidos das proteínas quitinases de *C. arabica* e *N. tabacum*, respectivamente, que apresentaram similaridade de sequência quando comparadas pelo algoritmo BlastX.

Metalotioneína	MSSG--CSCGSGSKCGDNCSCSMYPDMETNTTVMIEGVAPLKMYS-EGS	47
CAHV-001-027-E04	MSCGGNCNCGSSCTCGNGCG-KMYADVEKVTSVTIIIEGVAPKKTYSDEYA	49
	**. * *.***...**:.*. **.*:*. *:***:***** * ** * :	
Metalotioneína	EKSFGAEGGNGCKCGSNCKCDPCNC	72
CAHV-001-027-E04	EKSFGAEGGHGCKCGANCKCDPCTC	74
	*****:*****:*****.*	

Figura 5. Alinhamento pelo programa ClustalW2 da sequência deduzida de aminoácidos do produto da tradução do possível gene de *Coffea arabica* representado pelo clone CAHV-CD-01-027-M13F-E04, quando comparado com as sequências de aminoácidos da proteína metalotioneína de *Mimulus guttatus*, onde apresentou similaridade de sequência quando comparadas pelo algoritmo BlastX.

Todas as 254 sequências únicas foram comparadas a sequências depositadas no NCBI utilizando o algoritmo BLASTx e ao *Puccinia group database* também utilizando o algoritmo BLASTx. Dessas sequências, aquelas que apresentaram similaridade significativa ( $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ ) a genes que codificam proteínas conhecidas, foram agrupadas de acordo com suas possíveis funções, onde 120 (47,2%) foram similares a genes que codificam proteínas de funções conhecidas, 43 (17%) foram similares a genes que codificam possíveis proteínas cujas funções são desconhecidas e 91 (35%) sequências não foram similares a sequências de genes depositados no banco de dados (Tabela 2). A maioria das sequências representou genes que codificam proteínas com função conhecida. O maior grupo dos genes com função conhecida demonstrou similaridade a proteínas ribossomais, seguido do grupo de genes com similaridade a proteínas envolvidas no metabolismo primário e produção de energia (Figura 7), sendo que 13 sequências apresentaram similaridade a genes relacionados ao processo de patogênese (Tabela 2).

Dentre as sequências que representam genes relacionados ao processo de patogênese, destacam-se aquelas que apresentam similaridade aos genes PIGs (*Planta-induced genes*) de *Uromyces fabae* que codificam proteínas induzidas especificamente em plantas. Os contigs CAHV-CT-27 e CAHV-CT-61 apresentaram similaridade a genes que codificam a proteína PIG8 (*Planta-induced rust protein 8*) de *U. fabae* ( $e\text{-value}: 1 e^{-108}$ ) e PIG1 (*Planta-induced*

*rust protein 1*) de *U. fabae* (e-value:  $1 \times 10^{-136}$ ), respectivamente e o clone CAHV-CD-01-011-A04 juntamente com o contig CAHV-CT-51 apresentaram similaridade de sequência com o gene que codifica a proteína *PIG4 (Planta-induced rust protein 4)* de *U. fabae* (e-value:  $8 \times 10^{-17}$ ,  $7 \times 10^{-85}$ ).

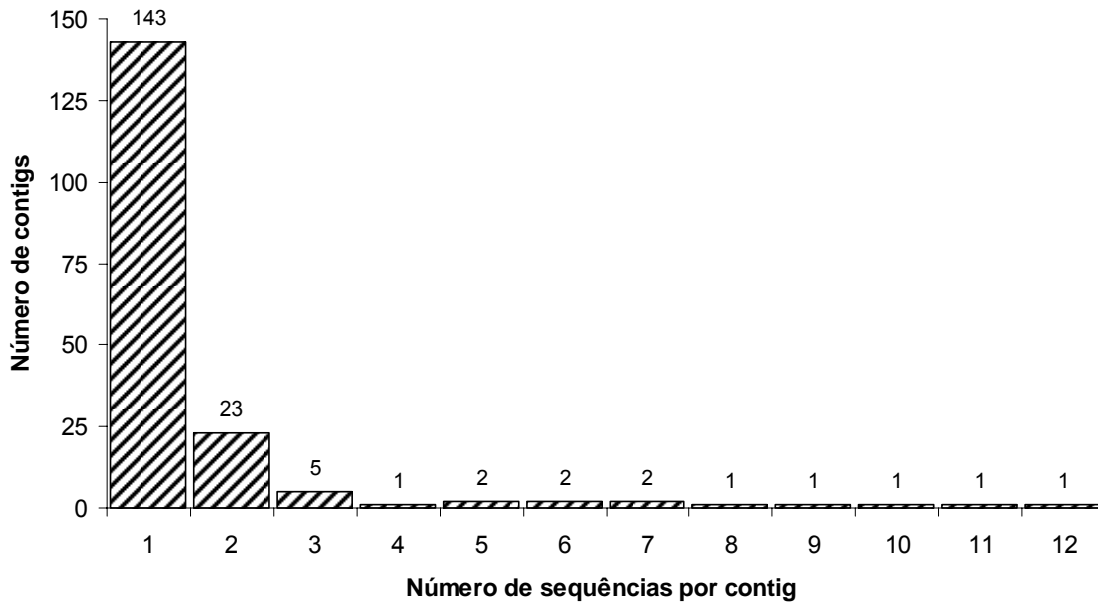


Figura 6. Frequência da distribuição de possíveis sequências de *Hemileia vastatrix* pertencente ao mesmo contig ou singleto.

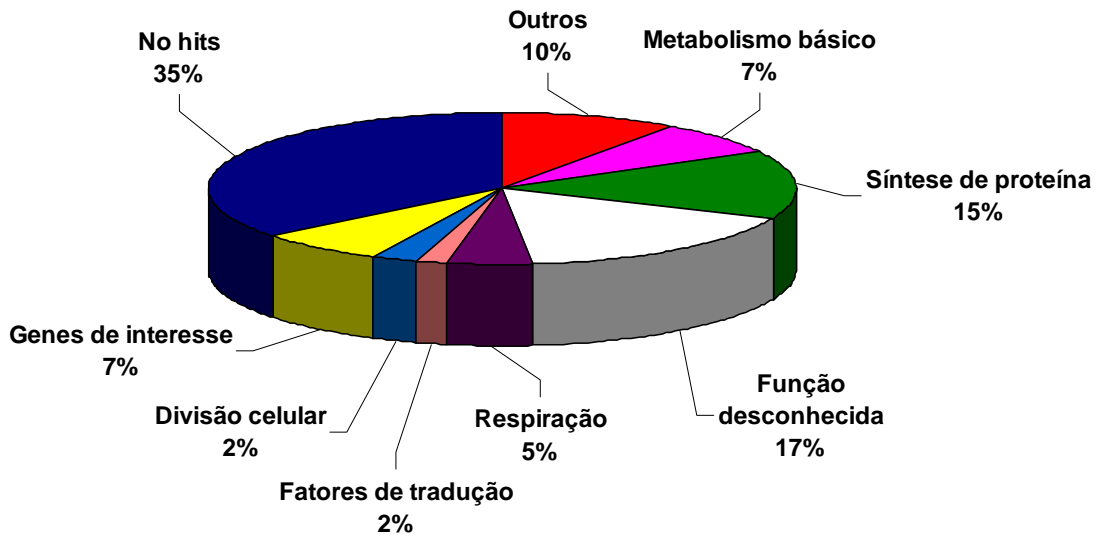


Figura 7. Classificação funcional das sequências únicas referentes a possíveis genes de *Hemileia vastatrix*.

O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução dos possíveis genes de *H. vastatrix* representados pelos contigs CAHV-CT-27 e CAHV-CT-61 quando comparadas com a sequência de aminoácidos deduzidas das proteínas PIG8 e PIG1, respectivamente, é demonstrado na Figura 8. Por meio dessa análise, podemos inferir que os contigs CAHV-CT-27 e CAHV-CT-61 representam a sequência completa e parcialmente completa dos mRNAs dos genes que codificam as proteínas PIG8 e PIG1, respectivamente, em *H. vastatrix*. O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do clone CAHV-CD-01-011-A04 e do contig CAHV-CT-51 quando comparadas a sequência de aminoácidos de PIG4 revela que CAHV-CT-51 representa o início da sequência de aminoácidos do gene PIG4 e CAHV-CD-01-011-A04 representa o final da sequência desse gene em *H. vastatrix* (Figura 9).

O contig CAHV-CT-84 apresentou similaridade ao gene que codifica proteína de *Melampsora occidentalis* caracterizada como proteína transferida por ferrugens (RTP1 - *rust transferred protein 1*). A análise da sequência de aminoácidos do contig CAHV-CT-84 quando comparado com a sequência de aminoácidos da proteína RTP1, demonstra que o contig CAHV-CT-84 representa a sequência parcialmente completa do mRNA da proteína RTP1 em *H. vastatrix* (Figura 10).

A análise dos contigs CAHV-CT-30, CAHV-CT-73 e CAHV-CT-82 demonstrou que eles apresentaram similaridade a genes que codificam proteínas cinases como MAPK1 de *Laccaria bicolor* (e-value:  $4 e^{-63}$ ), MAPKK de *Ustilago maydis* (e-value:  $2 e^{-22}$ ) e nucleosídeo difosfato cinase de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (e-value:  $5 e^{-55}$ ), respectivamente. Por último, o clone CAHV-CD-01-025-M13F-E09 destaca-se por apresentar similaridade ao gene que codifica a proteína de *P. graminis* denominada transportadores de membrana associada à resistência a drogas (MRPs - *multidrug resistance-associated protein 1 transporter*) (e-value:  $6 e^{-86}$ ).





```

CAHV-CT-84 MYRYYGFFLKFITLCFIFQAIQEEEDLGIIPDDTKFGEILKNAKLHTSSNLGNSKVVVNV 60
RTP1 -----VSVGGSKTAKGPIINMKTVOGNLKSEYKIGLNEMVT---VRIYE 40
          ... ..: * * .* *:: .: *: .. : * :

CAHV-CT-84 YESQQLVVKRDS-----KQNLPLMLDLTPSKCNSKGCYKFDATTPKFWTDCEVIEQAQFVS 115
RTP1 YKNDNFLVRREANVSATKSNLTTIDLTPADCDGAQCYPGXFDKPN-TTDCDAVWNAQLYN 99
          *:: .**::: *.. :***:..: * : .*: ***:: **: .

CAHV-CT-84 -NGSAVIDPGFIVTVSYGRCYIAFYN-FDSHYTISYNWATMGERARVLRKKCSITPVFSS 173
RTP1 STGSLTAFPGTFVYVFSGNCAVVFNPNQGYAIQFNWAKLGAVGVKIADKCLAPKTNSI 159
          .** . ** :* * *.* :.* * :. *::***:* . : .** . . *

CAHV-CT-84 GGVCFTNGKKM----- 185
RTP1 GGICQYTKYLTWTFNDVL 177
          **::*: .

```

Figura 10. Alinhamento pelo programa ClustalW2 das sequências deduzidas de aminoácidos do produto da tradução do contig CAHV-CT-84 quando comparada com a sequência de aminoácido da proteína RTP1 de *Uromyces fabae*, que apresentaram similaridade de sequência quando comparadas pelo algoritmo BlastX.

Tabela 1. ESTs identificados na biblioteca de cDNA da interação cafeeiro – *Hemileia vastatrix* que apresentam similaridades a sequências de plantas.

CONTIG / CLONE	ANOTAÇÃO DA FUNÇÃO	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO NCBI	VALOR e NCBI	SCORE (bits)	Nº ESTs
<b>MECANISMO DE RESISTÊNCIA</b>						
CAHV-CT-01	WRKY1b ( <i>Coffea arabica</i> )	Fator de transcrição específico de plantas	ABC86708.1	9E-45	183	2
CAHV-CD-01-003-M13F-G11	WRKY 30 ( <i>Capsicum annuum</i> )	Fator de transcrição específico de plantas	ACJ04728.1	9E-29	130	1
CAHV-CD-02-042-M13F-D12	WRKY 8 ( <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> )	Fator de transcrição específico de plantas	ABI13374	2E-33	50.8	1
CAHV-CD-02-005-M13F-C12	Proteína PR-1 ( <i>Capsicum annuum</i> )	Expressa na resposta de defesa e função na restrição do desenvolvimento e invasão do patógeno na planta - atividade antifúngica. Induzida em resposta de defesa mediada por etileno e jasmonato	AAC06244.2	2E-16	74.7	1
CAHV-CT-311	PR-5 - <i>pathogenesis-related thaumatin-like protein</i> ( <i>Coffea arabica</i> )	Expressa na resposta de defesa a patógenos - atividade antifúngica - destruição da membrana celular do patógeno	ABW76503	2E-95	352	2
CAHV-CT-682	PR4-A ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Similar a proteína antifúngica de ligação a quitina heveina. Expressa em resposta a fungos e etileno	CAA41437	3E-55	218	3
CAHV-CT-02	Lipoxigenase ( <i>Nicotiana attenuata</i> )	Envolvida em diversos aspectos da fisiologia vegetal, incluindo o crescimento e desenvolvimento, resistência a doenças, resposta a ferimentos e senescência	AAP83137.1	5E-56	178	2
CAHV-CD-01-009-M13F-C09	Lipoxygenase ( <i>Corylus avellana</i> )	Envolvida em diversos aspectos da fisiologia vegetal, incluindo o crescimento e desenvolvimento, resistência a doenças, resposta a ferimentos e senescência	CAD10740.1	6E-53	209	1
CAHV-CD-01-043-M13F-D02	Beta-1,3-glucanase ácida ( <i>Coffea arabica</i> )	Proteína antimicrobiana - inibição de crescimento fúngico	AAQ90287.1	4E-49	197	1

Continua...



Tabela 1. Continuação

CONTIG / CLONE	ANOTAÇÃO DA FUNÇÃO	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO NCBI	VALOR e NCBI	SCORE (bits)	Nº ESTs
CAHV-CD-01-001-M13F-F05	Cisteína proteinase ( <i>Jpomoea nil</i> )	Explosão oxidativa e apoptose	BAF46302.1	3E-38	162	1
CAHV-CD-02-016-M13F-G04	Cisteína proteinase ( <i>Carica papaya</i> )	Explosão oxidativa e apoptose	CAA27609.1	2E-26	122	1
CAHV-CT-03	Quitinase classe III ( <i>Coffea arabica</i> )	Proteína antimicrobiana - inibição de crescimento fúngico	CAJ43737.1	1E-39	168	100
CAHV-CT-04	Quitinase 134 ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	Proteína antimicrobiana - induzida em resposta a TMV e tratamento com ácido salicílico	BAA33971.1	8E-44	182	5
CAHV-CT-06	Quitinase ( <i>Momordica charantia</i> )	Proteína antimicrobiana - inibição de crescimento fúngico, sua superexpressão aumentou a resistência de <i>Nicotiana benthamiana</i> a <i>Phytophthora nicotianae</i> e algodão a <i>Verticilium wilt</i>	ABD66068.1	5E-57	223	3
CAHV-CD-01-027-M13F-E04	Metalotioneína ( <i>Mimulus guttatus</i> )	Expressão diferencial em resposta a estresse oxidativo, ferimentos e patógenos	CAA36249.1	8E-16	86.7	1
CAHV-CT-646	Possível Fenilalanina amônia-liase ( <i>Capsicum annuum</i> )	Síntese de flavonóides, fitoalexinas e compostos da parede celular	ACF17667	1E-133	478	3
CAHV-CT-711	Proteína antimicrobiana ( <i>Impatiens balsamina</i> )	Desempenha um papel de defesa contra microrganismos na germinação de sementes, por inibir o crescimento de fungos e bactérias	O24006.1	1E-22	111	4
CAHV-CT-508	Possível MAPK3 ( <i>Brassica napus</i> )	Transdução de sinal	AAV34677.1	4E-106	388	2
CAHV-CD-01-028-M13F-H04	Cálcio dependente proteína cinase 4 - CDPK 4 ( <i>Capsicum annuum</i> )	Transdução de sinal - Proteína de ligação ao cálcio, com atividade serina treonina cinase	AAX07129	6E-062	241	1
CAHV-CD-01-008-M13F-E10	Possível Serina/treonina cinase ( <i>Ricinus communis</i> )	Transdução de sinal - atividade serina treonina cinase	EEF38017	1E-94	350	1
CAHV-CD-02-003-M13F-D09	Glutathiona S-transferase ( <i>Catharanthus roseus</i> )	Enzima que possui expressão induzida na resposta a estresses incluindo fatores de crescimento, hormônios, herbicidas e ataque de patógenos	AAV84147	5E-028	129	1

Continua...

Tabela 1. Final

CONTIG / CLONE	ANOTAÇÃO DA FUNÇÃO	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO NCBI	VALOR e NCBI	SCORE (bits)	Nº ESTs
CAHV-CT-672	Glutaciona S-transferase ( <i>Panax ginseng</i> )	Enzima que possui expressão induzida na resposta a estresses incluindo fatores de crescimento, hormônios, herbicidas e infecção de patógenos	ACC93946	3E-019	99	3
CAHV-CD-01-039-M13F-A12	Glutaciona S-transferase ( <i>Malva pusilla</i> )	Enzima que possui expressão induzida na resposta a estresses incluindo fatores de crescimento, hormônios, herbicidas e infecção de patógenos	AAO61856	2E-055	219	1
CAHV-CD-02-043-M13F-B11	Possível glutaciona S-transferase ( <i>Ricinus communis</i> )	Enzima que possui expressão induzida na resposta a estresses incluindo fatores de crescimento, hormônios, herbicidas e infecção de patógenos	EEF52801	4E-085	318	1
CAHV-CD-01-029-M13F-C02	Proteína fosfatase 2A ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Possui expressão induzida em folhas de tomateiro inoculadas com a estirpe avirulenta de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	AAQ67226	3E-094	348	1
CAHV-CD-02-014-M13F-A07	Possível proteína fosfatase 2A ( <i>Ricinus communis</i> )	Função na via de sinalização em plantas	EEF47012	1E-046	190	1
CAHV-CD-01-023-M13F-D05	Possível proteína fosfatase 2C ( <i>Ricinus communis</i> )	Função na regulação do desenvolvimento da planta, na via de sinalização do ácido abscísico e na resposta a estresses abióticos como defesa a patógenos	EEF41036	1E-083	313	1

Tabela 2. ESTs identificados na biblioteca de cDNA da interação cafeeiro – *Hemileia vastatrix* que apresentam similaridades a sequências de fungos.

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
<b>GENES DE INTERESSE</b>								
CAHV-CT-62	Actina ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_05488.2	0.0	XP_762364	2E-59	231	3	
CAHV-CT-20	Actina ( <i>Puccinia graminis</i> )	PGTG_05488.2	0.0	P50138	1E-109	400	1	
CAHV-CT-27	Proteína induzida por ferrugem 8 - PIG8 ( <i>Planta-induced rust protein 8</i> ) ( <i>Uromyces viciae-fabae</i> )	PGTG_01366.2	0.0	AAB39878.1	1E-108	395	2	
CAHV-CT-61	Proteína induzida por ferrugem 1 - PIG1 ( <i>Planta-induced rust protein 1</i> ) ( <i>Uromyces viciae-fabae</i> )	PGTG_10151.2	0.0	AAB39877.1	1E-136	489	3	
CAHV-CD-01-011-A04	Proteína induzida por ferrugem 4 - PIG4 ( <i>Planta-induced rust protein 1</i> ) - THI2p ( <i>Thiazole biosynthetic enzyme</i> ) ( <i>Uromyces viciae-fabae</i> )	PGTG_01304.2	5E -18	CAB59856.1	8E-17	87.8	1	
CAHV-CT-51	Proteína induzida por ferrugem 4 - PIG4 ( <i>Planta-induced rust protein 1</i> ) - THI2p ( <i>Thiazole biosynthetic enzyme</i> ) ( <i>Uromyces viciae-fabae</i> )	PGTG_01304.2	0.0	Q9UVF8	7E-85	317	2	
CAHV-CT-30	Proteína cinase MAPK 1 ( <i>Mitogen-activated protein kinase 1</i> ) ( <i>Laccaria bicolor</i> )	PGTG_16812.2	0.0	XP_001877809.1	4E-63	245	2	
CAHV-CT-73	Proteína cinase MAPKK ( <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> ) ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_01624.2	0.0	XP_761011.1	2E-22	110	7	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CT-82	Proteína cinase ( <i>Nucleoside diphosphate kinase</i> ) ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_04663.2	0.0	XP_570963	5E-55	80.2	1	
CAHV-CD-01-025-M13F-E09	<i>Multidrug resistance-associated protein 1 transporter</i> ( <i>P. graminis tritici</i> )	PGTG_14456.2	0.0	AAC49797.1	6E-86	372	1	
CAHV-CD-01-004-M13F-F02	Proteína trealase ( <i>P. graminis tritici</i> )	PGTG_12486.2	7E -22	ABC59065.1	5E-08	53.9	1	
CAHV-CT-83	Proteína Rhizopuspepsin-1 ( <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> )	PGTG_15889.2	1E -20	XP_001934434	9E-13	77.0	10	
CAHV-CT-84	Proteína transferida por ferrugens ( <i>Rust transferred protein</i> ) ( <i>Melampsora occidentalis</i> )	PGTG_17520.2	1E -14	ABS86407.1	1E-12	53.9	2	
<b>METABOLISMO E DESENVOLVIMENTO</b>								
CAHV-CT-35	20S proteasome subunit ( <i>Laccaria bicolor</i> )	PGTG_13400.2	0.0	XP_001874146	3E-86	321	2	<b>SIM</b>
CAHV-CD-02-044-M13F-G12	2-methylcitrate dehidratase ( <i>Aspergillus flavus</i> )	PGTG_09115.2	1E -43	XP_001823050	1E-45	185	1	
CAHV-CD-02-009-M13F-F07	Proteína ribossomal 40S ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_05389.2	0.0	XP_572918	6E-85	173	1	
CAHV-CD-01-024-M13F-H01	Proteína ribossomal 40S ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_13907.2	0.0	XP_001838488	1E-36	157	1	
CAHV-CD-01-031-M13F-G03	Proteína ribossomal 40S ( <i>Aspergillus terreus</i> )	PGTG_07974.2	0.0	XP_001208887	1E-54	216	1	
CAHV-CD-01-043-M13F-F12	Proteína ribossomal 40S [ <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> ]	PGTG_09255.2	2E -11	XP_001830531	6E-25	117	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CT-63	Proteína ribossomal 40S ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_00124.2	0.0	XP_759384	3E-45	184	3	
CAHV-CD-01-001-M13F-A10	Proteína ribossomal 40S ( <i>Magnaporthe grisea</i> )	PGTG_20458.2	0.0	XP_368178.1	2E-64	249	1	
CAHV-CD-01-M13F-005-D02	Quitinase ( <i>Puccinia triticina</i> )	PGTG_05714.2	1E -25	AAP42832.1	2E-19	183	1	
CAHV-CD-01-009-M13F-F11	Proteína relacionada a choque térmico ( <i>heat shock protein</i> ) ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_01844.2	0.0	XP_567978	3E-32	141	1	
CAHV-CT-38	Proteína ribossomal 40S ( <i>Laccaria bicolor</i> )	PGTG_18190.2	0.0	XP_001874254	7E-37	157	2	
CAHV-CD-02-045-M13F-D07	Proteína ribossomal 60S ( <i>Melampsora medusae</i> f. sp. <i>deltoidis</i> )	PGTG_15249.2	5E -14	ABS86532	8E-06	54.3	1	
CAHV-CD-01-025-M13F-B04	Proteína ribossomal 60S ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_11217.2	0.0	XP_568507	2E-47	192	1	
CAHV-CD-01-031-M13F-D05	Proteína ribossomal 60S ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_07129.2	4E -40	XP_569294	5E-14	80.9	1	
CAHV-CD-01-009-M13F-F12	Proteína ribossomal 60S ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_01055.2	0.0	XP_567416	9E-74	279	1	
CAHV-CD-01-022-M13F-F10	Proteína ribossomal L14 60S ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	PGTG_10401.2	1E -40	XP_001551610	2E-22	109	1	
CAHV-CT-41	L15 Proteína ribossomal 60S ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_03952.2	0.0	XP_001828739	2E-60	235	2	
CAHV-CD-01-014-M13F-E06	Proteína ribossomal 60S ( <i>Neurospora crassa</i> )	PGTG_08841.2	2E -19	XP_957299.2	2E-15	91.3	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-02-045-M13F-F10	Proteína ribossomal 60S ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_10949.2	1E-37	XP_567335	3E-57	226	1	
CAHV-CD-01-023-M13F-A02	60S ribosomal protein L24 (L30) ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_15103.2	0.0	XP_571980	6E-31	137	1	
CAHV-CT-12	Proteína ribossomal 60S L36 ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> )	PGTG_00057.2	1E -34	XP_001586348	4E-20	100	1	
CAHV-CT-79	Proteína ribossomal 60S L36 ( <i>Trichoderma hamatum</i> )	PGTG_00057.2	2E -34	Q9HFR7	4E-19	99.4	18	
CAHV-CT-32	Proteína ribossomal 60S ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_17617.2	0.0	XP_566460	3E-62	242	2	
CAHV-CD-01-029-M13F-H09	Acetil-CoA acetiltransferase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_00588.2	2E -45	XP_759445.1	1E-43	179	1	
CAHV-CD-02-021-M13F-H07	Aconitate hidratase ( <i>Magnaporthe grisea</i> )	PGTG_18319.2	9E -36	XP_360978	9E-26	120	1	
CAHV-CT-33	Adenosilhomocisteinase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_06811.2	0.0	XP_570337	1E-139	282	2	
CAHV-CD-01-031-M13F-E11	Adenosilmetionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_14186.2	1E -41	XP_569073	9E-32	141	1	
CAHV-CD-02-003-M13F-D11	Adenilosuccinate sintetase ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )		1E-30	XP_001832853	8E-70	267	1	
CAHV-CD-01-001-M13F-G01	Alpha-tubulina 4 ( <i>Phytophthora capsici</i> )	PGTG_01773.2	1 e-21	ABP65323.1	4E-21	103	1	
CAHV-CD-01-017-M13F-G01	Arp2/3 complex, 34 kD subunidade ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_10704.2	0.0	XP_758984.1	3E-32	165	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-01-034-M13F-E11	ATP synthase delta (OSCP) subunidade ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_12123.2	1E -38	XP_762471.1	6E-28	160	1	
CAHV-CD-01-012-M13F-A02	ATP synthase subunidade 4, precursor mitocondrial ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> )	PGTG_15044.2	2E -43	XP_001597213	3E-31	138	1	
CAHV-CD-02-048-M13F-F02	Proteína transportadora ABC ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_08100.2	7E -45	XP_572661	2E-48	195	1	
CAHV-CD-01-011-M13F-F11	Proteína de ligação ao Ca <sup>2+</sup> ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_09250.2	0.0	XP_756667.1	3E-70	320	1	
CAHV-CT-72	Chaperona ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_02586.2	0.0	XP_568451	0.0	642	7	
CAHV-CD-01-019-M13F-B05	clathrin heavy chain 1 ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_04104.2	1E -22	XP_567407.1	8E-08	59.7	1	
CAHV-CT-07	Proteína COX1 Shy1 ( <i>Aspergillus clavatus</i> )	PGTG_19775.2	5E -8	XP_001270653	6E-04	47.0	1	
CAHV-CT-75	Proteína COX1 Shy1 ( <i>Aspergillus clavatus</i> )	PGTG_19775.2	1E -9	XP_001270653	1E-05	52.4	9	
CAHV-CD-01-022-M13F-A04	Proteína de ligação ao DNA CbpA ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_12957.2	3E -40	XP_759806.1	1E-31	176	1	
CAHV-CD-02-013-M13F-F05	Ciclohidrolase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_17488.2	5E -15	XP_566874	9E-20	101	1	
CAHV-CD-02-036-M13F-C03	Cistationina gamma-sintase ( <i>Neosartorya fischeri</i> )	PGTG_06587.2	3E -8	XP_001262794	4E-29	130	1	
CAHV-CD-01-002-M13F-C01	Complexo DASH subunidade Dad4 ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )			XP_001713149	7E-08	60.1	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-02-006-M13F-C10	Diidrolipoil deidrogenase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_07188.2	3E -22	XP_570114	2E-61	239	1	
CAHV-CD-02-050-M13F-H12	DNA supercoiling ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_08252.2	0.0	XP_570462	2E-41	172	1	
CAHV-CD-01-042-M13F-E09	Flavoproteína subunidade alpha ( <i>Neurospora crassa</i> )	PGTG_00212.2	3E -42	XP_962674	1E-43	179	1	
CAHV-CT-34	Fator de alongação 1-alpha ( <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> )	PGTG_14858.2	0.0	XP_001930631	5E-90	334	2	<b>SIM</b>
CAHV-CD-01-020-M13F-H06	Fator de alongação 1-beta ( <i>Neurospora crassa</i> )	PGTG_00332.2	8E -41	XP_959625	2E-35	151	1	
CAHV-CD-01-050-M13F-E12	Endopeptidase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_15776.2	0.0	XP_572050	2E-54	215	1	<b>SIM</b>
CAHV-CD-01-003-M13F-G03	Proteína do retículo endoplasmático ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_02426.2	6E -32	XP_759502	4E-21	103	1	
CAHV-CT-25	Enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase ( <i>Ustilago maydis</i> ))	PGTG_14903.2	0.0	XP_759503	5E-95	351	2	
CAHV-CD-01-030-M13F-A08	Esterases and lipases ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> )	PGTG_00491.2	2E -18	XP_001585413.1	1E-13	77.8	1	<b>SIM</b>
CAHV-CD-01-004-M13F-F05	Fator de início da tradução 3 de eucariotos subunidade G ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_18170.2	5E -18	XP_760099	3E-23	111	1	
CAHV-CD-01-050-M13F-D07	Domínio de ligação a celulose ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_04492.2	1E -16	XP_001831922.1	2E-09	120	1	
CAHV-CD-01-037-M13F-B06	Peroxidase ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_07312.2	2E -34	XP_001840251.1	2E-28	140	1	

Continua...



Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-02-023-M13F-F07	Proteína GAMM1 ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_00386.2	1E -41	XP_570168	3E-32	141	1	
CAHV-CD-01-022-M13F-H01	Complexo Gamma-tubulina componente 2 (gcp-2) ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_12437.2	3E -19	XP_566695	4E-22	107	1	
CAHV-CD-01-028-M13F-A04	Gluconato 5-deidrogenase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_16113.2	2E -27	XP_756255.1	2E-38	169	1	
CAHV-CD-01-029-M13F-C09	Gluconato 5-deidrogenase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_11020.2	9E -38	XP_758329	2E-37	159	1	
CAHV-CD-01-031-M13F-A09	glucose-repressible gene protein ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	PGTG_04720.2	1E -19	XP_001549859	3E-09	64.7	1	<b>SIM</b>
CAHV-CD-02-018-M13F-E12	Hexocinase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_18333.2	0.0	XP_572328	2E-87	325	1	
CAHV-CD-01-002-M13F-C07	Histona h2b ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_08915.2	3E-09	XP_569066	3E-07	57.8	1	
CAHV-CD-01-026-M13F-B12	Histona H3 ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_11296.2	0.0	XP_760063	2E-49	199	1	
CAHV-CT-21	Histona H4 ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_00392.2	1E -40	XP_001831685	4E-37	158	1	
CAHV-CD-02-035-M13F-G12	Hidrolase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_03034.2	9E-43	XP_569386	3E-39	165	1	
CAHV-CD-02-044-M13F-B01	Fator ribosilação ADP ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_09140.2	1E -43	XP_756801	8E-51	203	1	
CAHV-CD-02-027-M13F-E02	Proteína hipotética GDP-L-fucose sintetase (Red cell NADP(H)-binding protein) ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_18451.2	0.0	XP_001837895	5E-63	244	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CT-69	Proteína hipotética Histidine fosfatase domain ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_11120.2	0.0	XP_001835933	2E-68	258	6	
CAHV-CT-64	Proteína hipotética Nucleosidio difosfato cinase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_04663.2	0.0	XP_758923	6E-49	197	4	
CAHV-CD-02-026-M13F-F09	Proteína hipotética proteasome_beta_type_4 ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_18823.2	0.0	XP_762007	1E-62	243	1	
CAHV-CD-02-033-M13F-B05	Proteína hipotética proteasome_beta_type_6 ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_10450.2	0.0	XP_757422	3E-70	149	1	
CAHV-CD-02-021-M13F-F05	Proteína hipotética similar a subunidade vacuolar ATP sintase ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_05961.2	1E -13	XP_001828423	9E-36	99.8	1	
CAHV-CD-02-040-M13F-G05	Pirofosfatase inorgânica ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_09457.2	0.0	XP_762217	1E-102	374	1	
CAHV-CD-01-001-M13F-A09	Isocitrato liase ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_03604.2	0.0	BAD93181.1	8E-49	196	1	
CAHV-CD-01-031-M13F-A08	Isoprenilcisteina carboxil metiltransferase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_14598.2	0.0	XP_756164.1	2E-51	166	1	
CAHV-CT-56	Transportador de aminoácido ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_05678.2	1E -7	XP_568458	1E-11	73.2	3	
CAHV-CD-01-034-M13F-G04	Mediator de RNA polimerase II subunidade transcricional 7 ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_06387.2	1E -6	XP_761679	3E-11	72.4	1	
CAHV-CD-01-026-M13F-E12	Mitochondrial carrier protein ( <i>Magnaporthe grisea</i> )	PGTG_00669.2	3E-43	XP_365061.1	4E-24	110	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-01-040-M13F-F10	Proteína mitocondrial ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_17064.2	1E -7	XP_760309.1	4E-04	48.5	1	
CAHV-CT-1	Proteína mitocondrial ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_12228.2	0.0	XP_566648	2E-34	149	1	
CAHV-CT-23	Proteína mitocondrial ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_12228.2	0.0	XP_566648	3E-34	149	1	
CAHV-CD-01-002-M13F-F12	Complexo polipeptídeo-associado subunidade alpha ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_15207.2	2E-10	XP_761619	2E-07	58.9	1	
CAHV-CD-01-002-M13F-B09	Fator de interação fosfatase NLI ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_04379.2	1E-34	XP_760116.1	3E-31	137	1	
CAHV-CD-02-048-M13F-F07	Peptidil-prolil cis-trans isomerase 3 ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_17726.2	0.0	XP_758332	5E-64	247	1	
CAHV-CD-01-020-M13F-E08	Fosfoglucomutase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_06082.2	12E -30	XP_756633.1	1E-29	131	1	
CAHV-CD-01-037-M13F-G07	Fosfoglicerato cinase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_17029.2	0.0	XP_761018.1	4E-61	296	1	
CAHV-CD-02-024-M13F-F11	Fosfolipase D ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_12177.2	9E -34	XP_570753	1E-38	164	1	
CAHV-CD-02-018-M13F-C09	Fosfolipase D1 ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_12177.2	1E -43	XP_001822432	4E-35	150	1	
CAHV-CD-01-025-M13F-C06	Polyadenilato-Proteína de ligação – citoplasmática e nuclear ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_10266.2	8E -36	XP_759641	2E-24	115	1	
CAHV-CD-01-021-M13F-H01	Proteína cinase ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_00168.2	3E -20	XP_001819362.1	7E-08	66.2	1	
CAHV-CD-02-026-M13F-F07	Ribose-5-fosfate isomerase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_09493.2	0.0	XP_570436	4E-64	248	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCCHINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-02-009-M13F-F01	Proteína ribossomal S4/S9 ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_13172.2	0.0	XP_758486	2E-56	223	1	
CAHV-CT-60	Proteína ribossomal S5 ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_10206.2	0.0	XP_761286	6E-84	315	3	
CAHV-CT-29	Proteína ribossomal L13e ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_01572.2	0.0	XP_759071	3E-40	132	2	
CAHV-CT-52	Proteína ribossomal L16_L10e ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_02196.2	0.0	XP_759469	2E-96	356	2	
CAHV-CD-01-033-M13F-E01	Proteína ribossomal L23eN ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_00058.2	2E -45	XP_762145.1	2E-35	98.2	1	
CAHV-CD-02-017-M13F-C01	Proteína ribossomal L29_HIP ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_13362.2	1E -22	XP_001837167	5E-30	133	1	
CAHV-CD-01-038-M13F-B02	Proteína ribossomal L7Ae ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_08428.2	7E -35	XP_760975.1	1E-27	125	1	
CAHV-CT-26	Proteína ribossomal L7Ae ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_03322.2	0.0	XP_757465	5E-44	180	2	
CAHV-CT-40	Proteína ribossomal S19e( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_05794.2	0.0	XP_001835974	1E-55	220	2	
CAHV-CD-01-041-M13F-G08	Proteína ribossomal S26e ( <i>Phaeosphaeria nodorum</i> )	PGTG_18358.2	2E -43	XP_001802422.1	9E-35	147	1	
CAHV-CD-02-010-M13F-C03	Proteína ribossomal S8e ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_00820.2	0.0	XP_001830182	3E-55	217	1	
CAHV-CD-01-011-M13F-B03	Proteína RT ( <i>Venturia inaequalis</i> )			AAB95256	2E-15	85.5	1	
CAHV-CD-02-001-M13F-D06	Peptidase S26 ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_00223.2	9E -14	XP_001837730	1E-13	93.2	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-01-037-M13F-H07	Domínio de ligação a lipídeo Sec14p ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_13287.2	9E -18	XP_756645.1	3E-04	48.1	1	
CAHV-CD-01-008-M13F-D10	Flavoproteína ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_10555.2	5E -43	XP_001837426.1	8E-36	228	1	
CAHV-CD-02-004-M13F-H10	S-adenosilmetionina sintetase 2 ( <i>Pichia guilliermondii</i> )	PGTG_11729.2	7E -39	XP_001483920	1E-27	279	1	
CAHV-CD-02-017-M13F-H10	Sodium/calcium exchanger protein ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_04938.2	2E -42	XP_761972	2E-30	137	1	
CAHV-CD-01-005-M13F-B07	Superóxido dismutase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_04728.2	6E -42	XP_759232.1	7E-30	148	1	
CAHV-CD-02-045-M13F-H06	Proteína Tioesterase ( <i>Ralstonia metallidurans</i> )	PGTG_11255.2	4E -7	YP_583357	2E-13	68.6	1	
CAHV-CD-01-023-M13F-A03	Fator de tradução de elongação P ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_09986.2	8E -43	XP_758597	8E-32	139	1	
CAHV-CD-01-004-M13F-F02	Trealase ( <i>Nostoc punctiforme</i> )	PGTG_12486.2	7E -22	BAG70920	1E-05	53.9	1	
CAHV-CD-01-024-M13F-F09	Trealose-6-fosfato sintase ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	PGTG_06208.2	3E -35	ABL11219	2E-37	159	1	
CAHV-CD-01-018-M13F-F07	Domínio TRX, PICOT Interage com proteína cinase C ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_04367.2	1E -31	XP_760370.1	1E-23	150	1	
CAHV-CD-01-018-M13F-D04	Ubiquinol-citocromo C redutase ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_10719.2	1E -22	XP_757087.1	1E-11	72.0	1	
CAHV-CD-01-024-M13F-C07	Ubiquitina (E1) ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_07941.2	2E -9	XP_762335.1	4E-04	47.8	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-01-050-M13F-D01	Enzima Ubiquitina- E2 ( <i>C.neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_01748.2	3E -21	XP_566656.1	1E-17	92.4	1	
CAHV-CD-01-008-M13F-C02	UTP-glicose-1-fosfate ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_14905.2	0.0	XP_759044.1	4E-34	213	1	
CAHV-CD-02-014-M13F-G06	Chaperona Vtc1 ( <i>Aspergillus flavus</i> )	PGTG_15519.2	7E -20	XP_001727856	2E-33	146	1	
CAHV-CD-01-046-M13F-F02	Dienelactona hidrolase endo-1,3,1,4-beta-D-glucanase ( <i>Laccaria bicolor</i> )	PGTG_10083.2	2E -10	EDR12856.1	1E-05	<b>132</b>	1	
CAHV-CD-01-040-M13F-F10	Transportador de aminoácido arg-13	PGTG_17064.2	1E -7	XP_760309.1	4E-04	235	1	
CAHV-CD-02-009-M13F-D03	Lectina ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_12132.2	3E -43	XP_572915	1E-42	204	1	
CAHV-CD-01-041-M13F-C11	1-pyrrolina-5-carboxylato deidrogenase ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_14723.2	0.0	XP_572420	1E-81	306	1	<b>SIM</b>
<b>PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS</b>								
CAHV-CT-37	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus nidulans</i> )	PGTG_11503.2	0.0	XP_662117	1E-49	199	2	
CAHV-CD-02-043-M13F-H06	Proteína hipotética ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_15255.2	9E -17	XP_001833092	8E-18	94.7	1	
CAHV-CT-05	Proteína hipotética ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_00392.2	1E -40	XP_568101	4E-38	160	1	
CAHV-CD-01-020-M13F-H05	Proteína hipotética ( <i>Moniliophthora perniciosa</i> )	PGTG_09898.2	0.0	EEB92906	1E-18	117	1	
CAHV-CD-02-003-M13F-B02	Proteína hipotética ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_00660.2	3E -27	XP_775299	1E-62	244	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-01-028-M13F-D10	Proteína hipotética ( <i>Gibberella zeae</i> )	PGTG_05726.2	9E -10	XP_386109	3E-05	52.8	1	
CAHV-CT-10	Proteína hipotética ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> )	PGTG_18870.2	1E -21	XP_001592645	1E-08	62.4	1	
CAHV-CD-02-049-M13F-D05	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_10653.2	2E -27	XP_756320	9E-19	96.3	1	
CAHV-CD-02-033-M13F-A01	Proteína hipotética [ <i>Ustilago maydis</i> ]	PGTG_07112.2	0.0	XP_758494	8E-68	259	1	<b>SIM</b>
CAHV-CT-02	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_10312.2	1E -40	XP_758619	5E-47	191	1	<b>SIM</b>
CAHV-CD-01-031-M13F-D09	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_07098.2	0.0	XP_758499	1E-57	226	1	
CAHV-CT-42	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_18870.2	0.0	XP_001816889	2E-08	61.6	2	
CAHV-CT-13	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_18870.2	5E -21	XP_001816889	3E-08	61.2	1	
CAHV-CT-39	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_18870.2	1E -21	XP_001816889	2E-08	61.6	2	
CAHV-CT-04	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_18870.2	3E -20	XP_001816889	2E-07	58.9	1	
CAHV-CT-48	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_18870.2	1E -21	XP_001816889	2E-08	61.6	2	
CAHV-CT-49	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_18870.2	1E -21	XP_001816889	2E-08	61.6	2	
CAHV-CT-71	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_18870.2	1E -21	XP_001816889	2E-08	61.6	6	
CAHV-CT-78	Proteína hipotética ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	PGTG_18870.2	2E -21	XP_001816889	3E-08	61.6	16	
CAHV-CD-02-017-M13F-F02	Proteína hipotética ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	PGTG_14859.2	9E -15	XP_001547457	3E-09	64.7	1	
CAHV-CT-77	Proteína hipotética ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	PGTG_18870.2	1E -33	XP_001546914	3E-15	84.7	15	
CAHV-CD-02-004-M13F-D04	Proteína hipotética ( <i>Coprinospis cinerea okayama</i> )	PGTG_08311.2	5E -27	XP_001831804	3E-30	134	1	

Continua...

Tabela 2. Continuação

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCCHINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-01-022-M13F-C05	Proteína hipotética ( <i>Coprinosopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_19485.2	0.0	XP_001831835	6E-43	177	1	
CAHV-CD-01-041-M13F-B11	Proteína hipotética ( <i>Coprinosopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_04538.2	1E -20	XP_001837233	9E-18	93.6	1	
CAHV-CD-01-024-M13F-E02	Proteína hipotética ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_04397.2	1E -5	XP_570072	6E-10	67.4	1	
CAHV-CT-68	Proteína hipotética ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_00252.2	5E -13	XP_569977	1E-12	77.8	5	
CAHV-CD-02-007-M13F-A04	Proteína hipotética ( <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> )	PGTG_14720.2	6E -41	XP_570847	4E-61	238	1	
CAHV-CD-01-004-M13F-G03	Proteína hipotética ( <i>Magnaporthe grisea</i> )	PGTG_11634.2	0.0	XP_361467	3E-24	114	1	
CAHV-CD-01-009-M13F-A10	Proteína hipotética ( <i>Melampsora medusae</i> f. sp. <i>deltoidis</i> )	PGTG_16765.2	3E -15	ABS86355	2E-09	65.5	1	
CAHV-CT-67	Proteína hipotética ( <i>Neurospora crassa</i> )	PGTG_16113.2	0.0	XP_957532	1E-27	126	5	
CAHV-CD-02-027-M13F-D09	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_13148.2	0.0	XP_759365	1E-52	210	1	
CAHV-CD-02-033-M13F-C01	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_16694.2	0.0	XP_756488	5E-45	185	1	
CAHV-CD-02-033-M13F-D10	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_12890.2	0.0	XP_760987	2E-05	53.1	1	
CAHV-CD-01-026-M13F-B10	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_16395.2	1E -39	XP_762553	4E-25	118	1	
CAHV-CD-02-018-M13F-B01	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_04465.2	7E -22	XP_757152	2E-18	95.1	1	
CAHV-CT-36	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_15441.2	6E -18	XP_761979	1E-12	75.9	2	

Continua...



Tabela 2. Final

CONTIG / CLONE	PROVÁVEL FUNÇÃO	ACESSO PUCCINIA DATABASE	Valor e	ACESSO NCBI	Valor e	SCORE (bits)	Nº ESTs	PEPTIDEO SINAL
CAHV-CD-01-009-M13F-E03	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_13395.2	0.0	XP_757217	2E-84	315	1	
CAHV-CD-01-016-M13F-A11	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_01609.2	3E -32	XP_761045	2E-35	151	1	
CAHV-CD-01-017-M13F-B01	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_01373.2	9E -14	XP_756714	3E-13	77.8	1	
CAHV-CD-01-036-M13F-H07	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_18310.2	4E -9	XP_001593591.1	2E-09	60.1	1	
CAHV-CD-01-039-M13F-C03	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_13442.2	4E -24	XP_760059	3E-45	184	1	
CAHV-CT-9	Proteína hipotética <i>Ustilago maydis</i> ]	PGTG_15441.2	8E -18	XP_761979	2E-12	75.5	1	
CAHV-CD-01-044-M13F-C01	Proteína hipotética ( <i>Ustilago maydis</i> )	PGTG_06636.2	1E -14	XP_761634	6E-09	63.5	1	
CAHV-CD-01-010-M13F-B12	Proteína hipotética ( <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> )	PGTG_17495.2	1E -24	XP_001837868	8E-17	90.1	1	

## 4. DISCUSSÃO

Por meio do sequenciamento de clones de biblioteca de cDNA do tecido infectado foram identificados vários genes do cafeeiro e de *Hemileia vastatrix*. A maioria dos ESTs identificados com similaridade a genes de plantas apresentaram similaridade significativa a genes que codificam proteínas conhecidas como ribossomais, proteínas envolvidas no metabolismo primário e produção de energia.

Também foi verificado nessa biblioteca genes relacionado ao processo de defesa de plantas a fitopatógenos. Dentre eles, este trabalho identificou três ESTs (CAHV-CD-01-003-M13F-G11, CAHV-CD-02-042-M13F-D12 e CAHV-CT-01) similares a genes que codificam fatores de transcrição do tipo WRKY. A atividade transcricional dos genes em plantas é modulada por esses fatores de transcrição específicos que se ligam à região promotora de genes que serão transcritos. Estudos recentes evidenciam que os fatores de transcrição WRKY pertencem a uma família de genes específicos em plantas e que são rapidamente induzidos em resposta a infecção por patógenos, participando na ativação da resposta de defesa em plantas (Pandey & Somssich, 2009).

Em *Arabidopsis*, 49 dos 72 genes WRKY são ativados transitoriamente com a infecção de patógenos (Dong *et al.*, 2003). A expressão constitutiva dos genes *WRKY18* e *WRKY70* em plantas transgênicas de *Arabidopsis* aumentou a resistência a *Pseudomonas syringae* e *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Chen & Chen, 2002; Li *et al.*, 2004). Em salsa, estudos demonstraram que proteínas WRKY estão presentes no núcleo da célula e são rapidamente induzidas em resposta a elicitores derivados de patógenos (Turck *et al.*, 2004). O genoma de arroz contém mais de 100 genes *WRKY*, um exemplo é o gene

OsWRKY13 que aumenta a resistência à bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e ao fungo *M. griseae*, exercendo sua função na ativação da biossíntese de ácido salicílico, de genes responsivos ao ácido salicílico e na supressão na via de sinalização induzida por ácido jasmônico (Qiu *et al.*, 2007).

Os estudos de Ganesh *et al.* (2006) evidenciaram o papel dos fatores de transcrição WRKY na resistência de *C. arabica* a *H. vastatrix*. O gene *CaWRKY1* foi diferencialmente ativado em folhas de cafeeiros resistentes e suscetíveis inoculadas com *H. vastatrix*, com uma ativação mais rápida e de maior intensidade em plantas resistentes. Esta ativação coincidiu com a entrada do fungo no estômato da planta e precede a resposta de hipersensibilidade. *CaWRKY1* está relacionado com membros do grupo dos fatores de transcrição WRKY IIb de *Arabidopsis*, que inclui WRKY6 que está relacionado com a ativação da resposta de defesa a patógenos como *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis* e também atua como regulador positivo da expressão do gene PR-1 (Robatzek & Somssich, 2002). Petitot *et al.* (2009) identificaram cópias homólogas do gene *CaWRKY1* em *C. arabica*. Quando clonaram o gene *CaWRKY1*, duas cópias distintas desse gene (*CaWRKY1a* e *CaWRKY1b*) foram obtidas de *C. arabica*. Experimentos com *Southern blots* e análises filogenéticas demonstraram que *CaWRKY1a* e *CaWRKY1b* são sequências homólogas no genoma de cafeeiro. Análise de PCR em tempo real demonstrou que esses genes são expressos simultaneamente e possuem o mesmo nível de expressão em folhas quando inoculadas com o fungo *H. vastatrix*.

Entre os ESTs relacionados à resposta de defesa identificados também se destacaram os similares a genes que codificam as proteínas PRs que estão associadas com SAR em várias interações patógeno – hospedeiro e possui a função de prevenir ou limitar a invasão e o desenvolvimento do patógeno. A sua biossíntese e acúmulo são considerados o principal mecanismo de defesa das plantas contra fungos fitopatogênicos (Van Loon *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007). As proteínas PR-1 (CAHV-CD-02-005-M13F-C12) e PR-5 (CAHV-CT-311), sendo denominadas de permatinas;  $\beta$ -1,3-glucanases (também referidas como PR-2) (CAHV-CD-01-043-M13F-D02) e quitinases (CAHV-CT-03, CAHV-CT-04 e CAHV-CT-06), as quais têm ação sobre  $\beta$ -1,3-glucanos e quitina,

respectivamente, componentes da parede celular de vários fungos (Kasprzewska, 2003).

Quitinases, como outras proteínas PRs atuam atingindo níveis altos no apoplasto protegendo as plantas contra o crescimento extracelular de fungos, devido à capacidade de degradar a parede celular desses fitopatógenos, levando a inibição do seu crescimento. Muitas quitinases são induzidas em resposta à infecção de patógenos e algumas de suas isoformas exibem atividade antifúngica *in vitro*. Por essas razões, acredita-se que as quitinases realizam a principal função na defesa das plantas contra patógenos (Kasprzewska, 2003; Ferreira *et al.*, 2007).

Em cafeeiros variedade Mundo Novo protegidos contra *H. vastatrix* pelo tratamento com o indutor ASM foi observado um aumento na atividade enzimática de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases nos tecidos foliares (Guzzo *et al.*, 2004). Guzzo *et al.* (2009) detectaram essas enzimas em estudo utilizando uma biblioteca subtrativa tratada com ASM. O cDNA completo do gene  $\beta$ -1,3-glucanase foi clonado e sequenciado sendo o maior nível de expressão observado 72 horas depois do tratamento com o indutor. Silva *et al.* (1999) verificaram que a hifa intercelular de *H. vastatrix*, incluindo a célula mãe do haustório e haustório, contém  $\beta$ -1,3-glucanos e quitina em sua parede celular. A indução do acúmulo de proteínas antimicrobianas, tais como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, por ASM pode ter contribuído na restrição do desenvolvimento do patógeno em cafeeiro por meio da hidrólise das estruturas de infecção do patógeno.

Na maioria dos casos, uma variedade de proteínas PR pertencentes a diversas subclasses são induzidas, ao invés de um único membro de uma única família de proteínas PRs. Por isso, é comum que muitas proteínas PRs possuam sinergismo. Por exemplo,  $\beta$ -1,3-glucanases classe II é uma proteína extracelular e somente possui atividade antifúngica *in vitro* quando são aplicadas em combinação com quitinases ou com  $\beta$ -1,3-glucanases classe I (Theis & Stahl, 2004). Por essas razões, uma estratégia para o melhoramento genético está na expressão constitutiva em altos níveis da combinação de proteínas PRs com diferentes modos de ação contra organismos alvos podendo gerar resistência durável a uma variedade de doenças tais como a

ferrugem causada por *H. vastatrix*. Um bom exemplo são tomateiros transgênicos que quando expressaram somente quitinases ou  $\beta$ -1,3-glucanases foram suscetíveis a *Fusarium oxysporum*, porém plantas expressando os dois genes tiveram aumento significativo da resistência quando comparado a plantas expressando somente essas duas enzimas (Ferreira *et al.*, 2007).

Nessa biblioteca também foram observadas sequências com similaridade a genes que codificam lipoxigenases (CAHV-CT-02 e CAHV-CD-01-009-M13F-C09). As lipoxigenases são enzimas chaves envolvidas na geração de derivados de ácidos graxos no metabolismo de oxilipinas e a via das lipoxigenases é crucial para o processo de peroxidação durante a resposta de defesa das plantas contra fitopatógenos (Hwang & Hwang, 2010).

A via das lipoxigenases está associada à HR na interação patógeno – hospedeiro. Em algodão, o maior nível de expressão de lipoxigenases em plantas inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* foi associada com HR (Marmey *et al.*, 2007). Rojas *et al.* (1993) estudando a atividade das lipoxigenases em folhas cotiledonares de cafeeiro observaram aumento na atividade dessas enzimas em plantas infectadas com ferrugem (interação incompatível) e correlacionaram com o aumento na área de células apresentando típicos sinais de HR durante os primeiros nove dias da interação. Guzzo *et al.* (2009) observaram um aumento máximo na quantidade de transcrito de genes que codificam para lipoxigenases em folhas de cafeeiro resistentes a *H. vastatrix* 24 hpi com o patógeno.

O gene que codifica a enzima fenilalanina-amônia liase (PAL) foi representado nesta biblioteca pelo contig CAHV-CT-646. Essa enzima participa da rota dos fenilpropanóides no qual fitoalexinas, lignina e compostos fenólicos são sintetizados, sendo sua atividade induzida durante a interação planta – patógeno (Anand *et al.*, 2009). Estudos bioquímicos com genótipos resistentes de cafeeiro a *H. vastatrix* demonstraram aumento inicial da atividade de PAL anteriormente ou no início da observação da morte celular, no qual indica o envolvimento dessa enzima na HR. Um segundo aumento da atividade de PAL foi observado 4 a 5 dpi no qual pode estar relacionado com o acúmulo tardio de compostos fenólicos e com a lignificação da parede celular do hospedeiro

(Silva *et al.*, 2002). Em plantas de aveia inoculadas com o isolado incompatível de *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* ocorreu o acúmulo de PAL em 24 a 30 hpi antes da resposta de HR e da inibição do crescimento do fungo (Lin *et al.*, 1998). Em cevada, inibidores de PAL reduziram a resistência da planta à penetração por *Puccinia hordei* e adicionalmente ocorreu decréscimo de HR (Prats *et al.*, 2007).

A enzima glutationa S-transferase representada por quatro sequências únicas CAHV-CD-02-003-M13F-D09, CAHV-CT-672, CAHV-CD-01-039-M13F-A12 e CAHV-CD-02-043-M13F-B11 pertence a uma família de enzimas multifuncionais que possuem função na detoxificação e proteção de tecidos contra danos oxidativos. São enzimas importantes em plantas na resposta a estresses no ambiente, incluindo herbicidas e ataque de patógenos, sendo induzidas pela produção de ROS no processo de defesa (Chen *et al.*, 1996).

Além de genes que codificam proteínas com ação direta sobre o patógeno, foram identificados genes que codificam proteínas relacionadas com a percepção e transdução de sinais como as proteínas cinases (CAHV-CT-508, CAHV-CD-01-028-M13F-H04 e CAHV-CD-01-008-M13F-E10) e fosfatases (CAHV-CD-01-029-M13F-C02, CAHV-CD-02-014-M13F-A07 e CAHV-CD-01-023-M13F-D05). Recentes estudos demonstraram o envolvimento das fosfatases na interação planta-patógeno principalmente na regulação de proteínas cinases (Widjaja *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2009; Schweighofer *et al.*, 2007). As proteínas cinases, dentre outras funções, se caracterizam por ser um dos pontos de convergência da sinalização do sistema de defesa em plantas contra o ataque de patógenos. Estudos utilizando vários inibidores de proteínas cinases demonstraram o envolvimento de uma ou várias cinases na HR (Zhang & Klessig, 2001). A interação do produto dos genes R com proteínas AVR é seguida de uma explosão oxidativa resultando na produção de ROS e essa produção desencadeia a ativação da cascata de sinalização mediada pelas proteínas cinases (Mishra *et al.*, 2006).

Durante os últimos anos foi estabelecido que as proteínas cinases tem função central na defesa de várias plantas e na sinalização da resposta de defesa contra a infecção por *Phytophthora sojae*, *Phytophthora infestans*, *Pseudomonas syringae* (Mishra *et al.*, 2006). Jonak *et al.* (2002) observaram

que todo o evento de sinalização de defesa foi anulado em plantas de *Arabidopsis* tratadas com vários inibidores de cinases tais como K-252a, indicando a função essencial para as proteínas cinases na regulação da resposta inicial de defesa.

As metalotioneínas representadas por um único clone (CAHV-CD-01-027-M13F-E04) são proteínas cuja expressão é induzida em resposta a variações de fatores externos como concentração de metais pesados e vários fatores relacionados a estresses como ferimentos e fitopatógenos, sendo induzidas por vírus como TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) (Choi *et al.*, 1996) e fungos como *Sclerotinia sclerotiorum* (Sexton *et al.*, 2006) e *Magnaporthe grisea* (Tucker *et al.* 2004). Essas proteínas têm envolvimento na regulação da disponibilidade de íons metálicos que afetam a produção intracelular de espécies reativas a oxigênio (ROS) produzidas em plantas submetidas ao estresse. As plantas produzem ROS durante a interação com vários patógenos e essa produção está relacionada com a resistência a doenças e ao desenvolvimento de sintomas (Choi *et al.*, 1996).

A maioria dos cDNAs (51%) foi similar aos genes de plantas com função desconhecida e pode ser uma fonte adicional de genes que participam na manifestação de defesa do cafeeiro à infecção por *H. vastatrix*. O sequenciamento completo desses clones pode revelar a identidade de novos genes do cafeeiro relacionados à resistência a *H. vastatrix* devido à carência de estudos funcionais em cafeeiro.

A análise de ESTs é uma estratégia utilizada para identificar genes de vários fungos fitopatogênicos. Genes que são expressos na germinação dos esporos foram isolados de *P. graminis* (Liu *et al.*, 1993), *Erysiphe graminis* (Justesen *et al.*, 1996) e *Bremia lactucae* (Judelson & Michelmore, 1990). Análise de ESTs gerada pelo sequenciamento de cDNAs de biblioteca do tecido infectado foi aplicada para identificar genes de *M. grisea* envolvidos no processo de infecção em arroz (Kim, *et al.*, 2001). Bibliotecas de cDNA de uredosporos permitiram a análise de vários genes expressos por *P. striiformis* f. sp. *tritici* (Zhang *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2007) e *Phakopsora pachyrhizi* (Posada-Buitrago & Frederick, 2005). A disponibilidade do método de isolamento de haustórios de folhas infectadas (Hahn & Mendgen, 1992)

facilitou a construção de bibliotecas de cDNAs específicos de haustórios permitindo o isolamento de genes de fungos tais como *U. fabae* (Hahn & Mendgen, 1997), *Uromyces appendiculatus* (Puthoff *et al.*, 2008) e *P. striiformis* f. sp. *tritici* (Yin *et al.*, 2009).

No presente trabalho, o sequenciamento da biblioteca de cDNA da interação cafeeiro – *H. vastatrix* permitiu a identificação de genes de *H. vastatrix*. A maioria dos genes identificados demonstrou similaridade significativa com genes que codificam proteínas ribossomais, proteínas envolvidas no metabolismo primário e produção de energia. Também foi verificado nessa biblioteca genes que codificam proteínas relacionadas ao processo de infecção. Dentre essas proteínas, destacam-se as proteínas denominadas PIGs (*Planta-induced genes*) de *Uromyces fabae* que são induzidos especificamente em plantas. Hahn & Mendgen (1997) construíram uma biblioteca de cDNA de haustórios isolados de folhas infectadas com *U. fabae*. Análise dessas sequências revelaram uma alta proporção (19%) de cDNAs expressos especificamente em planta e não expressos ou poucos expressos na fase de germinação ou em estruturas de infecção produzidas *in vitro*. Um total de 31 genes induzidos em plantas (PIGs) foram identificados. Muitos desses PIGs são altamente expressos em haustório, sendo encontrados como cópia única ou em poucas cópias no genoma de *U. fabae*. Análises das sequências desses genes revelaram similaridades a genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de aminoácidos, biossíntese de tiaminas, metalotioninas e isomerases.

A proteína PIG8 (CAHV-CT-27) é uma NADP – deidrogenase dependente de manitol (*NADP – dependent mannitol dehidrogenase*) com alta similaridade de sequência com a família de enzimas denominadas deidrogenases de cadeia curta, sendo expressa somente em haustório e possuindo única cópia no genoma de *U. fabae*. PIG8 pode estar envolvida no metabolismo de substratos como sorbitol e glicose (Hahn & Mendgen, 1997). PIG1 (CAHV-CT-61) e PIG4 (CAHV-CD-01-011-A04 e CAHV-CT-51) são genes transcritos em grande quantidade em haustório, sendo homólogos a genes envolvidos na biossíntese de tiamina (vitamina B1) em leveduras. Juntos, os genes PIG1 e PIG4 representam 5% do mRNA expresso no



haustório. A tiamina é um cofator essencial para a atividade de várias enzimas do metabolismo primário de carboidratos tais como piruvato desidrogenases, piruvato carboxilases,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenases, etc. Isso sugere uma função adicional ao haustório na biossíntese de metabólitos fundamentais que não estão disponíveis em quantidades suficientes no hospedeiro (Sohn *et al.*, 2000; Panstruga, 2003).

Thara *et al.* (2003) em estudos utilizando biblioteca de SSH de folhas de trigo infectadas com *P. triticina* identificaram 26 genes que foram expressos preferencialmente em plantas. Dentre eles, três foram similares a *PIG1*, *PIG4* e *PIG28* de *U. fabae*. Utilizando a mesma técnica, porém estudando a interação trigo – *P. graminis* f. sp. *tritici*, Broeker *et al.* (2006) identificaram dois ESTs com similaridade a *PIG1* de *U. fabae*. Isso indica que em diferentes ferrugens, o modelo da expressão gênica é similar pelo menos em parte. O que torna necessário o estudo mais aprofundado da função e do nível de expressão dessas proteínas em *H. vastatrix* já que estudos demonstraram que elas são expressas especificamente em haustório no processo de infecção.

No presente trabalho, também foi destaque a proteína de *Melampsora occidentalis* caracterizada como proteína transferida por ferrugens (RTP1 - *rust transferred protein 1*) representada por um único EST (CAHV-CT-84). Essa proteína foi primeiramente caracterizada por Kemen *et al.* (2005) em estudos com *Uromyces fabae*. Esses autores relataram que RTP1 é expressa especificamente em haustório de *U. fabae* nas células do hospedeiro durante o processo de infecção e detectado na matriz extrahaustorial apresentando acúmulo no citoplasma e no núcleo das células infectadas do hospedeiro, sendo dessa maneira transferida para dentro da célula do hospedeiro durante o processo de infecção. A localização dessa proteína sugere que ela provavelmente possui função importante na manutenção da fase biotrófica da ferrugem.

Também foram identificados genes como aqueles que codificam para proteínas cinases. Vários estudos demonstraram o envolvimento de proteínas cinases na regulação do crescimento, no processo de diferenciação e na transdução de uma variedade de sinais extracelulares em fungos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea* e *Ustilago maydis* (Muller,

*et al.*,1999; Zheng *et al.*,2000; Xu, 2000; Caracuel-Rios & Talbot, 2007). Estudos funcionais das proteínas cinases nesses fungos demonstraram falha na formação do apressório, reduzida conidiogênese e virulência quando essas proteínas não desempenham a sua função. Além disso, esses trabalhos relataram a importância dessas proteínas para a patogênese desses fungos (Xu, 2000).

Verificou-se nesta biblioteca a presença de um gene relacionado a proteína MRP (*Multidrug-associated protein transporter 1*) que caracteriza por pertencer a família de transportadores ABC. Em *M. grisea* foi demonstrado que essa família é necessária para o crescimento do fungo e sua deleção reduz a patogenicidade a todos os hospedeiros testados e bloqueia os primeiros estádios da infecção. Essas proteínas também podem estar envolvidas na defesa contra toxinas antimicrobianas provenientes do hospedeiro (Urban, *et al.*, 1999). Logo, a obtenção das sequências completas dos genes que codificam tanto para proteínas cinases quanto para MRP de *H. vastatrix* e posterior estudo de sua expressão e função seriam de grande importância para a elucidação dessas proteínas no processo de infecção.

Concluindo, a técnica da construção da biblioteca de cDNA de tecidos infectados da interação cafeeiro – *H. vastatrix* foi eficiente para identificar genes do cafeeiro e de *H. vastatrix* expressos nessa interação. Todavia, para maior validação desses resultados, estudos funcionais deverão ser efetuados para confirmar e quantificar o papel dos genes identificados nas diferentes etapas do processo de patogênese.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, T., BHASKARAN, R., RAGUCHANDER, T., SAMIYAPPAN, R., PRAKASAM, V., GOPALAKRISHNAN, C. Defence responses of chilli fruits to *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata*. **Biologia Plantarum** 53(3): 553-559. 2009.

BENDTSEN, J.D., NIELSEN, H., VON HEIJNE, G., BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology** 340: 783-795. 2004.

BENT, A.F., MACKEY, D. Elicitors, effectors and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology** 45: 399-436. 2007.

BLOCK, A., LI, G., FU, Z.Q., ALFANO, J.R. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. **Current Opinion in Plant Biology** 11: 396-403. 2008.

BOLLER, T., YANG HE, SHENG. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science** 324: 742-744. 2009.

BOLTON, M.D. Primary metabolism and plant defense – fuel for the fire. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 22(5): 487 – 497. 2009.

BORDEN, S., HIGGINS, V.J. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defense response of tomato to *Cladosporium fulvum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 61: 227-236. 2002.

BROEKER, K., BERNARD, F., MOERSCHBACHER, B.M. An library from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* reveals genes potentially involved in fungal differentiation. **FEMS Microbiology Letters** (Federation of European Microbiological Societies) 256: 273-281. 2006.

CARACUEL-RIOS, Z., TALBOT, N.J. Cellular differentiation and host invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Current Opinion in Microbiology** 10: 339-345. 2007.

- CATANZARITI, A.M., DODDS, P.N., VE, T., KOBE, B., ELLIS, J.G., STASKAWICZ, B. J. The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. **Molecular Plant - Microbe Interactions** 23(1): 49–57. 2010.
- CATANZARITI, A.M., DODDS, P.N., ELLIS, J.G. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters** (Federation of European Microbiological Societies) 269: 181-188. 2007
- CATANZARITI, A.M., DODDS, P.N., LAWRENCE, G.J., AYLIFFE, M.A., ELLIS, J.G. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **Plant Cell** 18: 243-256. 2006.
- CENTURY K.S., SHAPIRO, A.D., REPETTI, P.P., DAHLBECK, D., HOLUB, E., STASKAWICZ, B.J. NDR1, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. **Science** 278: 1963-1965. 1997.
- CHEN, W., CHAO, G., SINGH, K.B. The promoter of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. **The Plant Journal** 10(6): 955-966. 1996.
- CHEN, C., CHEN, Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. **Plant Physiology** 129: 706-716. 2002.
- CHISHOLM, S.T., COAKER, G., DAY, B., STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **The Cell** 124: 803-814. 2006.
- CHOI, D., KIM, H.M., YUN, H.K., PARK, J-A., KIM, W.T., BOK, S.H. Molecular Cloning of a Metallothionein-Like gene from *Nicotiana glauca* L. and its induction by wounding and tobacco Mosaic Virus Infection. **Plant Physiology** 11 (2): 353-359. 1996.
- CLARKE, A., DESIKAN, R., HURST, R.D., HANCOCK, J.T., NEILL, S.J. No way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **The Plant Journal** 24: 667-677. 2000.
- CLOUGH, S.J., FENGLER, K.A., YU, I.C., LIPPOK, B., SMITH, R.K., BENT, A.F. The Arabidopsis dnd1 “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97: 9323-9328. 2000.
- DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature** 411(14): 826-833. 2001.
- DAVIS, E.L., HUSSEY, R.S., MITCHUM, M.G., BAUM, T.J. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 11: 360-366. 2008.

DE WIT, P.J.G.M., MEHRABI, R., VAN DER BURG, H.A., STERGIOPOULOS, I. Fungal effector proteins: past, present and future. **Molecular Plant Pathology** 10 (6): 735-747. 2009.

DESLANDES, L., OLIVIER, J., PEETERS, N., FENG, D.X., KHOUNLOTHAM, M., BOUCHER, C., SOMSSICH, I., GENIN, S., MARCO, Y. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100: 8024-8029. 2003.

DO, H.M., HONG, J.K., JUNG, H.W., KIM, S.H., HAM, J.H., HWANG, B.K. Expression of peroxidase-like genes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Capsicum annuum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 16: 196–205. 2003

DODDS, P.N., RAFIQI, M., GAN, P.H.P., HARDHAM, A.R., JONES, D.A., ELLIS, J.G. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. **New Phytologist** 183: 993-1000. 2009.

DODDS, P.N., LAWRENCE, G.J., CATANZARITI, A.M., TEH, T., WANG, C.A., AYLIFFE, M.A., KOBE, B., ELLIS, J.G. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103: 8888-8893. 2006.

DODDS, P.N., LAWRENCE, G.J., CATANZARITI, A.M., AYLIFFE, M.A., ELLIS, J.G. The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **Plant cell** 16: 755-768. 2004.

DONG, J., CHEN, C., CHEN, Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology** 51:21-37. 2003.

DU, L., CHEN, Z. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. **The Plant Journal** 24: 837-847. 2000.

EULGEM, T., SOMSSICH, I.E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. **Current Opinion in Plant Biology** 10: 366–371. 2007.

FAZUOLI, L.C., MEDINA-FILHO, H.P., GONÇALVES, W., GUERREIRO-FILHO, O., SILVAROLLA, M.B. Melhoramento do cafeeiro: Variedades do tipo arábica no Instituto Agronômico de Campinas. In: ZAMBOLIM, L., (Eds). O Estado de Arte de Tecnologias na Produção de Café. Viçosa: UFV. 2002. 163 – 215.

FERNANDEZ, D., SANTOS, P., AGOSTINI, C., BON, M-C., PETITOT, A-S., SILVA, M.C., GUERRA-GUIMARÃES, L., RIBEIRO, A., ARGOUT, X., NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology** 5(6): 527-536. 2004.

FERREIRA, R.B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C.N., CHEN, Z., BATISTA, L.M., DUARTE, J., BORGES, A., TEIXEIRA, A.R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology** 8(5): 677-700. 2007.

FLOR, H.H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9: 275-296. 1971.

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

GUERRA-GUIMARÃES, L., SILVA, M.C., STRUCK, C., LOUREIRO, A., NICOLE, M., RODRIGUES Jr, C.J., RICARDO, C.P.P. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum** 53 (4): 702-706. 2009.

GUZZO, S.D., HAKAKAVA, R., TSAI, S.M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology** 157: 625-638. 2009.

GUZZO, S.D., HAKAKAVA, R., LUCON, C.M.M., TSAI, S.M. Resistência Sistêmica Adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica** 30: 376-381. 2004.

GUZZO, S.D., MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology** 144: 449-454. 1996.

HAHN, M., MENDGEN, K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. **Current Opinion in Plant Biology** 4:322-327. 2001.

HAHN, M., MENDGEN, K. Characterization of in planta-induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 10(4): 427-437. 1997.

HAHN, M., MENDGEN, K.. Isolation by ConA binding of haustoria from different rust fungi and comparison of their surface qualities. **Protoplasma** 170: 95-103. 1992.

HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology** 48: 575-607. 1997.

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

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

HOGENHOUT, S.A., VAN DER HOORN, R.A.L., TERAUCHI, R., KAMOUN, S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 22(2): 115-122. 2009.

HU, X., ZHANG, H., LI, G. YANG, Y., ZHENG, Z., SONG, F. Ectopic expression of a rice protein phosphatase 2C gene OsBIPP2C2 in tobacco improves disease resistance. **Plant Cell Reports** 28: 985–995. 2009.

HWANG, I.S., HWANG, B.K. The pPepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. **Plant Physiology** 152: 948-967. 2010.

JIA, Y., McADAMS, S.A., BRYAN, G.T., HERSHEY, H.P., VALENT, B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **The EMBO Journal (European Molecular Biology Organization Journal)** 19: 4004-4014. 2000.

JONAK, C., OKRESZ, L., BOGRE, L., HIRT, H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP Kinase signalling. **Current Opinion in Plant Biology** 5: 415-424. 2002.

JONES, J.D., DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature** 444: 323-329. 2006.

JUDELSON, H.S., MICHELMORE, R.W. Highly abundant and stage-specific mRNAs in the obligate pathogen *Bremia lactucae*. **Molecular Plant Microbe Interaction** 3: 225-232. 1990.

JUSTESEN, A., SOMERVILLE, S., CHRISTIANSEN, S., GIESE, H. Isolation and characterization of two novel genes expressed in germinating conidia of the obligate biotroph *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Gene** 170: 131-135. 1996.

KAKU, H., NISHIZAWA, Y., ISHII-MINAMI, N., AKINOMOTO-TOMIYAMA, C., DOHMAE, N., TAKIO, K., MINAMI, E., SHIBUYA, N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103: 11086-11091. 2006.

KANZAKI, H., SAITOH, H., ITO, A., FUJISAWA, S., KAMOUN, S., KATOU, S., YOSHIOKA, H., TERAUCHI, R. Cytosolic *HSP90* and *HSP70* are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant Pathology** 4:383-391. 2003.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters** 8:809-824. 2003

KEMEN, E., KEMEN, A.C., RAFIQI, M., HEMPEL, U., MENDGEN, K., HAHN, M., VOEGELE, R.T. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant Microbe Interact** 18: 1130–1139. 2005.

KIM, S., AHN, II-P., LEE, Y-H. Analysis of genes expressed during rice–*Magnaporthe grisea* interactions. **Molecular Plant Microbe Interact** 14(11): 1340-1346. 2001.

KIRALY, L., BARNA, B., KIRALY, Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. **Journal of Phytopathology** 155: 385-396. 2007.

LI, J., BRADER, G., PALVA, E.T. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate mediated signals in plant defense. **The Plant Cell** 16: 319-331. 2004.

LIN, K.C., BUSHNELL, W.R., SMITH, A.G., SZABO, L.J. Temporal accumulation patterns of defence response gene transcripts in relation to resistant reactions in oat inoculated with *Puccinia graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 52: 95-114. 1998.

LING, P., WANG, M., CHEN, X., CAMPBELL, K.G. Construction and characterization of a full-length cDNA library for the wheat stripe rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). **BMC (BioMed Central) Genomics** 8: 145-157. 2007.

LIU, Z., SZABO, L.J., BUSHNELL, W.R. Molecular cloning and analysis of abundant and stage-specific mRNAs from *Puccinia graminis*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 6: 84-91. 1993.

LOPES, U.P., COSTA, D.R., ZAMBOLIM, L. Ferrugem do café: como controlar. *Revista Cultivar Grandes Culturas*, nº117, 2009. p 36-38.

MARMEY, P., JALLOUL, A., ALHAMDIA, M., ASSIGBETSE, K., CACAS, J-L., VOLOUDAKIS, A.E., CHAMPION, A., CLERIVET, A., MONTILLET, J-L., NICOLE, M. The 9-lipoxygenase GhLOX1 gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. **Plant Physiology and Biochemistry** 45: 596-606. 2007.

MENDGEN, K., HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science** 7(8): 352-356. 2002.



- MISHRA, N.S., TUTEJA, R., TUTEJA, N. Signaling through MAP kinase networks in plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 452: 55–68. 2006.
- MORRIS, E., WALKER, J. Receptor-like protein kinases, the keys to response. **Current Opinion in Plant Biology** 4:339-342. 2003.
- MULLER, P., AICHINGER, C., FELDBRUGGE, M., KAHMANN, R. The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. **Molecular Microbiology** 34: 1007-1017. 1999.
- NYOCHEMBENG, L.M., BEYL, C.A., PACUMBABA, R.P. Peroxidase activity, isozyme patterns and electrolyte leakage in roots of cocoyam infected with *Pythium myriotylum*. **Journal of Phytopathology** 155:454–461. 2007.
- PANDEY S.P., SOMSSICH, I.E. The Role of WRKY Transcription factors in plant immunity. **Plant Physiology** 150: 1648–1655. 2009.
- PANSTRUGA, R. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. **Current opinion in Plant Biology** 6: 320-326. 2003.
- PETITOT, A.S., LECOULS, A.C., FERNANDEZ, D. Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated *WRKY* gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. **Tree Genetics & Genomes** 4: 379-390. 2008.
- POSADA-BUITRAGO, M.L., FREDERICK, R.D. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics and Biology** 42: 949-962. 2005.
- POSTEL, S., KEMMERLING, B. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 20: 1025-1031. 2009.
- PRATS, E., MARTÍNEZ, F., ROJAS-MOLINA, M.M., RUBIALES, D. Differential effects of phenylalanine ammonia lyase, cinnamyl alcohol dehydrogenase, and energetic metabolism inhibition on resistance of appropriate host and nonhost cereal–rust interactions. **Phytopathology** 97: 1578-1583. 2007.
- PUTHOFF, D.P., NEELAM, A., EHRENFRIED, M.L., SCHEFFLER, B.E., BALLARD, L., SONG, Q., CAMPBELL, K.B., COOPER, B., TUCKER, M.L. Analysis of expressed sequence tags from *Uromyces appendiculatus* hyphae and haustoria and their comparison to sequences from other rust fungi. **Phytopathology** 98: 1126-1135. 2008.
- QIU, D., XIAO, J., DING, X., XIONG, M., CAI, M., CAO, Y., LI, X., XU, C., WANG, S. OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense related genes in salicylate and jasmonate-dependent signaling. **Molecular Plant Microbe Interaction** 20: 492-499. 2007.

RAMIRO, D.A., ESCOUTE, J., PETITOT, A.-S., NICOLE, M., MALUF, M.P., FERNANDEZ, D. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology** 58: 944-955. 2009.

RATHJEN, J.P., MOFFETT, P. Early signal transduction events in specific plant disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology** 6: 300-306. 2003.

ROBATZEK, S., SOMSSICH, I.E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. **Genes and Development** 16: 1139-1149. 2002.

ROJAS, M.L., MONTES DE GÓMEZ, V., OCAMPO, C.A. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 43: 209-219. 1993.

ROONEY, H.C.E., VAN'T KLOOSTER, J.W., VAN DER HOORN, R.A.L., JOOSTEN, M.H.A.J., JONES, J.D.G., DE WIT, P.J.G.M. *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. **Science** 308: 1783-1786. 2005.

SCHWEIGHOFER, A., KAZANAVICIUTE, V., SCHEIKL, E., TEIGE, M., DOCZI, R., HIRT, H., SCHWANNINGER, M., KANT, M., SCHUURINK, R., MAUCH, F., BUCHALA, A., CARDINALE, F., MESKIENEA, I. The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in arabidopsis. **The Plant Cell** 19: 2213-2224. 2007.

SEXTON, A.C., COZIENSEN, A.J., KENIRY, A., JEWELL, E., LOVE, C.G., BATLEY, J., EDWARDS, D., HOWLETT, B.J. Comparison of transcription of multiple genes at three developmental stages of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters** (Federation of European Microbiological Societies) 258: 150-160. 2006.

SILVA, M.C., GUERRA-GUIMARÃES, L., LOUREIRO, A., NICOLE, M.R. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology** 72: 29-38. 2008.

SILVA, M.C., VÁRZEA, V., GUERRA-GUIMARÃES, L., AZINHEIRA, H.G., FERNANDEZ, D., PETITOT, A.S., BERTRAND, B., LASHERMES, P., NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 18(1): 119-147. 2006.

SILVA, M.C., NICOLE, M., GUIMARÃES, L., RODRIGUES, J.R.C.J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix* – race II) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 60:169-183. 2002.

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

SOHN, J., VOEGELE, R.T., MENDGEN, K., HAHN, M. High level activation of vitamin B1 biosynthesis genes in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13(6): 629-636. 2000.

SOLOMON, M., BELENGHI, B., DELLEDONNE, M., MENACHEN, E., LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell** 11: 431-443. 1999.

TANG, X., FREDERICK, R.D., ZHOU, J., HALTERMAN, D.A., JIA, Y., MARTIN, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase. **Science** 274:2060-2063. 1996.

THARA, V. FELLERS, J.P. ZHOU, J.M. In planta induced genes of *Puccinia triticina*. **Molecular Plant Pathology** 4(1): 51-56. 2003.

THEIS, T., STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Science** 61: 437-455. 2004.

TURCK, F., ZHOU, A., SOMSSICH, I.E. Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene *PcPR1-1* in parsley. **The Plant Cell** 16: 2573-2585. 2004.

TUCKER, S.L., THORNTON, C.R., TASKER, K., JACOB, C., GILES, G., EGAN, M., TALBOTA N.J. A Fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell** 16: 1575-1588. 2004.

TYLER, B.M. Entering and breaking: virulence effector proteins of oomycete plant pathogens. **Cellular Microbiology** 11(1): 13-20. 2009.

ÜLKER, B., SOMSSICH, I.E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological functions. **Current Opinion in Plant Biology** 7:491– 498. 2004.

URBAN, M., BHARGAVA, T., HAMER, J.E. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. **The EMBO Journal (European Molecular Biology Organization Journal)** 18(3): 512-521. 1999.

VAN DER HOORN, R.A.L., KAMOUN, S. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. **The Plant Cell** 20: 2009-2017. 2008.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology** 44: 135-162. 2006.

VOEGELE, R.T., MENDGEN, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. **New Phytologist** 159: 93-100. 2003.

WIDJAJA, I., LASSOWSKAT, I., BETHKE, G., ESCHEN-LIPPOLD, L., LONG, H-H., NAUMANN, K., DANGL, J.L., SCHEEL, D., LEE, J. A protein phosphatase 2C, responsive to the bacterial effector AvrRpm1 but not to the AvrB effector, regulates defense responses in Arabidopsis. **The Plant Journal** 61: 249-258. 2010.

XIAO, F., TANG, X., ZHOU, J-M. Expression of 35S::*Pto* globally activates defense-related genes in tomato plants. **Plant Physiology** 126: 1637-1645. 2001.

XU, J-R. MAP kinases in fungal pathogens. **Fungal Genetics and Biology** 31: 137-152. 2000.

YIN, C., CHEN, X., WANG, X., HAN, Q., KANG, Z., HULBERT, S,H. Generation and analysis of expression sequence tags from haustoria of the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **BMC (BioMed Central) Genomics** 10: 626-634. 2009.

ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M., VALE, F.X.R., PEREIRA, A.A., SAKYAMA, N., CAIXETA, E.T. Physiological races of *Hemileia vastatrix* in Brazil – Physiological variability, current situation and future prospects. In: ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E.M., PINTO VÁRZEA, V.M. (Eds). Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa: UFV. Departamento de Fitopatologia. 2005. pp 75-98.

ZHANG, Y., QU, Z., ZHENG, W., LIU, B., WANG, X., XUE, X., XU, L., HUANG, L., HAN, Q., ZHAO, J., KANG, Z. Stage-specific gene expression during urediniospore germination in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **BMC (BioMed Central) Genomics** 9: 203-212. 2008.

ZHANG, S., KLESSIG, D.F. MAPK cascades in plant defense signaling. **TRENDS in Plant Science** 6(11):520-527. 2001

ZHENG, L., CAMPBELL, M., MURPHY, J., LAM, S., XU, J-R. The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13(7): 724-732. 2000.

ZHOU, N., TOOTLE, T.L., GLAZEBROOK, J. Arabidopsis *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. **The Plant Cell** 11:2419-28. 1999.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology** 12: 414-420. 2009.