

LIZANDRA CRISTINA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO GAZOLLA

**MODELAGEM DO METABOLISMO DO CAFÉ DURANTE A INFECÇÃO POR
Hemileia vastatrix EM PLANTAS SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Aplicada, para obtenção do título de
Magister Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

G291m
2018

Gazolla, Lizandra Cristina de Oliveira Figueiredo, 1995-
Modelagem do metabolismo do café durante a infecção por

Hemileia vastatrix em plantas susceptíveis e resistentes /
Lizandra Cristina de Oliveira Figueiredo Gazolla. – Viçosa, MG,
2018.

viii, 68 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Café - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. 2. *Hemileia vastatrix*. 3. Genômica. 4. Algoritmos genéticos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 583.93

LIZANDRA CRISTINA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO GAZOLLA

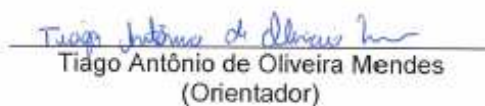
**MODELAGEM DO METABOLISMO DO CAFÉ DURANTE A INFECÇÃO POR
Hemileia vastatrix EM PLANTAS SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Aplicada, para obtenção do título de
Magister Scientiae

APROVADA: 13 de julho de 2018.


Marisa Vieira de Queiroz


Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa


Tiago Antônio de Oliveira Mendes
(Orientador)

“Só há duas maneiras de viver a vida:
a primeira é vivê-la como se os milagres
não existissem. A segunda é vivê-la
como se tudo fosse milagre.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela proteção constante.

À minha mãe Luzia, pelo amor incondicional e por sempre me ajudar na realização dos meus sonhos.

Ao meu marido Alex, pelo amor, paciência e companheirismo de todas as horas.

Ao professor Tiago Mendes pela orientação, confiança e atenção dedicada a este trabalho.

A professora Eveline Caixeta pela co-orientação e cessão dos dados de transcriptômica utilizados no trabalho.

A Dênia e Samila pela amizade e auxílio nos experimentos na casa de vegetação.

Aos amigos do LBSMSB, LBM, e BioCafé pelo convívio e ajuda durante este projeto

Aos professores Marisa Queiroz e Maximiller Costa pela participação da banca.

Ao professor Hilário Mantovani pelo auxílio nas análises com o HPLC.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de realização do curso.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do trabalho.

E a todos que não foram citados mas que participaram dessa jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
Capítulo 1	1
1. Café – cenário econômico	2
2. Ferrugem alaranjada do cafeeiro	4
3. Mecanismos de defesa do cafeeiro	7
4. Controle do metabolismo em plantas	9
4.1. Controle por alteração transcricional.....	10
4.2. Controle por modificação pós-traducional.....	12
4.3. Controle por enzimas alostéricas	13
5. Biologia de sistemas e modelos metabólicos	15
6. Referências.....	19
Capítulo 2	26
Resumo.....	27
Introdução	28
Materiais e métodos	29
Resultados	32
Discussão.....	49
Conclusão e perspectivas	55
Referências	56
Material suplementar	60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Esquematização do ciclo de vida do fungo <i>Hemileia vastatrix</i>	5
Figura 2. Sintomas da ferrugem do café	7
Figura 3. Visão simplificada do controle do metabolismo por modificação pós-traducional, alteração da transcrição gênica e regulação de enzimas alostéricas por metabólitos	10
Figura 4. Esquema da integração do transcriptoma ao modelo para gerar os modelos contexto-específicos	17

CAPÍTULO 2

Figura 1. Simulação do fluxo metabólico do modelo baseado no genoma de <i>Coffea canephora</i> por FBA.....	37
Figura 2. Genes unicamente expressos nos cafeeiros Híbrido de Timor e Caturra	37
Figura 3. Genes diferencialmente expressos nos cafeeiros susceptível e resistente após a infecção por <i>Hemileia vastatrix</i> , agrupados por vias do metabolismo primário	38
Figura 4. Análise da relação da expressão de genes do metabolismo primário entre os cultivares Híbrido de Timor (h) e Caturra CIFC 19/1(c), através de PCA (A) e contagem de genes únicos e diferencialmente expressos (B).....	39
Figura 5. Análise da relação da expressão de genes do metabolismo primário entre os cultivares Híbrido de Timor (h) e Caturra CIFC 19/1(c), através de PCA.....	40
Figura 6. <i>Heatmaps</i> de expressão gênica nos cultivares susceptível (c) e resistente (r) ao longo dos tempos testados (0, 12, 24 e 96h), agrupados por vias metabólicas.....	43
Figura 7. Simulação do fluxo do modelo baseado no genoma e os modelos após a integração do transcriptoma	44

Figura 8. Reconstrução da via glicolítica / gliconeogênese a partir do modelo de fluxo original.	47
Figura 9. Quantificação de Glicose por HPLC dos extratos de metabólitos totais dos tempos de 0 (A), 12 (B), 24 (C) e 96 (D) horas após a infecção.....	48

RESUMO

GAZOLLA, Lizandra Cristina de Oliveira Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Modelagem do metabolismo do café durante a infecção por *Hemileia vastatrix* em plantas susceptíveis e resistentes.** Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Coorientadora: Eveline Teixeira Caixeta

O Brasil é o país com a maior produção e exportação de café e as espécies mais cultivadas mundialmente são o *Coffea arabica* e o *Coffea canephora*. A doença do cafeeiro de maior relevância no cenário mundial é a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. O principal sintoma é o aparecimento de manchas amareladas na parte abaxial das folhas e, em condições climáticas favoráveis, as perdas na lavoura podem chegar a 50% da produção. O cultivar Híbrido de Timor CIFC 832/2 tem sido uma importante fonte de genes de resistência para os programas de melhoramento. Entretanto, o alto potencial adaptativo do fungo e a própria pressão seletiva causada pela utilização de cultivares resistentes vem culminando no surgimento de diversas raças fisiológicas do fungo capazes de suplantar a resistência obtida através dos métodos clássicos de melhoramento. Uma nova abordagem no estudo da relação parasito-hospedeiro é a integração de dados de genômica e outras ômicas para a construção de um modelo metabólico. Através da análise de balanço do fluxo (FBA) é possível simular o papel de cada gene na célula auxiliando na compreensão da interação entre o cafeeiro e o fungo. Com isto, o presente trabalho propôs a construção de um modelo metabólico baseado no genoma seguido da análise de FBA para cultivares resistente e susceptível após a infecção por *H. vastatrix*. Os dados de transcriptômica foram integrados ao modelo original gerando modelos contexto-específicos. Essas análises indicaram um acúmulo de glicerol-3-fosfato (G3P) no Híbrido de Timor CIFC 832/2 sugerindo que o metabolismo primário contribui para a resistência do cafeeiro, uma vez que a participação deste metabólito na resposta imune adquirida de plantas já foi demonstrada.

ABSTRACT

GAZOLLA, Lizandra Cristina de Oliveira Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Modeling of coffee metabolism during *Hemileia vastatrix* infection in susceptible and resistant plants.** Adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Co-adviser: Eveline Teixeira Caixeta

Brazil is the country with the largest production and export of coffee and the most cultivated species worldwide are *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. The major coffee disease in the world is the Coffee Leaf Rust, caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix*. The main symptom is the appearance of yellow spots on the abaxial part of the leaves and, under favorable climatic conditions; crop losses can reach 50% of production. The Híbrido de Timor CIFC 832/2 has been an important source of resistance genes for breeding programs, however, the high adaptive potential of the fungus and the selective pressure caused by the use of resistant cultivars has culminated in the appearance of several rust races capable of overcoming the resistance obtained through classical breeding methods. A new approach in the study of the host-parasite relationship is the integration of genomic and other omic data for the construction of a metabolic model. Through flux balance analysis (FBA) it is possible to simulate the role of each gene in the cell, contributing to understand the interaction between coffee and fungus. With this, the present work proposed the construction of a genome-scale metabolic model followed by FBA analysis for resistant and susceptible cultivars after *H. vastatrix* infection. Transcriptomic data were integrated into the original model generating context-specific models. These analyzes indicated an accumulation of glycerol-3-phosphate (G3P) in the Híbrido de Timor CIFC 832/2 suggesting that the primary metabolism contributes to coffee resistance, since the participation of this metabolite in the systemic acquired resistance of plants has already been demonstrated.

Lizandra Cristina de Oliveira Figueiredo Gazolla

Capítulo 1

**Ferrugem alaranjada do cafeeiro: mecanismos de defesa da planta e
importância do metabolismo para a resistência**

VIÇOSA - MG

2018

1. CAFÉ – CENÁRIO ECONÔMICO

Segundo o Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (Cecafé), a primeira muda de café chegou ao Brasil em 1727. De 1800 a 1929, o café foi o principal produto brasileiro de exportação, sendo a quebra da bolsa de Nova York um marco do fim da era de ouro do café. Apesar desta *commodity* não ser mais o principal produto de exportação do país, o Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo e o segundo maior consumidor da bebida, atrás apenas dos Estados Unidos (Cecafé, 2017). O Relatório sobre o mercado de café realizado em março de 2018 pela Organização Internacional do Café (OIC) apontou o Brasil como maior produtor mundial na safra 2017-2018 com 51 milhões de sacas, seguido por Vietnã, Colômbia e Indonésia (OIC, 2018). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estima que o cultivo do café compreenda 2,22 milhões de hectares distribuídos em 15 Estados (Ministério da Agricultura, 2017). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), Minas Gerais se destaca como maior produtor nacional, correspondendo a cerca de 70% da receita bruta esperada para 2017.

Atualmente, as lavouras brasileiras são compostas por 70% de café arábica (*Coffea arabica*) e 30% de café conilon (*Coffea canephora*), sendo 95% das variedades utilizadas susceptíveis à ferrugem (Cabral *et al.*, 2016). Apesar de o café conilon ter boas características agronômicas e ser menos susceptível à ferrugem, o café arábica é o mais cultivado por resultar em uma bebida de melhor qualidade (McCook *et al.*, 2015).

O café arábica apresenta melhor crescimento em regiões com temperatura média entre 18 e 22°C. Já para o café conilon a temperatura pode variar de 22 a 26°C. Fora dessa faixa de temperatura os cafeeiros apresentam problemas no desenvolvimento dos frutos e na floração (Camargo, 1985). Outros fatores que interferem na produção do café são a altitude (podendo variar de 1600 a 2800m) e a pluviosidade anual (1200 a 1800 mm) (DaMatta *et al.*, 2007).

O cafeeiro pode ser alvo de pragas que se alimentam de suas folhas e frutos. O *Leucoptera coffeella*, mais conhecido como mariposa do café, é uma das pragas mais importantes no Brasil. Suas larvas consomem as folhas e podem criar lesões necróticas, levando a redução na eficiência fotossintética, podendo comprometer até 50% da produção dos frutos (Vega *et al.*, 2014). Além desta, outra praga de destaque é o *Hypothenemus hampei* Ferrari, mais conhecido como broca-do-café. As larvas deste besouro se desenvolvem no interior dos frutos do café, o que torna difícil o controle por meio de inseticidas, implicando em perdas consideráveis na qualidade dos grãos e na produtividade (Aristizábal *et al.*, 2016).

O cafeeiro também está sujeito a diversas doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. As maiores perdas econômicas estão associadas às doenças fúngicas como a ferrugem do café, antracnose, mancha-de-olho-pardo e a murcha-do-cafeeiro (Hindorf e Omondi, 2011; Martins *et al.*, 2008).

A antracnose é causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae* que é capaz de infectar todos os órgãos da planta. O principal sintoma é a formação de manchas escuras nos frutos verdes que culminam em queda precoce dos mesmos. A doença causa grandes danos e perdas econômicas no continente africano e medidas de prevenção vem sendo tomadas para evitar a entrada da doença no continente americano (Várzea *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006)

A mancha-de-olho-pardo é causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* e está presente no Brasil, sendo de grande relevância no Espírito Santo. O principal sintoma é o surgimento de manchas circulares escuras com o centro branco, circundadas por um halo amarelo. As perdas na produção ocorrem pela queda precoce dos grãos (Ventura *et al.*, 2007).

Murcha-do-cafeeiro é causada pelo fungo *Fusarium xylarioides*. Este patógeno bloqueia o fornecimento de água no sistema vascular da planta levando a morte do cafeeiro. Essa doença resultou em grandes perdas em alguns países africanos na década de 90, sendo controlada com a utilização de cultivares resistentes ao patógeno (Hindorf e Omondi, 2011; Lepoint *et al.*, 2005).

A ferrugem se destaca como uma das doenças mais importantes do cafeeiro. Ela está presente nas principais regiões produtoras de café do mundo e é a principal doença do Brasil e América Latina. O prejuízo causado por essa doença nas lavouras é elevado e sua alta variabilidade genética faz dele um importante alvo de estudo (Silva *et al.*, 2006; Hindorf e Omondi, 2011).

2. FERRUGEM ALARANJADA DO CAFEIEIRO

A ferrugem alaranjada do cafeeiro é a doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. O fungo foi caracterizado em 1869 no Ceilão (atual Sri-Lanka) e se disseminou pelas principais regiões cafeeiras do mundo (Zambolim, 2016).

H. vastatrix pertence ao filo *Basidiomycota*, classe *Puccioniomycetes*, ordem *Pucciniales*. Assim como outros fungos causadores de ferrugem, ele é biotrófico, ou seja, depende da célula viva do hospedeiro para se multiplicar (Guerra-Guimarães *et al.*, 2015). Seu ciclo de vida (Figura 1) é caracterizado como microcíclico, pois apresenta apenas três estruturas das cinco possíveis observadas em fungos causadores de ferrugem (Fernandes *et al.*, 2009). Na fase uredinial, há formação de urediniósporos – estruturas dicarióticas que caracterizam a reprodução assexuada. Na fase de télia, os teliósporos se formam apenas em condições específicas (chuva moderada e baixa temperatura) e neles ocorre a cariogamia. O núcleo diploide nessas estruturas dá origem a quatro células haploides que migram para dentro dos basidiósporos (Fernandes *et al.*, 2009; Agrios, 2005 apud Silva, 2017).

É importante notar que apenas o urediniósporo apresenta capacidade infectiva, sendo os basidiósporos incapazes de estabelecer a infecção no cafeeiro (Gopalkrishnan, 1951). Assim, durante muito tempo, acreditou-se que *H. vastatrix* não apresentaria grandes variações genéticas, pois a estrutura sexuada não propagava a infecção. Entretanto, estudos da década de 1960 levantaram a hipótese de que os urediniósporos seriam capazes de sofrer meiose (Rajendren, 1967). Em 2011, Carvalho e colaboradores confirmaram tal evento, denominado de criptossexualidade, e

consideraram que ele seria uma possível explicação para a variabilidade de raças fisiológicas de *H. vastatrix*.

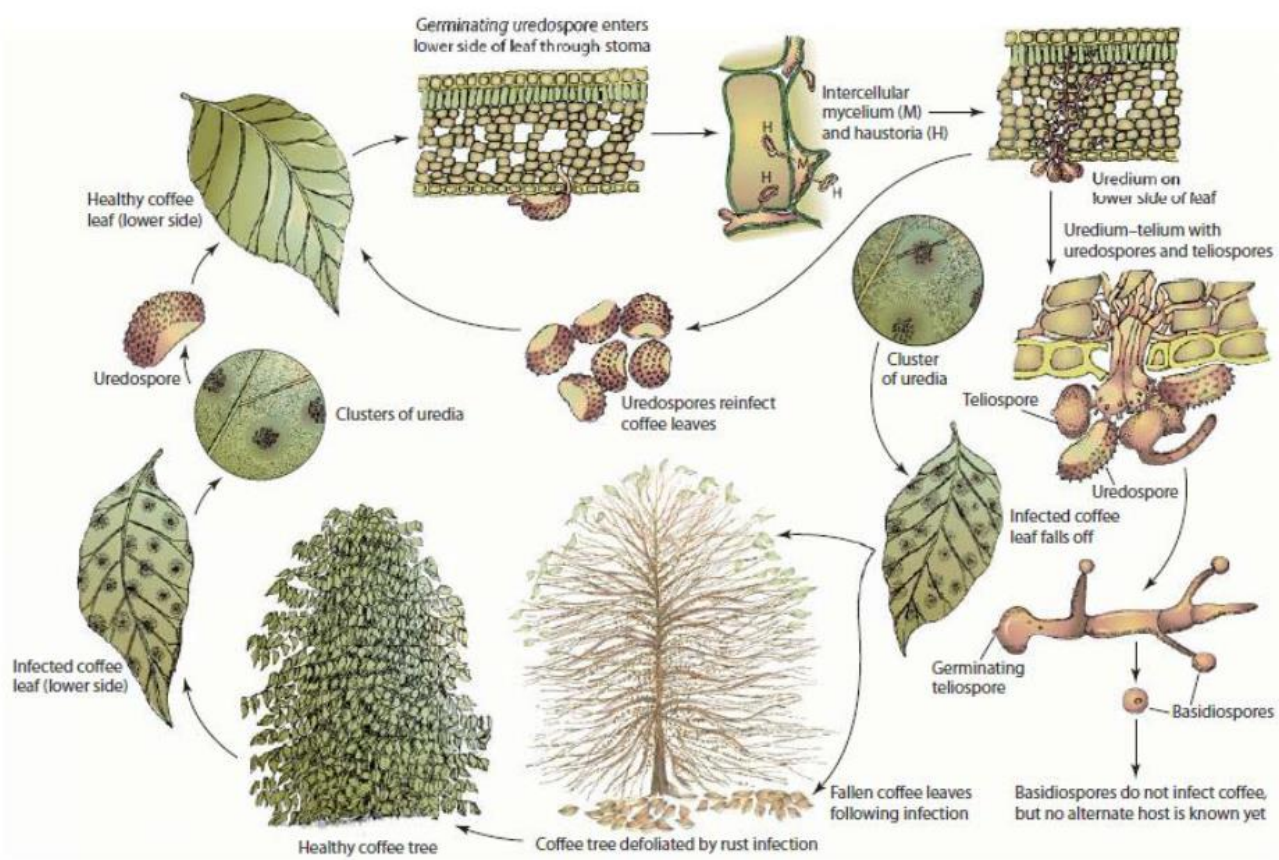


Figura 1. Esquematisação do ciclo de vida do fungo *Hemileia vastatrix* (Agrios, 2005).

O processo infectivo começa com a adesão e germinação dos esporos seguida da formação do apressório. A hifa de penetração do fungo se diferencia na célula-mãe do haustório que originará o haustório propriamente dito. Se não controlado, o fungo continua crescendo e com cerca de três semanas após a infecção é possível identificar macroscopicamente as pústulas de esporos na parte abaxial das folhas (Berndt, 2012; Azinheira *et al.*, 2007; Talhinhos *et al.*, 2017)

O primeiro relato da ferrugem no Brasil foi em 1970, na Bahia, mas a doença rapidamente atingiu todas as regiões produtoras no país. A doença é mais agressiva em anos de alta carga pendente de frutos e nas estações mais chuvosas, uma vez que o ar úmido favorece a germinação dos esporos (Cabral *et al.*, 2016)

A partir da segunda guerra mundial, o uso de fungicidas para o controle da ferrugem se disseminou (McCook *et al.*, 2015). Entretanto, a má utilização dos mesmos vem contribuindo para o surgimento de fungos resistentes (Ploez, 2007). Outro problema é o alto custo do controle químico que contribui para a utilização incorreta do fungicida e a compra de compostos mais baratos e de má qualidade (Baker, 2014).

A utilização de cultivares resistentes ao fungo tem sido a estratégia de maior eficiência no controle da doença. Já existem variedades presentes no mercado como a Castillo, por exemplo, que foi utilizada na Colômbia a partir de 2009 e reduziu a incidência de ferrugem no país (Avelino *et al.*, 2015). Entretanto, o *H. vastatrix* possui elevado potencial adaptativo que resulta no surgimento de novas raças capazes de infectar a cultivares resistentes, implicando em necessidade constante de mais pesquisas na área (Várzea *et al.*, 2005; Van der Vossen *et al.*, 2015).

A distribuição das raças de *Hemileia* no mundo está relacionada com os genótipos dos cafeeiros utilizados em cada região. Além disso, a pressão seletiva causada pela utilização de cultivares resistentes contribui para o surgimento de novas raças do patógeno (Bettencourt, 1981; Várzea e Marques, 2005). No mundo, já foram identificadas mais de 50 raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* (Talhinhas *et al.*, 2017). Apesar da raça II ser a mais abundante no Brasil, 15 raças (I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI, XXXIII, XXXVII) já foram identificadas no país até 2015 (Zambolim, 2016). Um exemplo de destaque é a raça XXXIII, identificada pela primeira vez em Minas Gerais em 2012, que foi capaz de suplantar a resistência do cultivar Oeiras MG 6851, lançado em 2000 e até então não infectado por *H. vastatrix* (Capucho *et al.*, 2012). A Índia foi pioneira nos estudos da ferrugem do café e desde 1911 vem utilizando cultivares resistentes, não por acaso, este é o país com mais raças fisiológicas do fungo identificadas (Rodrigues, 1975). Em 2015, Prakash e colaboradores identificaram cafeeiros até então resistentes a todas as raças de *H. vastatrix* infectados.

O Híbrido de Timor CIFC832/2 (híbrido natural do café arábica e conilon), que é naturalmente resistente à ferrugem e outras doenças, tem sido

uma importante fonte de genes de resistência (Bettencourt *et al.*, 1988). Porém, como esse cultivar não possui boas características agronômicas, inúmeros cruzamentos vêm sendo feitos com cultivares susceptíveis a fim de se obter um cultivar resistente à ferrugem sem o comprometimento de suas qualidades agronômicas (Barka *et al.*, 2017).

O principal sintoma da doença é o aparecimento de manchas amareladas na parte abaxial das folhas. A doença também causa a queda precoce das folhas prejudicando o desenvolvimento dos botões florais e dos frutos, reduzindo assim a produtividade do cafeeiro (Figura 2). As perdas podem chegar a 50% da produção (Matiello *et al.*, 2002; Zambolim, 2016).

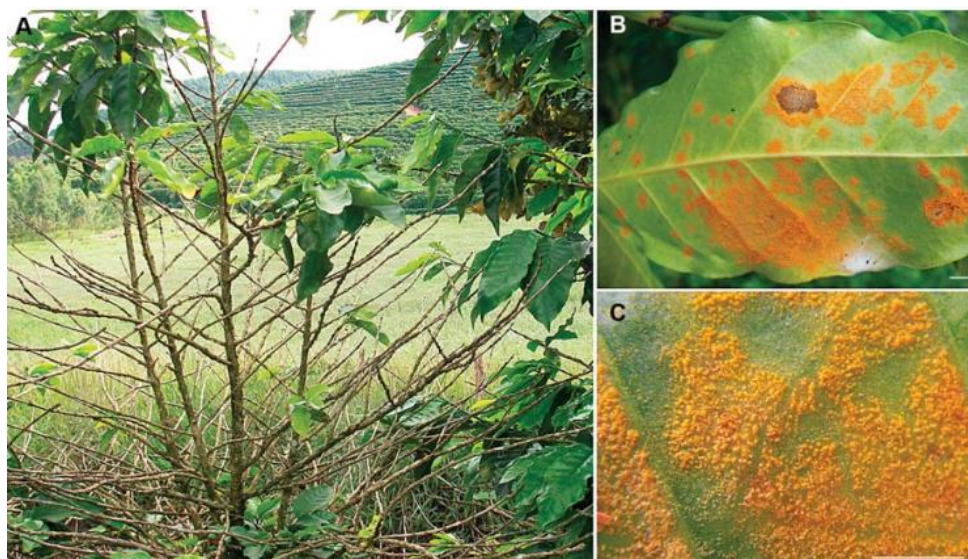


Figura 2. Sintomas da ferrugem do café. A- Perdas das folhas do cafeeiro em Coimbra, Minas Gerais. B-Sintomas na superfície abaxial das folhas. C- Pústulas urediniais de *H. vastatrix*. Adaptado de Carvalho *et al.*, 2011.

3. MECANISMOS DE DEFESA DO CAFEIEIRO

O cafeeiro possui, de forma geral, dois tipos de resistência aos patógenos, a hospedeira e a não hospedeira.

A resistência hospedeira é mediada pelos genes R (de resistência) conforme a teoria gene-a-gene postulada por Flor (1956). Segundo essa teoria, para cada gene de resistência do hospedeiro, existe no patógeno um gene de avirulência. Estudos realizados com o patossistema café-ferrugem mostraram que esta teoria é válida (Noronha-Wagner e Bettencourt, 1967), tendo sido

descobertos até o momento nove genes dominantes (S_{H1} - S_{H9}) de resistência em café e nove genes de avirulência ($v1$ - $v9$) em *H. vastatrix* (Rodrigues *et al.*, 1975; Bettencourt *et al.*, 1988).

A resposta de hipersensibilidade, comum entre diferentes plantas superiores, é desencadeada pelo reconhecimento entre o gene R e o gene de avirulência correspondente do patógeno. O reconhecimento induz a morte celular no sítio da infecção e ativa diferentes genes de defesa na planta, como por exemplo, as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) que possuem atividade antifúngica e antibacteriana (Fernandes *et al.*, 2009). Por causar morte celular, esta resposta é importante contra patógenos biotróficos como o *H. vastatrix*.

Já a resistência não hospedeira envolve fatores estruturais, como a espessura da cutícula, e fatores moleculares, como a produção de substâncias tóxicas (Pascholatti, 1995). A principal vantagem da resistência não hospedeira é que ela pode proteger a planta contra diferentes raças dos patógenos (Gill *et al.*, 2015).

Estudos feitos por Diniz e colaboradores (2012) sugeriram que o Híbrido de Timor CIFC832/2 responde a infecção pelo fungo *H. vastatrix* através da resistência não hospedeira, sendo esta uma possível explicação para sua resistência mais durável. Estudos citológicos com fungos causadores de outras ferrugens indicaram que a resposta mediada pelos genes R ocorre após a formação do haustório. Já a resposta não hospedeira atuou antes do haustório ser formado (Mellersh e Heath, 2003).

Uma característica dos organismos biotróficos é a supressão da resposta imune dos hospedeiros. Foi observada no cafeeiro susceptível uma diminuição de hidrolases e oxidases nas fases iniciais da doença seguida da resposta de hipersensibilidade (Guerra-Guimarães *et al.*, 2015). Nessas plantas, porém, a resposta é muito tardia e incapaz de impedir a proliferação do fungo (Silva *et al.*, 2012). A análise do transcriptoma feita por Florez e colaboradores (2017) com o híbrido de Timor CIFC832/2 também apontou uma resistência pré-haustorial.

As plantas também possuem alguns hormônios que atuam na defesa contra patógenos. Os principais são o ácido salicílico, associado à defesa contra patógenos biotróficos, e o ácido jasmônico, associado à defesa contra patógenos necrotróficos (Proietti *et al.*, 2013). Diniz e colaboradores (2012) sugeriram que as respostas mediadas pelos ácidos salicílico e jasmônico podem coexistir na resistência pré-haustório identificadas no Híbrido de Timor CIFC832/2. Sá e colaboradores (2013) dosaram o ácido salicílico por LC/ESI-MS/MS e perceberam um aumento desse hormônio nas plantas infectadas após 24h de infecção, sugerindo sua participação na defesa contra o *H. vastatrix*.

4. CONTROLE DO METABOLISMO EM PLANTAS

O controle do metabolismo em plantas pode ser feito, principalmente, por meio da regulação da expressão gênica (Brady *et al.*, 2007) e da modificação pós-traducional de enzimas e proteínas (Gaudinier *et al.*, 2015). O controle alostérico de enzimas, por meio da ligação de metabólitos celulares, pode também levar a inibição ou ativação de vias metabólicas, alterando o fluxo metabólico celular (Stitt *et al.*, 2009). Todos estes controles são utilizados como respostas a estímulos externos ou necessidades fisiológicas de desenvolvimento (Moussaieff *et al.*, 2013). A Figura 3 ilustra de forma simples os processos de controle da abundância de metabólitos descritos a seguir.

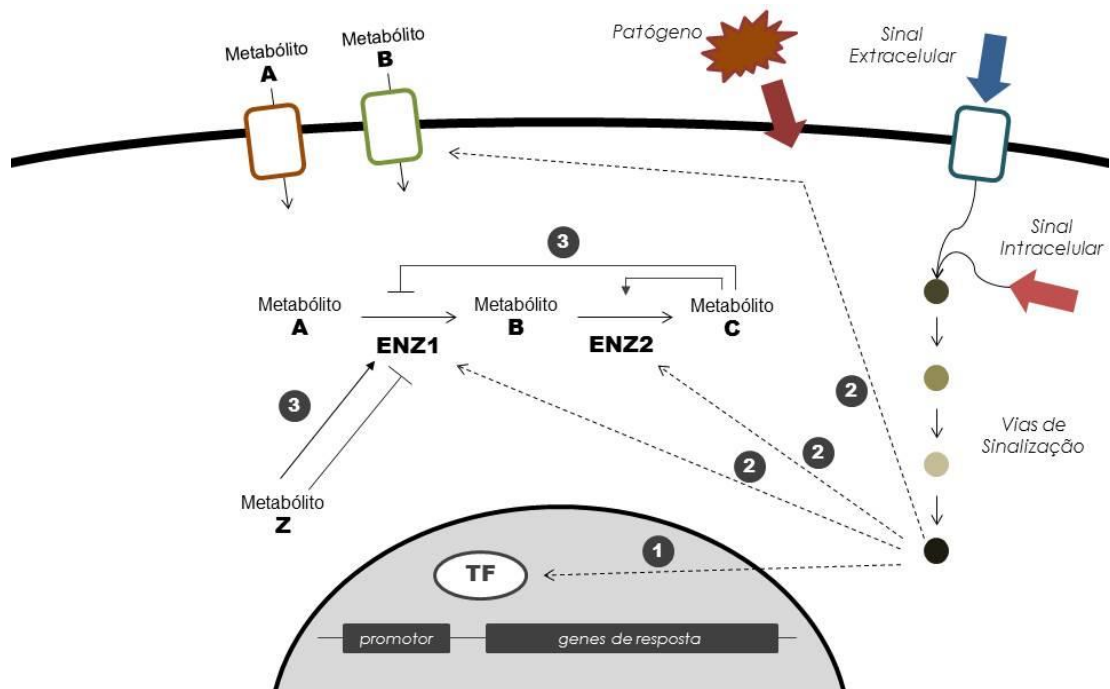


Figura 3. Continua...

Figura 3. Visão simplificada do controle do metabolismo por modificação pós-traducional, alteração da transcrição gênica e regulação de enzimas alostéricas por metabólitos. Sinais percebidos pela célula – estímulos extracelulares ou intracelulares, como patógenos ou necessidade de adaptação fisiológica – culminam na ativação de alguma via de sinalização específica. Proteínas ou algum outro elemento dessa via coordenam a ativação de diferentes processos, atuando como moduladores / intermediadores. (1) A sinalização pode levar a ativação ou inibição de fatores de transcrição (TF), alterando o perfil transcricional de um conjunto de genes em resposta ao estímulo. (2) Além deste mecanismo, algumas enzimas envolvidas na sinalização desencadeiam uma série de modificações pós-traducionais em alvos-específicos, como enzimas de vias metabólicas ou proteínas transportadoras, por exemplo, alterando o fluxo metabólico celular. (3) É possível também que alguns metabólitos regulem enzimas específicas por meio de interações intermoleculares. Essas enzimas alostéricas podem ter sua atividade aumentada ou limitada, levando a rápidas mudanças no perfil metabólico da célula. Estes metabólitos reguladores podem estar diretamente relacionados com a via em questão, ou serem intermediários de outras vias correlacionadas.

4.1. Controle por alteração transcricional

O controle transcricional responsivo a estímulos externos já foi descrito para diferentes processos celulares em plantas. Essas alterações transcricionais são observadas em resposta a estresses bióticos e abióticos, desenvolvimento e adaptação da planta, além da coordenação do ciclo circadiano e vias relacionadas às alterações percebidas pela planta nos ciclos de luz-escuro.

Estudos realizados em 2005 (Brown *et al.*, 2005; Mehrrens *et al.*, 2005) indicaram que o fotorreceptor UVR8 é sensível a exposição a raios ultravioleta B (UV-B), levando a ativação de dois fatores de transcrição, HY5 e MYB12. Estes, por sua vez, se ligam a regiões promotoras de genes envolvidos no processo de biossíntese de flavonóides, metabólitos secundários essenciais para manutenção da integridade celular de plantas expostas a altas radiações de UV-B (Landry *et al.* 1995).

Em *Arabidopsis thaliana*, a progressão da germinação (semente para plântula) é caracterizada por um processo de considerável alteração do metabolismo, no qual a semente em estado de quiescência evolui para um estado de alta atividade metabólica (Fait *et al.*, 2006). Silva e colaboradores (2017) verificaram que essa alteração parece ser diretamente responsiva a abundância de transcritos na semente. Aminoácidos essenciais ao desenvolvimento da semente – como aspartato, metionina, glutamato e fenilalanina (Zheng, 2009) – apresentavam maior abundância ao longo do processo germinativo, de forma similar aos genes envolvidos no processo de biossíntese – como asparagina sintetase (*ASN2* e *ASN3*), glutamato descarboxilase (*GAD1* e *GAD2*) e metionina sintase (*MS1* e *MS2*).

A infecção de plantas por fungos também culmina em alterações transcricionais (Cairns *et al.*, 2010; Magnin-Robert *et al.*, 2016; Sham *et al.*, 2017). A produção de trigo – importante produto agrícola – pode ser afetada pelo fungo *Puccinia triticina*, causador da ferrugem da folha do trigo (Kolmer *et al.*, 2017). Estudos recentes (Cassassola *et al.*, 2015) apontaram para existência de alteração do perfil transcricional de folhas de trigo infectadas de um cultivar resistente. Interessantemente, a alteração do perfil de expressão gênica precoce (horas iniciais) compreendia a up-regulação de peroxidases, glucanases e endoquitinases – enzimas envolvidas em respostas de defesa clássica contra a infecção fúngica (Cassassola *et al.*, 2015).

Além dessas relações pontuais, estudos em biologia de sistemas nos últimos anos têm indicado a existência de uma fina regulação entre diferentes vias metabólicas através de fatores de transcrição em comum – como o CCA1 (*Circadian Clock Associated 1*) (Wang e Tobin, 1998). Este fator de transcrição, inicialmente relacionado ao ciclo circadiano (Harmer, 2009),

regula direta- e indiretamente uma série de processos e vias metabólicas, como a expressão de proteínas da maquinaria fotossintética, enzimas do processo de assimilação de nitrogênio e enxofre, e a ativação de outros fatores de transcrição, como HY5 (Wang *et al.*, 1997; Harmer *et al.*, 2000).

4.2. Controle por modificação pós-traducional

O controle do metabolismo também pode ser feito por modificação pós-traducional, como fosforilação, acetilação, metilação, carbonilação, ubiquitinação, glicosilação e outros processos, como clivagem de pequenas sequências de aminoácidos. Essas alterações na estrutura proteica são responsáveis pelo controle fino e rápido de enzimas e transportadores, ampliando a funcionalidade do proteoma sem a necessidade de produção de novas proteínas (Friso e van Wijk, 2015).

Em plantas, a modificação pós-traducional de proteínas – transportadores ou enzimas de vias metabólicas – bem como de seus reguladores pode levá-los à degradação, estabilização, aumento ou diminuição de atividade, alteração de localização e a formação de complexos oligoméricos (Huber e Hardin, 2004).

A fosforilação, uma das modificações pós-traducionais mais comumente observadas (mais de 50% dos estudos experimentais publicados, de acordo com *The Association of Biotechnological Resources Facilities*), está geralmente envolvida com a transdução de sinais celulares e vias metabólicas, afetando a atividade de enzimas, localização subcelular de proteínas e suas interações com outras biomoléculas (van Wijk *et al.*, 2014). Além destes, a fosforilação é essencial para processos biológicos importantes como germinação, resposta imune inata, movimento de estômatos e tolerância a estresses (Silva-Sanchez *et al.*, 2015).

Estudos recentes têm comprovado a importância destas modificações em processos essenciais para plantas. Subba e equipe (2013) identificaram – em grão-de-bico – a importância da fosforilação de determinadas proteínas, envolvidas no processo de defesa celular, fotossíntese, transporte de íons e redobramento proteico. Kumar e

colaboradores (2014) avançaram nos estudos de fosfoproteoma de grão-de-bico e identificaram 107 fosfoproteínas, envolvidas em dobramento proteico, sinalização e regulação gênica, replicação, reparo e modificação do DNA, além de enzimas de diferentes vias metabólicas.

Em 2006, Carrari e colaboradores realizaram um estudo avaliando o transcriptoma e o metaboloma durante o desenvolvimento do fruto do tomateiro. Ao estabelecerem a correlação entre a abundância de transcritos e metabólitos, foi possível concluir a existência de dois conjuntos de dados que explicavam o fluxo metabólico: enquanto uma parcela de transcritos era capaz de explicar parte das alterações metabólicas, a maior parte não tinha correlação com a abundância de metabólitos, sugerindo que as modificações pós-traducionais têm papel-chave no desenvolvimento e amadurecimento do tomate.

O papel das modificações pós-traducionais é observado mesmo em processos de drástica mudança fisiológica nas plantas, como a mudança de um estado de crescimento vegetativo para um estado de floração (Simpson e Dean, 2002). Essa transição floral é característica de cada planta, mas é regulada de forma geral por um fator de transcrição (Flowering Locus C, FLC), que reprime a floração (Kwak *et al.*, 2016). Estudos indicam que esse fator de transcrição está submetido a três modificações pós-traducionais que resultam em diferentes características fisiológicas: i) fosforilação e ii) sumoilação, que estabilizam FLC e mantêm a repressão do desenvolvimento das flores; iii) ubiquitinação, que degrada FLC e permite a floração (Kwak *et al.*, 2016).

Importante destacar que o controle de alterações metabólicas não é realizado apenas de uma forma. Transportadores de sacarose (como SUT1) em plantas superiores são regulados tanto por controle da expressão gênica quanto por modificações pós-traducionais, afetando a distribuição de sacarose pelos diferentes órgãos, células e compartimentos subcelulares (Liesche *et al.*, 2011).

4.3. Controle por enzimas alostéricas

O controle do fluxo metabólico através das enzimas alostéricas é muito importante, pois permite um rápido ajuste às necessidades fisiológicas com baixa demanda energética. Essa regulação da atividade enzimática é feita, principalmente, por duas maneiras: i) regulação pelo produto direto e ii) regulação por feedback.

Simulações matemáticas (Nägele e Weckwerth, 2014) utilizando vias de metabolismo central de carboidratos em plantas indicaram que flutuações nos níveis de metabólitos específicos, como trealose-6-fosfato, podem promover aumento ou redução da atividade de outras enzimas de vias metabólicas relacionadas, como metabolismo de sacarose.

Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), enzima importante no metabolismo central de carboidrato, é regulada por uma série de metabólitos, além de modificações pós-traducionais (como fosforilação). Ela promove a reação de fosfoenolpiruvato e bicarbonato para formação de oxaloacetato e fosfato (Schlieper *et al.*, 2014). Sua atividade pode ser modificada por feedback negativo (L-malato e L-aspartato) (Paulus *et al.*, 2013) ou feedback positivo (hexoses- e trioses-fosfato, aminoácidos neutros e etileno-glicol) (Rustin *et al.*, 1988). A modificação da atividade enzimática é feita por uma regulação competitiva, no qual os níveis dos metabólitos celulares reguladores de PEPC definem o fluxo reacional, permitindo um ajuste rápido e eficiente no controle da formação de oxaloacetato (Schlieper *et al.*, 2014).

O metabolismo de aminoácidos também está submetido aos mesmos processos de regulação alostérica. Enzimas envolvidas na biossíntese de diferentes grupos de aminoácidos são reguladas por feedback negativo ou inibição direta pelo produto, garantindo a homeostase das vias metabólicas (Curien *et al.*, 2008). Concentrações elevadas de leucina, por exemplo, podem inibir as enzimas isopropil-malato sintase 1 e 2 (biossíntese da própria leucina), além da enzima acetohidroxiácido sintase (biossíntese de valina e isoleucina) (Curien *et al.*, 2008). Essa complexa rede de interações aminoácido-enzima culminam em um amplo controle do processo de biossíntese de aminoácidos em plantas, garantindo os ajustes fisiológicos celulares necessários.

5. BIOLOGIA DE SISTEMAS E MODELOS METABÓLICOS

A biologia de sistemas se caracteriza pelo estudo global das reações e interações que ocorrem entre as moléculas biológicas nas células de diversos organismos. Seu foco é estudar a dinâmica existente entre DNA-RNA-proteínas de forma sistêmica (Barrett *et al.*, 2006). Apesar de ter se alavancado com o surgimento das tecnologias *high-throughput*, o primeiro circuito molecular regulatório foi mapeado em 1957 permitindo a elucidação da regulação do *operon lac* (Westerhoff *et al.*, 2004). Atualmente, a biologia de sistemas tem sido muito utilizada no estudo das interações patógeno-hospedeiro em diversos organismos visando encontrar novos alvos terapêuticos (Durmus *et al.*, 2015).

A reconstrução de modelos metabólicos é uma ferramenta da biologia de sistemas que vem se popularizando desde os anos 2000 com a publicação do modelo de *Escherichia coli* MG1655 feito por Edwards e colaboradores (Zhang *et al.*, 2015). Os pesquisadores utilizaram a sequência do genoma para reconstruir as vias metabólicas da bactéria e fizeram a análise do balanço dos fluxos metabólicos (Edwards *et al.*, 2000).

Thiele e Palsson (2006) citaram quatro etapas gerais para a reconstrução de redes metabólicas. A primeira é a geração do rascunho da rede através da anotação do genoma, logo é essencial que o genoma utilizado esteja em boa qualidade (Dal'Molin e Nielsen, 2013). Atualmente existem plataformas online e gratuitas como o Model SEED que constroem esses rascunhos (Henry *et al.*, 2010). A segunda etapa consiste na curadoria manual e refinamento da rede gerada pelo software da etapa anterior. Segundo Thiele e Palsson a curadoria manual deve ser feita para minimizar a interferência de genes mal anotados e da falta de informações específicas sobre a maioria das espécies. Após o refinamento, o modelo deve ser convertido para um formato matemático gerando a matriz estequiométrica. Essa matriz possui todas as interações da rede e permitirá que as simulações sejam feitas. Por fim, alguns alvos são selecionados para validação da rede (Thiele e Palsson 2006).

Existem vários modelos metabólicos para organismos unicelulares, enquanto observa-se escassez de modelos construídos para organismos

multicelulares. A reconstrução de plantas se limita a poucas espécies como *Arabidopsis thaliana*, arroz e milho (Dal'Molin e Nielsen, 2013).

Os modelos metabólicos podem ser aprimorados a partir da integração de outras ômicas. Essa abordagem ajuda a compensar a falta de informações na literatura sobre todas as interações celulares (Lewis *et al.*, 2012). A transcriptômica apresenta vantagens como: menor custo, ter uma cobertura maior de moléculas, uma vez que as bibliotecas de RNA são mais estáveis e há tecnologias desenvolvidas robustas o suficiente para identificar e quantificar o RNA com maior precisão em relação às outras ômicas (Hoppe, 2012; Wang *et al.*, 2009; Kim e Lun, 2014). Ainda assim, outras ômicas estão ganhando destaque na construção de modelos metabólicos, como a proteômica e a metabolômica, que refinam o modelo final desejado.

Ao integrar dados de proteômica ao modelo para *Enterococcus faecalis*, Großholz e equipe (2016) perceberam que esse dado permitiu uma melhor predição da concentração das proteínas na célula de estudo. Entretanto, limitações das técnicas de proteômica como alto custo e dificuldade de execução contribuem para uma menor utilização desses dados nos modelos metabólicos (Kim e Lun, 2014). Além disso, os bancos de dados de proteínas são menores tornando mais difícil o processo de identificação, uma vez que em alguns casos é necessário realizar o sequenciamento *de novo* (Szabo e Janaky, 2015). Assim, estabelecer um proteoma de referência para um organismo é uma tarefa complexa, pois demanda tempo e o modelo obtido dificilmente explicaria as heterogeneidades observadas em diferentes experimentos (Manzoni *et al.*, 2016).

A metabolômica é a ômica que mais se aproxima do fenótipo das células, pois permite inferir informações, sobre o fluxo celular, relacionadas ao controle de enzimas dependentes das concentrações de metabólitos (Yizhak, *et al.*, 2010; Aurich *et al.*, 2016). As limitações de sua utilização estão na dificuldade de prever os fluxos para cada metabólito uma vez que estes podem participar de diferentes reações e nas limitações das técnicas de geração dos dados de metabolômica (Kim e Lun, 2014; Aurich *et al.*, 2016).

O COBRA Toolbox (*CO*nstraint-*B*ased *R*econstruction and *A*nalysis) foi desenvolvido em 2007 com o intuito de facilitar a geração e análise dos modelos metabólicos (Becker *et al.*, 2007). Ele recebeu novas funcionalidades em 2011 quando foi lançada sua versão 2.0. Dentre as melhorias estão opções para *gap filling*, engenharia metabólica e visualização dos modelos computacionais (Schellenberger *et al.*, 2011). O software necessita do programa MATLAB para funcionar e aceita modelos no formato SBML (*Systems Biology Markup Language*).

Os modelos podem ser gerados em plataformas como o *Model SEED* que integram informações da anotação do genoma de interesse e associações gene-proteína-reação para gerar a equação de biomassa e as redes de reações que resultam em um rascunho do modelo metabólico (Henry *et al.*, 2010). Atualmente existem diversos métodos para a integração de dados de transcriptômica aos modelos metabólicos. GIMME, iMAT, mCADRE e FastCORE são alguns dos métodos disponíveis no COBRA Toolbox (Estévez e Nikoloski, 2014).

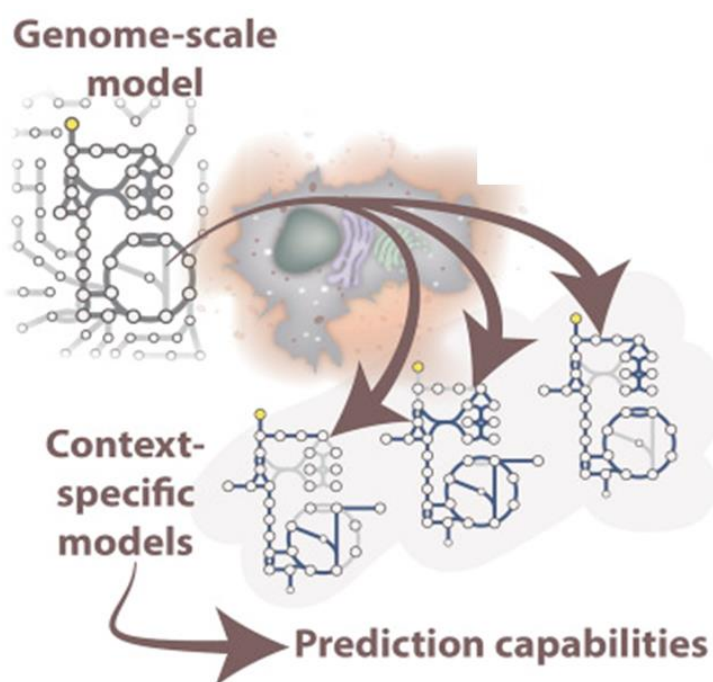


Figura 4. Esquema da integração do transcriptoma ao modelo para gerar os modelos contexto-específicos. Adaptado de Opdam *et al.* (2017).

Estes métodos podem ser divididos entre os que possibilitam análise de fluxo e os que apenas fornecem os modelos contexto-específicos. FastCORE e mCADRE são exemplos de métodos que não permitem a análise do fluxo e diferem entre si principalmente pelo algoritmo utilizado por cada um (Wang *et al.*, 2012; Vlassis *et al.*, 2014). iMAT e GIMME pertencem a família de métodos que além dos modelos contexto-específicos fornecem o fluxo predito para cada reação. O iMAT maximiza as correspondências entre os estados de reação e os dados de expressão (Shlomi *et al.*, 2008). Já o GIMME maximiza a função objetiva (geralmente é a equação de biomassa) e em seguida integra os dados de expressão que acima de um limite inferior pré-determinado (Becker e Palsson, 2008).

A escolha do método de integração dos dados de transcriptômica depende da necessidade e objetivo do trabalho. De forma geral, as ferramentas *in silico* permitem diferentes possibilidades de integração para contemplar as variadas possibilidades a serem utilizadas nas pesquisas.

6. REFERÊNCIAS

- ABIC, **O café brasileiro na atualidade.** Disponível em <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38#58>>. Acesso em 05 de junho de 2018.
- Agren, R. et al. **The RAVEN Toolbox and Its Use for Generating a Genome-scale Metabolic Model for *Penicillium chrysogenum*.** PLoS Computational Biology, v 9, 2013.
- Aristizábal, L. F. *et al.*, **Integrated Pest Management of Coffee Berry Borer: Strategies from Latin America that Could Be Useful for Coffee Farmers in Hawaii.** Insects, v 7(1), 2016.
- Aurich, M. K. *et al.* **MetaboTools: A Comprehensive Toolbox for the Analysis of Genome-Scale Metabolic Models.** Front. Physiol., v 7, Art 327, 2016.
- Avelino, J., et al. **The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): Impacts, plausible causes and proposed solutions.** Food Sec., v 7, p 303-321, 2015.
- Azinheira, H.G. *et al.*, **Esterase activity and adhesion during the early stages of *Hemileia vastatrix* differentiation.** In Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science(ASIC), p 1325-1329, 2007.
- Baker, P. **The “Big Rust”:** An update on the coffee leaf rust situation. Coffee Cocoa Int., v 40, p 37-39, 2014.
- Barka, G. D. *et al.*, **Differential expression of molecular rust resistance components have distinctive profiles in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions.** Eur. J. Plant. Pathol., v 149, p 546-561, 2017.
- Barrett, C. L., *et al.* **Systems biology as a foundation for genome-scale synthetic biology.** Current Opinion in Biotechnology, v 17, p 488-492, 2006.
- Becker S. A. e Palsson B. O. **Context-specific metabolic networks are consistent with experiments.** PLoS Comput. Biol., v 5, p 1-10, 2008.
- Becker, S. A. *et al.* **Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox.** Nature Protocols, v 2, p 727-738, 2007.
- Berndt, R. **Species richness, taxonomy and peculiarities of the neotropical rust fungi: are they more diverse in the Neotropics?** Biodivers. Conserv., v 21, p 2299–2322, 2012.
- Bettencourt, A. J. **Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de factores de resistência à *H. vastatrix* Berk & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica*.** L. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC/IICT), 93 p, 1981.
- Bettencourt, A. J., *et al.* **Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases.** Coffee Agronomy, v 4, p 199-234, 1988.
- Brady, S. M. *et al.* **A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns.** Science, v 318, p 801–806, 2007.
- Brown, B. A. *et al.* **A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v 102, p 18225-18230, 2005.
- Cabral, P. G. C. *et al.*, **Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp.** Plant Pathology, v 65, p 196–204, 2016.

- Cairns, T., Minuzzi, F. & Bignell, E. **The host-infecting fungal transcriptome.** FEMS Microbiology Letters, v 307, p 1-11, 2010.
- Camargo, A.P. de. **Florescimento e frutificação de café arábica nas diferentes regiões (cafeeiras) do Brasil.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v 20, p 830-839, 1985.
- Capucho, A. S. *et al.* **Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil.** Australasian Plant Disease Notes, v7, p 189-191, 2012.
- Carrari, F. *et al.* **Integrated Analysis of Metabolite and Transcript Levels Reveals the Metabolic Shifts That Underlie Tomato Fruit Development and Highlight Regulatory Aspects of Metabolic Network Behavior.** Plant Physiology, v 142, p 1380–1396, 2006.
- Carvalho, C. R., *et al.* **Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*.** Plos One, v 6(11), p e26387, 2011.
- Casassola, A. *et al.* **Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. Toropi.** Physiological and Molecular Plant Pathology, v 89, p 49-54, 2015.
- Cecafé, **Sobre o café.** Disponível em <<http://www.cecafe.com.br/sobre-o-cafe/consumo/>>. Acesso em 09 de junho de 2018.
- Conab, **Acompanhamento da safra brasileira V4. Safra 2017 nº1.** Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_17_14_51_54_boletim_cafe_-_janeiro_de_2017.pdf>. Acesso em 28 de maio de 2018.
- Curien, G. *et al.* **Amino acid biosynthesis: New architectures in allosteric enzymes.** Plant Physiology and Biochemistry, v 46, p 325–339, 2008.
- Dal'Molin, C. G. O., Nielsen, L. K. **Plant genome-scale metabolic reconstruction and modelling.** Current Opinion in Biotechnology, v 24, p 271-277, 2013.
- DaMatta, F. M., *et al.* **Ecophysiology of coffee growth and production.** Braz. J. Plant Physiol., v 19, p 485-510, 2007.
- Denoëud, F., *et al.* **The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis.** Science, v 5, p 1181-1185, 2014.
- Diniz, I. *et al.*, **Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2.** Eur J Plant. Pathol., v 133, p 141-157, 2012.
- Durmus, S., *et al.* **A review on computational systems biology of pathogen-host interactions.** From Microbiol. v 6, 2015.
- Estéves, S. R. e Nikoloski, Z. **Generalized framework for context-specific metabolic model extraction methods.** Front. Plant. Sci., v 5, artigo 491, 2014.
- Fait, A. *et al.* ***Arabidopsis* Seed Development and Germination Is Associated with Temporally Distinct Metabolic Switches.** Plant Physiology, v 142, p 839–854, 2006.
- Fernandes R. C., *et al.* **Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination.** Tropical Plant Pathology, v 34 (2), p 108-113, 2009.
- Fernandes, C. F. *et al.*, **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos** Documento 133, Embrapa Rondônia, 2009.

- Flor, H. H. **The complementary genic systems in flax and flax rust.** *Advances in Genetics*, v 8, p 29-54, 1956.
- Florez, J. C., *et al.* **High throughput transcriptome analysis of coffee reveals prehaustorial resistance in response to *Hemileia vastatrix* infection.** *Plant. Mol. Biol.*, v 95(6), p 607-623, 2017.
- Forster, J. *et al.* **Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network.** *Genome Res*, v 13, p 244-253, 2003.
- Friso, G., van Wijk, K. J. **Update: Post-translational protein modifications in plant metabolism.** *Plant Physiology*, v 169, p 1469-1487, 2015.
- Gaudinier, A. *et al.* **Transcriptional networks governing plant metabolism.** *Current Plant Biology*, v 3-4, p 56-64, 2015.
- Gopalkrishnan, K. S. **Notes on the morphology of the genus *Hemileia*.** *Mycologia*, v 43, p 271-283, 1951.
- Großholz, R. *et al.*, **Integrating highly quantitative proteomics and genome-scale metabolic modeling to study pH adaptation in the human pathogen *Enterococcus faecalis*.** *NPJ Syst. Biol. Appl.*, v 2, p 1-9, 2016.
- Guerra-Guimarães L, *et al.* **Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*.** *Front Plant Sci.*, v6, p 478, 2015.
- Harmer, S. L. *et al.* **Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian Clock.** *Science*, v 290, p 2110–2113, 2000.
- Harmer, S. L. **The Circadian System in Higher Plants.** *Annual Review of Plant Biology*, v 60, p 357-377, 2009.
- Henry, C. S. *et al.*, **High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models.** *Nat. Biotechnology*, v 28, p 977-982, 2010.
- Hindorf, H., Omondi, C. O. *et al.*, **A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya.** *Journal of Advanced Research*, v 2, p 109-120, 2011.
- Hoppe A. **What mRNA abundances can tell us about metabolism.** *Metabolites*, v 2(3), p 614–631, 2012.
- Huber, S. C., Hardin, S. C. **Numerous posttranslational modifications provide opportunities for the intricate regulation of metabolic enzymes at multiple levels.** *Current Opinion in Plant Biology*, v 7, p 318-322, 2004.
- Kim, M. K. and Lun, D. S. **Methods for integration of transcriptomic data in genome-scale metabolic models.** *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v 11, p 59-65, 2014.
- Kolmer, J. A. *et al.* **Genetic Differentiation of the Wheat Leaf Rust Fungus *Puccinia triticina* in Pakistan and Genetic Relationship to Other Worldwide Populations.** *Phytopathology*, v 107, p 786-790, 2017.
- Kumar, R. *et al.* **Nuclear phosphoproteome of developing chickpea seedlings (*Cicer arietinum* L.) and protein-kinase interaction network.** *Journal of Proteomics*, v 105, p 58–73, 2014.
- Kwak, J. S. *et al.* **Post-translational modifications of FLOWERING LOCUS C modulate its activity.** *Journal of Experimental Botany*, v 68, p 383-389, 2016.

Landry, L. G., Chapple, C. C. S., Last, R. L. ***Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced Ultraviolet-B injury and oxidative damage**. *Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced Ultraviolet-B injury and oxidative damage*. *Plant Physiology*, v 109, p 1159–1166, 1995.

Lepoint, P. C. E. *et al.*, ***Gibberella xylarioides* Sensu Lato from *Coffea canephora*: a new mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex**. *Applied and Environmental Microbiology*, v 71, p 8466-8471, 2005.

Lewis, N. E. *et al.*, **Constraining the metabolic genotype–phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods**. *Nat Rev Microbiol.*, v 10, p 291–305, 2012.

Liesche, J. *et al.* **Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level**. *Journal of Plant Physiology*, v 168, p 1426–1433, 2011.

Lisec, J., *et al.* **Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants**. *Nat Protoc.*, v 1(1), p 387-396, 2006.

Ma, H. *et al.* **Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms**. *Bioinformatics*, v 19, p 270-277, 2003.

Magnin-Robert, M. *et al.* **Changes in Plant Metabolism and Accumulation of Fungal Metabolites in Response to Esca Proper and Apoplexy Expression in the Whole Grapevine**. *Phytopathology*, v 106, p 541-553, 2016.

Manzoni, C. *et al.* **Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences**. *Briefings in Bioinformatics*, v 19(2), p 286–302, 2016.

Martins, R. B. *et al.*, **Genetic Variability of *Cercospora coffeicola* from Organic and Conventional Coffee Plantings, Characterized by Vegetative Compatibility**. *Population Biology*, v 98, p 1205-1211, 2008.

Matiello, J. B. *et al.*, **Cultura do Café no Brasil: Novo Manual de Recomendações**. MAPA/PROCAFÉ, Fundação Procafé. p 387, 2002.

Mccook S, Vandermeer J. **The Big Rust and the Red Queen: Long-Term Perspectives on Coffee Rust Research**. *Phytopathology*, v 105(9), p1164-73, 2015.

Mehrtens, F. *et al.* **The *Arabidopsis* Transcription Factor MYB12 Is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis**. *Plant Physiology*, v 138, p 1083-1096, 2005.

Mellersh, D. G., Heath, M. C. **An investigation into the involvement of defense signaling pathways in components of the nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to rust fungi also reveals a model system for studying rust fungal compatibility**. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v 16, p 398–404, 2003.

Ministério da Agricultura, **Café no Brasil**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>. Acesso em 21 de maio de 2018.

Moussaieff, A. *et al.* **High-resolution metabolic mapping of cell types in plant roots**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v 110, p 1232-1241, 2013.

Nägele, T. & Weckwerth, W. **Mathematical modeling reveals that metabolic feedback regulation of SnRK1 and hexokinase is sufficient to control sugar homeostasis from energy depletion to full recovery**. *Frontiers in Plant Science*, v 5, art 365, 2014.

Noronha, W. H., Bettencourt, A. J. **Genetic study of resistance of *Coffea* sp to leaf rust. I. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea***

arabica to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. Can. J. Bot., v 45, p 2021-2031, 1967.

OIC, **Relatório sobre o mercado de Café**, março 2018. Disponível em <http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/relatorio_oic_marco_2018.pdf>. Acesso em 21 de maio de 2018.

Opdam, S. *et al.*, **A Systematic Evaluation of Methods for Tailoring Genome-Scale Metabolic Models**. Cell Systems, v 4, p 318-329, 2017.

Pascholatti, S.F., Leite B. **Hospedeiro: mecanismos de resistência**. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorin, L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. vol 1. Piracicaba. Editora Ceres. 415-453, 1995.

Paulus, J. K. *et al.* **Greater efficiency of photosynthetic carbon fixation due to single amino-acid substitution**. Nature Communications, doi: 10.1038/ncomms2504, 2013.

Ploetz, R. C. **Diseases of tropical perennial crops: Challenging problems in diverse environments**. Plant Dis., v 91, p644-663, 2007.

Prakash, N. S. *et al.* **Breeding for rust resistance in Arabica – where we are and what next?** In Proceedings of the 25th International Conference on Coffee Science (ASIC), Association for Science and Information on Coffee, v 10, p 8-13, 2015.

Proietti S, *et al.*, **Crosstalk between salicylic acid and jasmonate in Arabidopsis investigated by an integrated proteomic and transcriptomic approach**. Mol BioSyst., v 9, p 1169–1187, 2013.

Rajendren, R. B. **New type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix***. Nature, v 213, p 105-106, 1967.

Rodrigues Jr. C. J. *et al.* **Races of the pathogen and resistance to coffee rust**. Annu. Rev. Phytopathol., v 13, p 49-70, 1975.

Rustin, P. *et al.* **Identification of substrate and effector binding sites of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*: A possible role of phosphoenolpyruvate as substrate and activator**. The Journal of Biological Chemistry, v 263, p 17611-17614, 1988.

Sá, M. *et al.* **A liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of salicylic, jasmonic and abscisic acids in *Coffea arabica* leaves**. J Sci Food Agric., v 94, p 529–536, 2013.

Schellenberger, J. *et al.* **Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0**. Nature Protocols, v 6, p 1290-1307, 2011.

Schlieper, D. *et al.* **Resolving the Activation Site of Positive Regulators in Plant Phosphoenolpyruvate Carboxylase**. Molecular Plant, v 7, p 437-440, 2014.

Sham, A. *et al.* **Microarray analysis of *Arabidopsis* WRKY33 mutants in response to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea***. Plos One, v 12, 2017.

Shlomi T., *et al.* **Network-based prediction of human tissue-specific metabolism**. Nat. Biotechnol., v 26, p 1003-1010, 2008.

Silva, A. T., Ligterink, W. & Hilhorst, H. W. M. **Metabolite profiling and associated gene expression reveal two metabolic shifts during the seed-to-seedling transition in *Arabidopsis thaliana***. Plant Molecular Biology, v 95, p 481-496, 2017.

- Silva, M. C. *et al.*, **Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease**. *Braz. J. Plant Physiol.*, v 18, 2006.
- Silva, M. C. *et al.*, **Hypersensitive cell death and posthaustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves**. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v 60, p 169–183, 2012.
- Silva, R. A., **Caracterização de raças fisiológicas e análise de proteínas candidatas a efetoras em população de *Hemileia vastatrix* no Brasil**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p75, 2017.
- Silva-Sanchez, C., Li, H. & Chen, S. **Recent advances and challenges in plant phosphoproteomics**. *Proteomics*, v 15, p 1127-1141, 2015.
- Simpson, G. G. & Dean, C. ***Arabidopsis*, the Rosetta Stone of Flowering Time?**. *Science*, v 296, p 285–289, 2002.
- Stitt, M., Sulpice, R. & Keurentjes, J. **Metabolic Networks: How to Identify Key Components in the Regulation of Metabolism and Growth**. *Plant Physiology*, v 152, p 428-444, 2009.
- Subba, P. *et al.* **Phosphoproteomic Dynamics of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Reveals Shared and Distinct Components of Dehydration Response**. *Journal of Proteome Research*, v 12, p 5025-5047, 2013.
- Szabo, Z., & Janaky, T. **Challenges and developments in protein identification using mass spectrometry**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v 69, p 76–87, 2015.
- Talhinhas, P. *et al.* **The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics**. *Mol. Plant. Pathol.*, v 18, p 1039-1051, 2017.
- Talhinhas, P., *et al.* **Overview of the functional virulent genome of the coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* with an emphasis on early stages of infection**. *Frontiers in plant science*, v 5, p 1-17, 2014.
- The Association of Biotechnological Resources Facilities. **Delta Mass: A Database of Protein Post Translational Modifications**. Disponível em <<https://abrf.org/delta-mass>>.
- Thiele, I.; Palsson, B. O. **A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction**. *Nat Protoc*, v 5, p 93-121, 2010.
- Van der Vossen, H., *et al.* **Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review**. *Euphytica*, v 204, p 243–256, 2015.
- van Wijk, K. J. *et al.* **Meta-Analysis of *Arabidopsis thaliana* Phospho-Proteomics Data Reveals Compartmentalization of Phosphorylation Motifs**. *The Plant Cell*, v 26, p 2367-2389, 2014.
- Várzea, V. M. P. e Marques, D. V. **Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance**. In *Durable resistance to coffee leaf rust* (Zambolim, L., Zambolim, E. and Várzea, V.M.P., eds.), p 53–74, 2005.
- Várzea, V. M. P. *et al.* **Resistência do cafeeiro à Antracnose-dos-frutos-verdes**. In: Zambolim, L. *O estado da arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa, MG: UFV, p 321-368, 2002.
- Várzea, V. M. P., *et al.* **Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance**. In: Zambolim, L.; Zambolim, E.M.; Várzea, V.M.P. (Ed.). *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa: UFV. p 53-74, 2005.

- Vega, F. E. *et al.*, **Coffee Insects: Ecology and Control**. Encyclopedia of Pest Management, p 1-4, 2006.
- Ventura, J. A. *et al.*, **Diagnóstico e Manejo das Doenças do Cafeeiro Conilon (*Coffea canephora*)**. Café Conilon. 1ª Ed., p 453-497, 2007.
- Vlassis N. *et al.* **Fast reconstruction of compact context-specific metabolic network models**. PLoS Comput.,v 10, p 1-10, 2014.
- Wang Y. *et al.* **Reconstruction of genome-scale metabolic models for 126 human tissues using mCADRE**. BMC Syst. Biol., v 6, p 1-16, 2012.
- Wang, Z. *et al.*, **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics**. Nat Rev Genet., v 10, p 57–63, 2009.
- Wang, Z. Y. *et al.* **A Myb-Related Transcription Factor is Involved in the Phytochrome Regulation of an *Arabidopsis* Lhcb Gene**. The Plant Cell Online, v 9, p 491–507, 1997.
- Wang, Z. Y., Tobin, E. M. **Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression**. Cell, v 93, p 1207–1217, 1998.
- Westerhoff, H. V., *et al.* **The evolution of molecular biology into systems biology**. Nature Biotechnology, v 22, p 1249-1252, 2004.
- Zambolim, L. *et al.* **Current status and management of coffee leaf rust in Brazil**. Trop. Plant Pathol., v 41, p 1-8, 2016.
- Zhang, C. *et al.*, **Applications of genome-scale metabolic models in biotechnology and systems medicine**. Frontiers in Physiology, v 6, p 1-8, 2016.
- Zheng, Z. L. **Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants**. Plant Signaling & Behavior, v 4, p 584-591, 2009.

Lizandra Cristina de Oliveira Figueiredo Gazolla

Capítulo 2

**Modelagem matemática do metabolismo do café durante a infecção por
Hemileia vastatrix revela mecanismo de resistência mediado por
glicerol-3-fosfato**

VIÇOSA - MG

2018.

RESUMO

A produção de café vem sendo afetada em todo o mundo pela ferrugem alaranjada do cafeeiro, doença causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. A principal forma de controle baseia-se na utilização de cultivares resistentes derivados de cruzamentos do café arábica com o Híbrido de Timor. Entretanto, o alto potencial adaptativo do fungo implica no surgimento de raças fisiológicas capazes de suplantar a resistência de alguns cultivares utilizados. Para compreender os mecanismos de resistência do Híbrido de Timor, foram feitas análises do transcriptoma e sua integração ao modelo metabólico construído, comparando o metabolismo primário deste cultivar ao Caturra – susceptível à ferrugem. Os resultados do transcriptoma indicaram uma resposta antecipada do cafeeiro resistente bem como uma resposta única deste cultivar em 24 horas após a infecção. Além disso, a avaliação do fluxo da via glicolítica apontou um acúmulo de glicerol-3-fosfato (G3P) no Híbrido de Timor, metabólito envolvido na resposta imune adquirida em outras plantas. A inclusão de dados de metabolômica ao modelo e estudos sobre o papel do G3P no cafeeiro contribuirão para uma melhor compreensão da influência do metabolismo primário na resistência à ferrugem.

INTRODUÇÃO

O café é uma importante commodity internacional e o Brasil é o seu maior produtor seguido por Vietnã e Colômbia ^[1]. As espécies mais cultivadas mundialmente são o *Coffea arabica* e o *Coffea canephora* ^[1]. O café arábica tem maior valor comercial por resultar em uma bebida de melhor qualidade, entretanto, essa espécie tem como desvantagem a susceptibilidade a diversas doenças ^[2].

A doença do cafeeiro de maior relevância no cenário mundial é a ferrugem, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* ^[3]. O principal sintoma é o aparecimento de manchas amareladas na parte abaxial das folhas e, em condições climáticas favoráveis, as perdas na lavoura podem chegar a 50% da produção ^[3-4].

O Híbrido de Timor 832/2 tem sido uma importante fonte de genes de resistência para os programas de melhoramento, entretanto, o alto potencial adaptativo do fungo e a própria pressão seletiva causada pela utilização de cultivares resistentes vem culminando no surgimento de diversas raças fisiológicas do fungo capazes de suplantar a resistência obtida através dos métodos clássicos de melhoramento ^[5-9].

A resistência do café à ferrugem segue a teoria gene-a-gene postulada por Flor, tendo sido descobertos até o momento nove genes dominantes (S_H1-S_H9) de resistência em café e nove genes de avirulência (v1-v9) em *Hemileia vastatrix* ^[10-13]. Diferentes estudos vêm mostrando que o Híbrido de Timor 832/2 responde à infecção de forma pré-haustorial enquanto que as plantas susceptíveis respondem de forma lenta ou tardia ^[14-17]. Alguns metabólitos como o glicerol-3-fosfato e o ácido pipercolico também aparentam ter função na resposta imune de plantas ativando a resposta imune sistêmica adquirida (SAR), entretanto a literatura carece de estudos sobre o papel destes metabólitos na imunidade dos cafeeiros ^[18-19].

A análise de balanço de fluxo (FBA) é uma importante ferramenta da biologia de sistemas pois permite prever a taxa de crescimento ou produção de metabólitos de um organismo ^[20]. O método calcula os fluxos metabólicos a

partir de uma matriz estequiométrica e utiliza a otimização linear para encontrar a melhor representação do modelo metabólico [21].

Assim, o presente trabalho tem como objetivo utilizar uma nova abordagem no estudo da relação parasito-hospedeiro através da integração de dados de genômica e transcriptômica para a construção de modelos metabólicos específicos, buscando compreender diferenças no metabolismo primário entre os cultivares resistente e susceptível.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos dados de genômica e transcriptômica

As sequências das proteínas preditas com base no genoma previamente sequenciado de *Coffea canephora* [22] foram obtidas do *Coffee Genome Hub* (<http://coffee-genome.org/>) e os dados brutos de transcriptoma foram fornecidos por Florez e equipe [14]. O transcriptoma foi realizado utilizando o Híbrido de Timor CIFC 832/1 como cultivar resistente e o *C. arabica* cv. Caturra CIFC 19/1 como cultivar susceptível. As folhas destes cafeeiros foram infectadas com esporos de *Hemileia vastatrix* raça XXXIII e a extração de RNA foi feita após 12, 24, 96 horas e 17 dias após a infecção. Folhas não infectadas foram utilizadas como controle.

Construção do modelo

A construção do modelo metabólico foi feita no servidor Model SEED (<http://modelseed.org/>), uma ferramenta online de construção, análise e otimização de modelos metabólicos, utilizando os parâmetros padrão do servidor.

A plataforma gerou um modelo baseado nas enzimas codificadas pelo genoma do *Coffea canephora* (v1.0) e não foi necessária a adição de reações artificiais. O modelo gerado foi manipulado no pacote COBRA toolbox (*CO*nstraint-*B*ased *R*econstruction and *A*nalysis *T*oolbox) [23] em MATLAB 2015a [24], onde foi feita a Análise de Balanço de Fluxo (FBA).

Análise do transcriptoma

Os dados brutos obtidos da plataforma *Illumina Miseq* foram primeiramente avaliados quando a sua qualidade utilizando o software *FastQC* versão 0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Em seguida, os dados foram refinados com o software *Trimmomatic* [25] onde foram removidas as sequências de adaptadores, *reads* muito pequenas e *reads* com valor de *phred* menor que 15. As *reads* restantes foram submetidas a uma nova análise de qualidade pelo *FastQC*. O genoma de referência foi indexado com o programa *Bowtie2-build* [26] e as *reads* foram alinhadas no genoma com o software *Tophat* [27]. Os resultados foram usados para quantificar os transcritos e estimar a expressão diferencial dos genes com o programa *Cuffdiff* [28].

Após, foram obtidos os dados de *fold change* (FC), calculado a partir dos valores de FPKM encontrados no *Cuffdiff* para os cultivares nos diferentes tempos após a infecção ($FC_{\text{tempo}} = \text{FPKM resistente} / \text{FPKM susceptível}$). Genes para os quais $FC \geq 2$ e $FC \leq 0,5$ foram considerados como up-regulados para os cultivares resistente e susceptível, respectivamente. A contagem destes genes está apresentada nos Diagramas de Venn.

Além disso, os valores de FPKM foram utilizados na plataforma R (versão 3.4.0) para a análise do componente principal (PCA) e construção de *heatmaps*, agrupados por vias metabólicas, com o auxílio do pacote *gplots* (versão 3.0.1).

Integração do transcriptoma ao modelo metabólico

Os genes e dados de *fold change* (FC), calculados anteriormente, foram utilizados na integração ao modelo metabólico para gerar os modelos contexto-específicos. Para isso, foi utilizado o pacote GIMME (*Gene Inactivity Moderated by Metabolism and Expression*) [29], disponível no COBRA toolbox [23] em Matlab versão 2015a [24], utilizando $FC \geq 2$ como *threshold*, a fim de incorporar ao modelo apenas os genes up-regulados no cultivar resistente.

Após a obtenção dos modelos contexto-específicos, foi feita a FBA e este resultado foi utilizado para a construção dos gráficos de fluxo metabólico.

As reações da via glicolítica foram recuperadas do ModelSEED e os dados de fluxo calculados na FBA foram utilizados para avaliar alterações nas reações.

Extração de metabólitos e quantificação de glicose

O cultivar resistente Híbrido de Timor CIFC-832/2 e o susceptível *C. arabica* cv. Caturra CIFC 19/1 foram transferidos para uma sala de aclimatização, onde foram infectados com esporos de *Hemileia vastatrix* raça XXXIII. O controle foi feito com folhas dos dois cultivares sem infecção. Em cada planta foram infectadas três folhas para a extração de metabólitos. Além do tempo zero, as folhas foram coletadas com 12, 24 e 96 horas após a infecção.

A extração foi feita conforme descrito por Lisec e colaboradores ^[30] com algumas adaptações. As folhas coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido a fim de paralisar o metabolismo das mesmas. Em seguida, as folhas foram maceradas e cerca de 100mg de tecido foi transferido para microtubos previamente identificados. Foram adicionados 1400 µL de metanol a -20 °C, 60 µL de Ribitol (0,2 mg/mL) a 4 °C e 60 µL de Ácido crotônico (5 mM) a 4 °C e as amostras foram vortexadas por 10 segundos. As amostras ficaram sob agitação no Themomix por 10 minutos a 4 °C e 950 rpm e depois foram centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 7500 rpm. O sobrenadante foi igualmente dividido em novos tubos microtubos resistentes a clorofórmio, onde foram adicionados 375 µL de clorofórmio a -20 °C e 700 µL de água destilada a 4 °C. Após 10 segundos de vórtex, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4 °C e 4500 rpm. Por fim, 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e as amostras foram secas no liofilizador e armazenadas a -80 °C.

A glicose foi quantificada utilizando-se HPLC com auxílio do professor-doutor Hilário Mantovani. A significância da variação na concentração de glicose foi avaliada pelo teste-t não pareado (p-valor < 0,05) utilizando o *GraphPad Prism 5.01* (*GraphPad Software*, San Diego, EUA).

RESULTADOS

Reconstrução do modelo metabólico baseado no genoma

O genoma de *Coffea canephora* tem em média 710 Mb e foram anotadas 25574 sequências codificadoras de proteínas [22]. Após a geração do modelo metabólito para *Coffea canephora*, utilizando o ModelSEED, foram encontrados 1140 genes, além de 1084 reações metabólicas e 1162 metabólitos, distribuídos em onze compartimentos subcelulares e espaço extracelular. Dentre estes, foram identificadas 19 vias do metabolismo primário (carboidratos, lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos), totalizando 214 reações únicas, cerca de 500 genes e 300 metabólitos únicos (tabela 1).

Tabela 1. Número de reações, genes e metabólitos totais obtidos no modelo gerado pelo ModelSEED para *Coffea canephora*. A linha “total único” elimina da contagem genes, reações e metabólitos compartilhados entre diferentes vias.

Via Metabólica	Contagem		
	Reações	Genes	Metabólitos
Glicólise/Gliconeogênese	23	120	45
Ciclo do Ácido Cítrico	7	27	29
Via das pentoses fosfato	9	34	24
Metabolismo de Frutose e Manose	1	5	2
Interconversão Pentose e Glucuronato	3	11	11
Metabolismo de Ácidos Graxos	23	34	56
Metabolismo de Pirimidinas	27	59	51
Metabolismo de Purinas	25	64	57
Biossíntese de Ubiquinonas	12	26	36
Metabolismo de Lisina	8	20	24
Metabolismo de Alanina, Aspartato e Glutamato	14	47	45
Metabolismo de Glicina, Serina e Treonina	18	38	44
Metabolismo de Cisteína e Metionina	19	53	54
Metabolismo de Valina, Leucina e Isoleucina	7	17	20
Metabolismo de Arginina e Prolina	19	46	48
Metabolismo de Histidina	8	11	19
Metabolismo de Fenilalanina, Tirosina e Triptofano	9	52	54
Metabolismo de β -Alanina	4	11	17
TOTAL ÚNICO	214	488	323

Os fluxos observados para a simulação são apresentados na figura 1, agrupando as reações em suas respectivas vias metabólicas (código das reações – anexo 1). É possível observar que algumas reações apresentaram fluxo zero, indicando estado de equilíbrio termodinâmico ^[31], enquanto outras apresentaram fluxo máximo (+1000 e -1000). De maneira geral, observamos maior atividade das enzimas nas vias relacionadas a metabolismo de carboidratos (figura 1A e 1B), lipídeos (figura 1C) e alguns aminoácidos, como alanina, aspartato e glutamato (figura 1G), glicina, serina e treonina (figura 1H) e fenilalanina, tirosina e triptofano (figura 1H).

Análise do transcriptoma dos cafeeiros infectados por *H. vastatrix*

Os cultivares Híbrido de Timor (CIFC-832/2) – resistente – e Caturra CIFC 19/1 – susceptível – foram infectados com *H. vastatrix* e após intervalos de 0, 12, 24 e 96 horas após a infecção (*h.a.i.*) foram obtidos os extratos de RNA total, posteriormente submetidos a sequenciamento (RNAseq) ^[14].

Entre as 25574 sequências codificadoras de proteínas existentes (Coffea Hub), foi possível identificar genes unicamente expressos nos diferentes cultivares e durante os intervalos de tempo em análise, de acordo com a figura 2. Entre estes, destaca-se a identificação de genes expressos de forma exclusiva entre os cultivares na hora zero (sem infecção), sinalizando para a existência de possíveis marcadores moleculares de interesse para programas de melhoramento de café ^[31-32]. Entre estes, é possível identificar genes unicamente expressos em vias do metabolismo primário, como via glicolítica / gliconeogênese, via das pentoses fosfato e metabolismo de aminoácidos (anexo 2).

Figura 1. Continua..

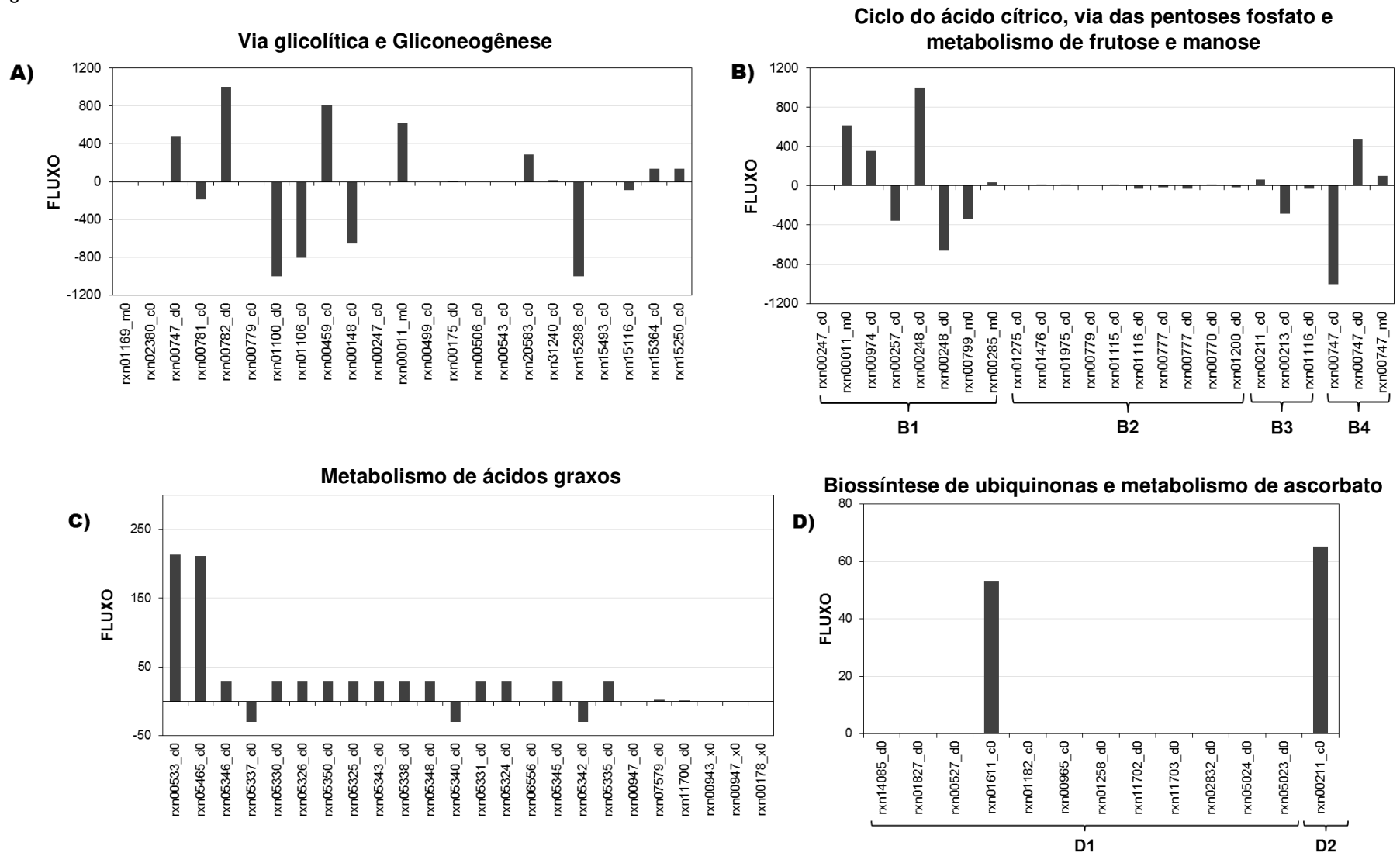
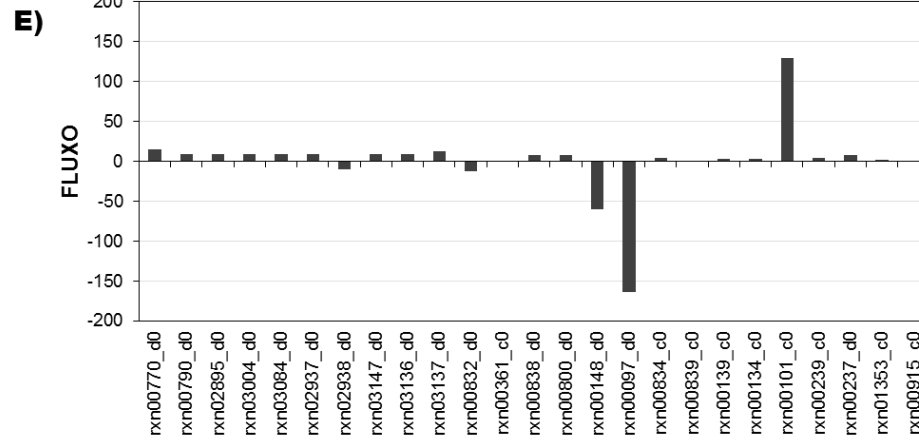
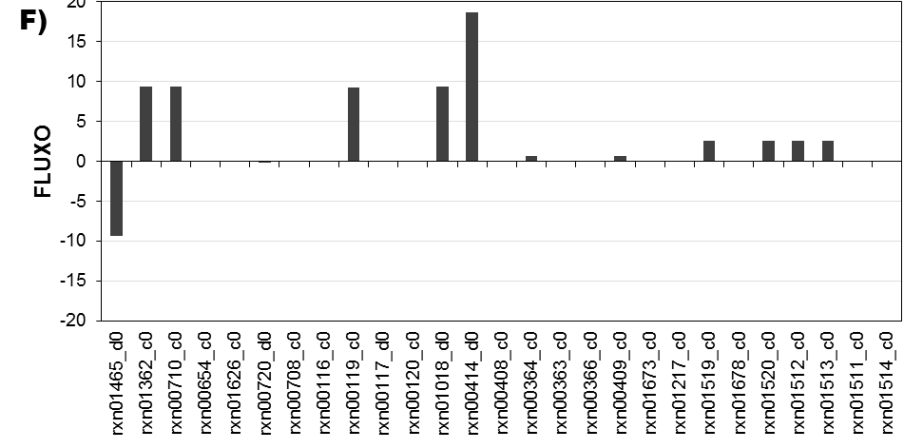


Figura 1. Continua

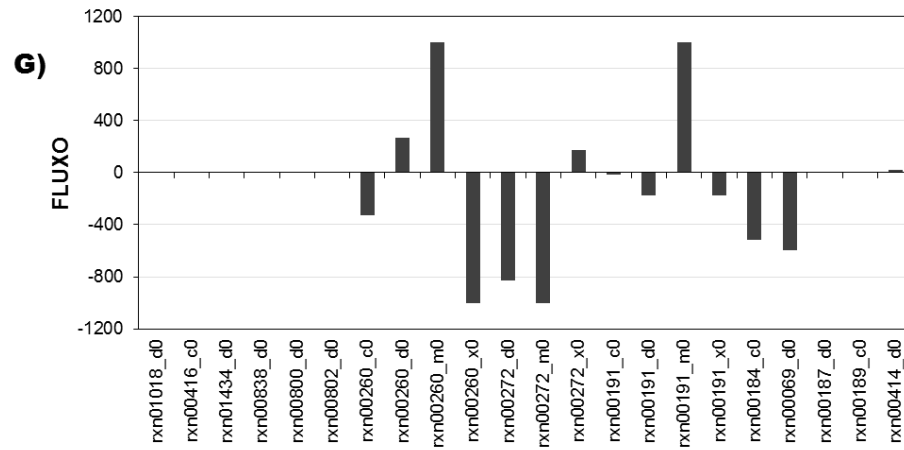
Metabolismo de purinas



Metabolismo de pirimidinas



Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato



Metabolismo de glicina, serina e treonina

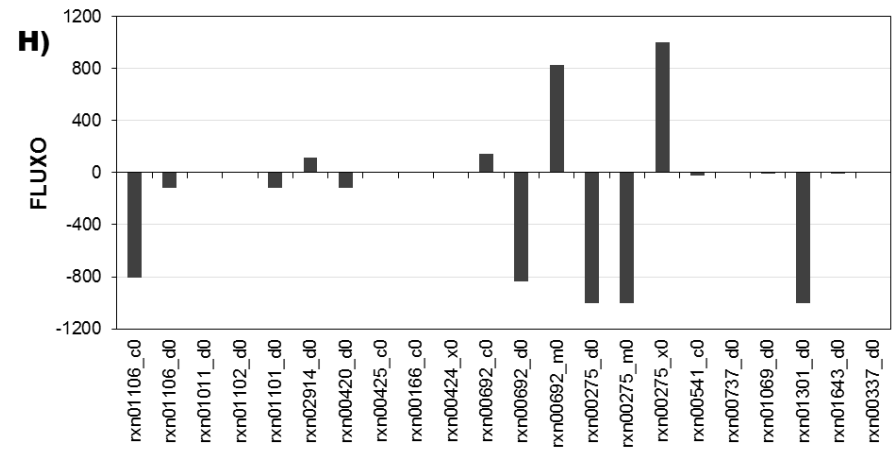


Figura 1. Continua...

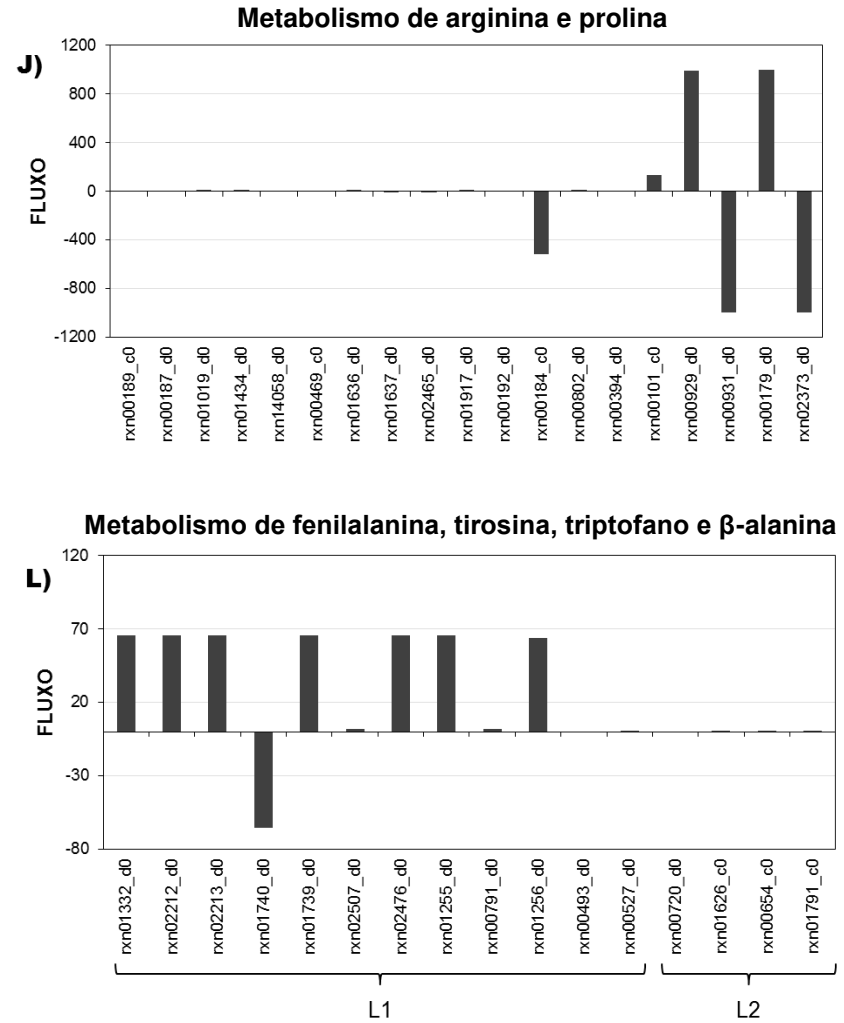
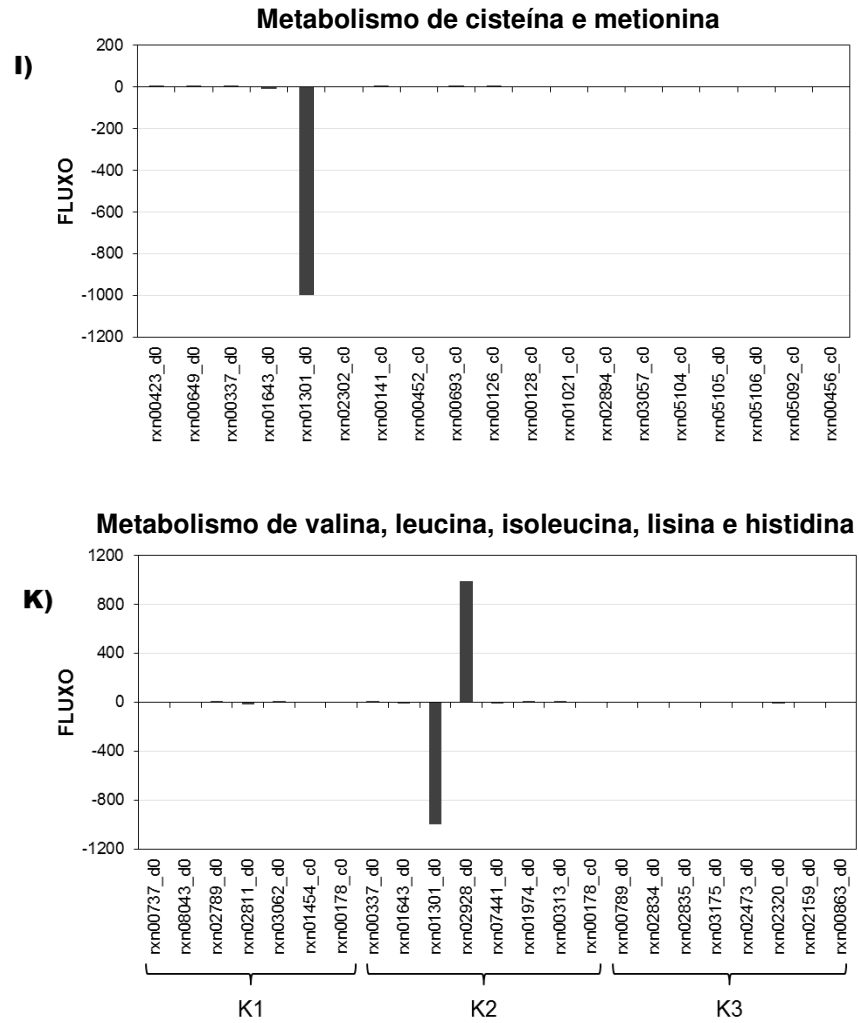


Figura 1. Simulação do fluxo metabólico do modelo baseado no genoma de *Coffea canephora* por FBA. O código abaixo de cada barra indica a reação da via (anexo 1) e o valor (positivo ou negativo) indica a direção do fluxo da reação (fluxo positivo indica formação de produto – metabólitos à direita da reação; fluxo negativo indica sentido contrário da reação favorecida – metabólitos à esquerda da reação). **A**, Via glicolítica e gliconeogênese; **B1**, Ciclo do ácido cítrico; **B2**, Via das pentoses fosfato; **B3**, Interconversão pentose-glucoronato; **B4**, Metabolismo de Frutose e Manose; **C**, Metabolismo de ácidos graxos; **D1**, Biossíntese de ubiquinonas, **D2**, Metabolismo de ascorbato; **E**, Metabolismo de purinas; **F**, Metabolismo de pirimidinas; **G**, Metabolismo de Alanina, Aspartato e Glutamato; **H**, Metabolismo de Glicina, Serina e Treonina; **I**, Metabolismo de Cisteína e Metionina; **J**, Metabolismo de Arginina e Prolina; **K1**, Metabolismo de Valina, Leucina e Isoleucina; **K2**, Metabolismo de Lisina; **K3**, Metabolismo de Histidina; **L1**, Metabolismo de Fenilalanina, Tirosina e Triptofano; **L2**, Metabolismo de Beta-alanina.

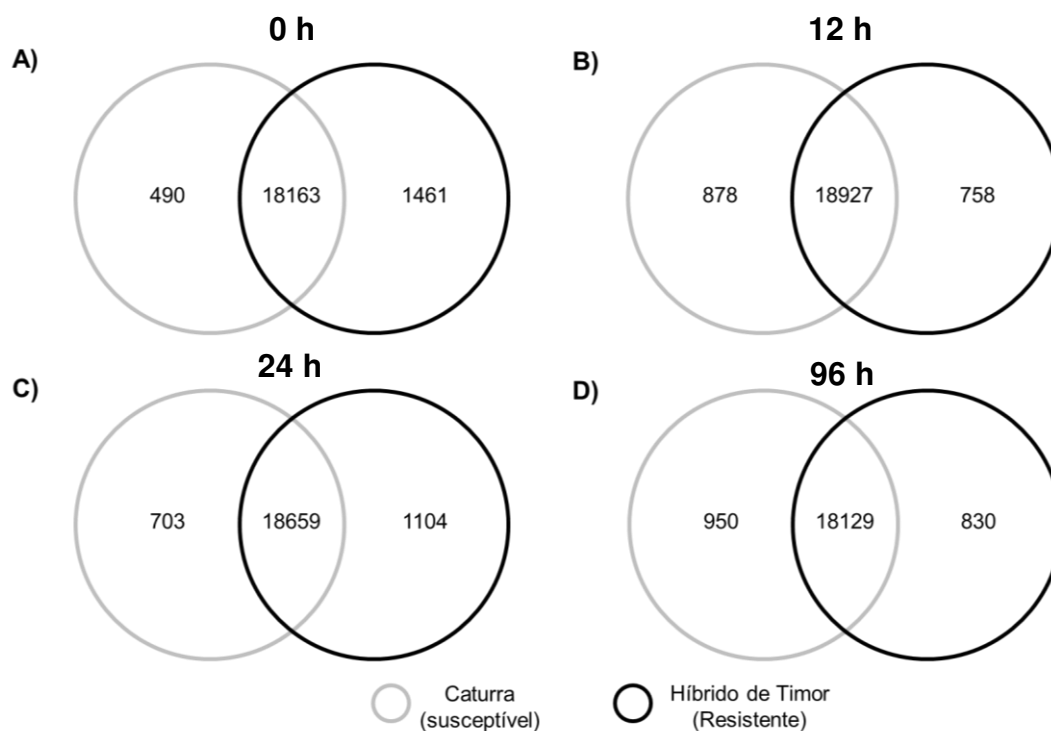


Figura 2. Genes unicamente expressos nos cafeeiros resistente e susceptível, 0 (A), 12 (B), 24 (C) e 96 (D) horas após a infecção com o fungo *Hemileia vastatrix*.

Ao analisarmos os genes diferencialmente expressos nas vias relacionadas ao metabolismo primário (*fold-change* > 2) entre os cultivares em estudo, observa-se uma diferença ainda mais impactante (figura 3). De maneira geral, as maiores diferenças são observadas nos períodos de 12 e 24 *h.a.i.*, devido provavelmente às respostas fisiológicas da planta ao estresse biótico submetido. Além disso, é curioso notar que o Híbrido de Timor apresenta um

número maior de genes *up*-regulados e/ou unicamente expressos nas vias em análise, indicando uma resposta potencialmente mais intensa.

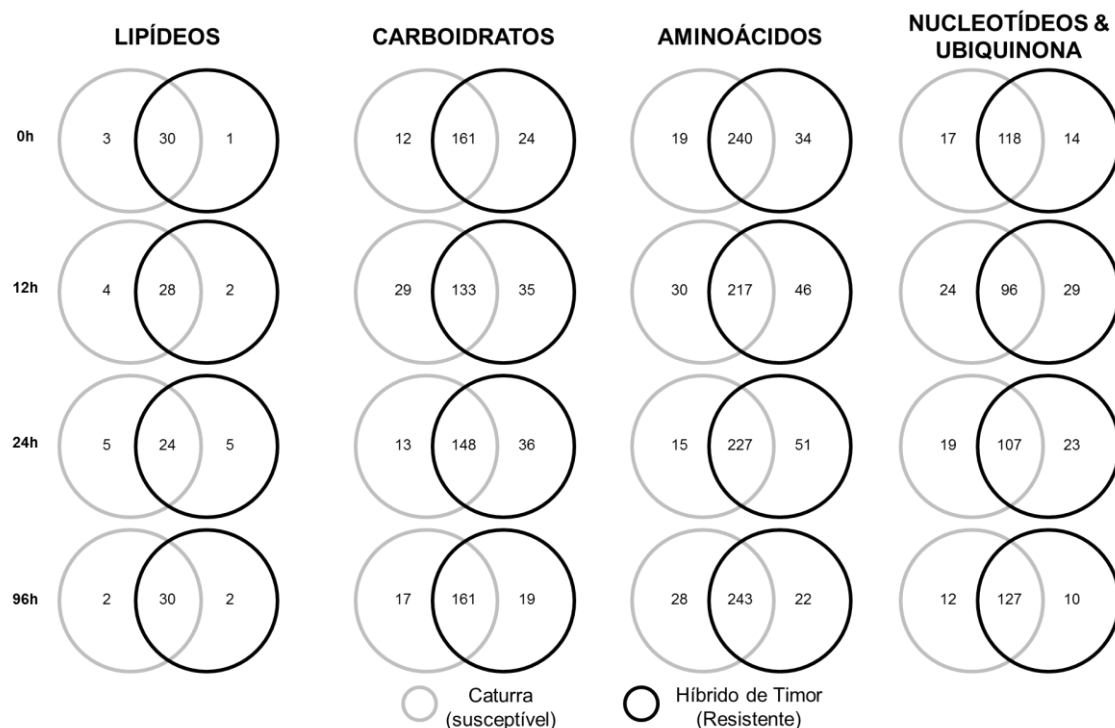


Figura 3. Genes diferencialmente expressos nos cafeeiros resistente e susceptível após a infecção por *Hemileia vastatrix*, agrupados por vias do metabolismo primário. Os números em cada círculo indicam a quantidade de genes *up*-regulados no cultivar correspondente; os números na interseção representam a quantidade de genes que não apresentam diferença de expressão.

A análise do componente principal (PCA), utilizando apenas os dados de FPKM do transcriptoma relacionados às vias metabólicas centrais, apresenta indicativos das respostas celulares dos cultivares (figura 4 A). É interessante notar que o perfil de expressão gênica nas plantas h0 foi intermediário ao observado nas plantas c0 e c12. Entretanto, ao analisarmos os intervalos de tempo de 12 e 24 horas, observa-se que a resposta apresentada pelo Híbrido de Timor h12 se assemelha mais ao observado para o Caturra C1FC 19/1 c24. Além disso, observa-se para h24 uma resposta única, possivelmente o determinante para a resistência do cafeeiro. A contagem de genes diferencialmente expressos (figura 4 B), do metabolismo primário, para estes tratamentos reitera o que foi constatado na análise do PCA.

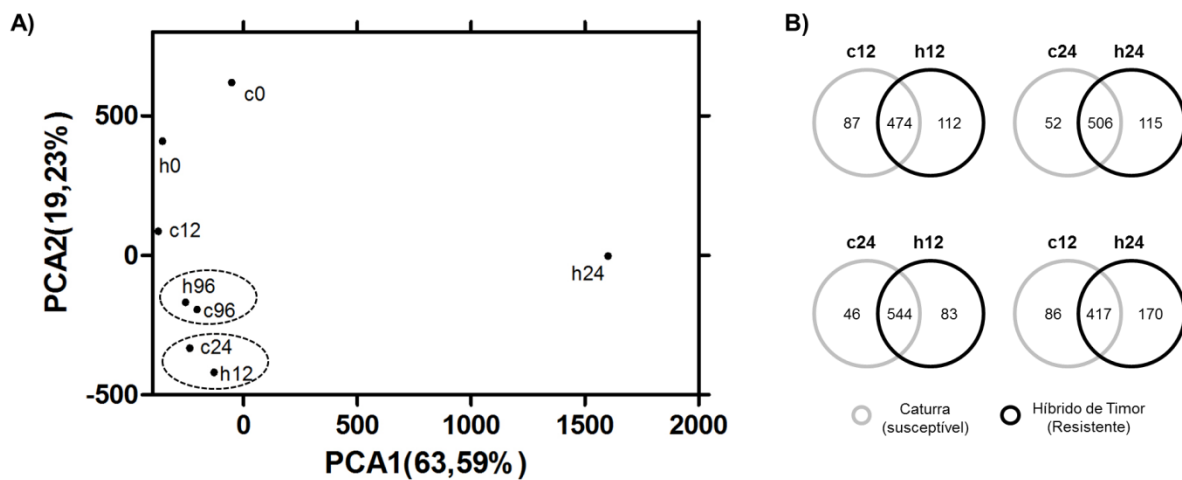


Figura 4. Análise da relação da expressão de genes do metabolismo primário entre os cultivares Híbrido de Timor (h) e Caturra (c), através de PCA (A). O Diagrama de Venn (B) apresenta a relação do número total de genes do metabolismo primário, agrupados por cultivar. Em cada círculo, está apresentada a contagem de genes únicos e diferencialmente expressos para cada cultivar, enquanto a interseção apresenta o número de genes expressos em ambos os cultivares e que não apresentam diferença de expressão.

Ao analisarmos o PCA dos genes das vias metabólicas agrupadas em metabolismo de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos (figura 5), confirma-se a resposta diferenciada do Híbrido de Timor 24 *h.a.i.* e percebe-se que essa resposta única também ocorre em 96 *h.a.i.* para o metabolismo de nucleotídeos e aminoácidos.

Análise do perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo primário

Heatmaps de expressão para os genes envolvidos nas principais vias metabólicas identificadas no modelo foram construídos para tentar correlacionar a alteração da expressão às vias centrais do metabolismo do cafeeiro (figura 6). De modo geral, antes da infecção, os cafeeiros não apresentaram muitas diferenças no metabolismo primário, sendo que as maiores alterações na expressão gênica ocorreram entre 12 e 24 horas após a infecção. Para algumas vias como a glicólise / gliconeogênese, (figura 6 A) foi possível observar uma separação das respostas apresentadas pelo Híbrido de Timor e o Caturra. Em vias como a das pentoses fosfato (figura 6 C), por

exemplo, foi possível observar o agrupamento da resposta do cultivar resistente em 12 horas com a resposta do cultivar susceptível em 24 horas, resultado similar ao observado na análise do PCA (figura 5 D). Também foi possível notar um perfil de expressão único no Híbrido em 24 *h.a.i.* para vias como metabolismo de glicina, serina e treonina (figura 6 H).

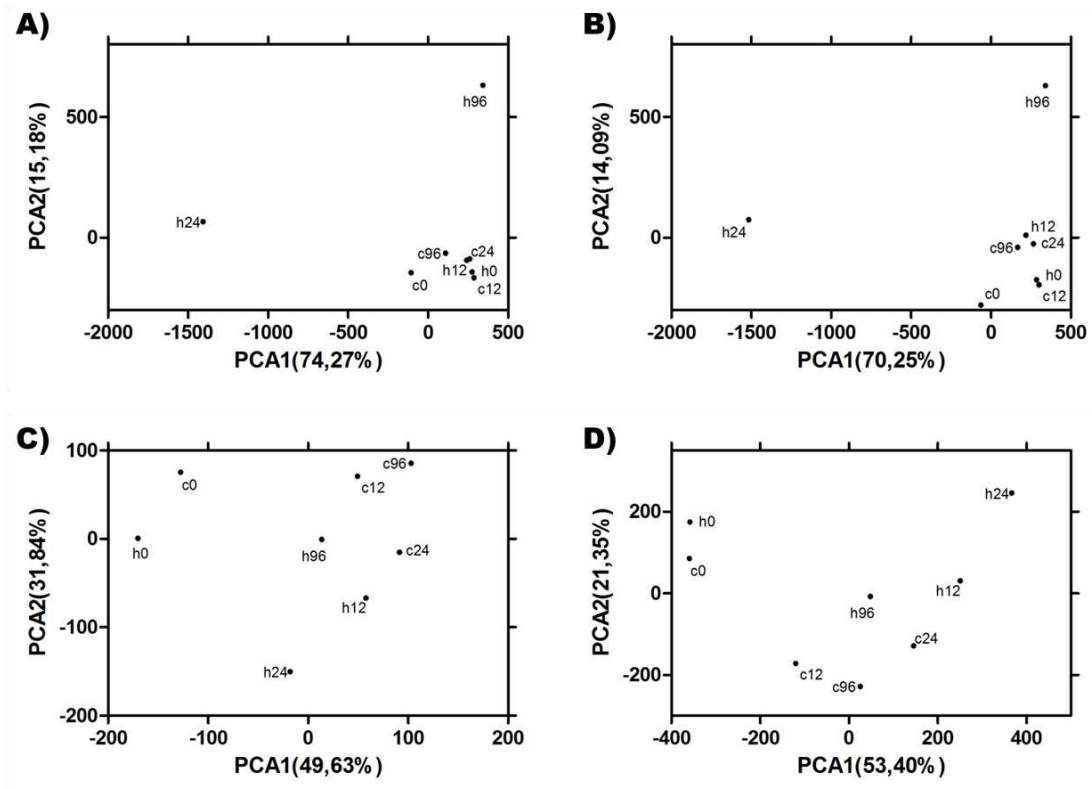


Figura 5. Análise da relação da expressão de genes do metabolismo primário entre os cultivares Híbrido de Timor (h) e Caturra CIFC 19/1(c), através de PCA. **A**, Nucleotídeos; **B**, Aminoácidos; **C**, Ácidos graxos e **D**, Carboidratos.

Figura 6. Continua...

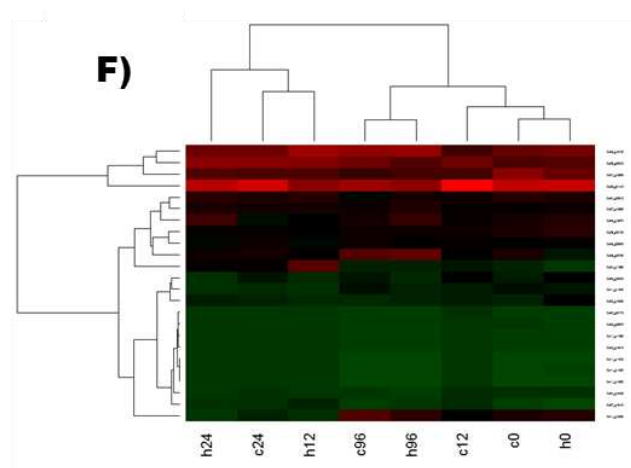
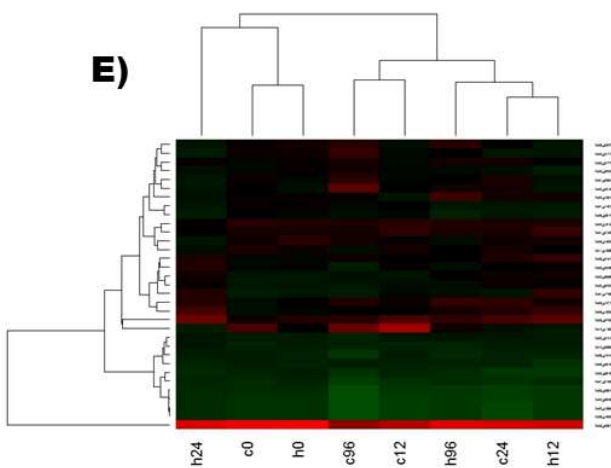
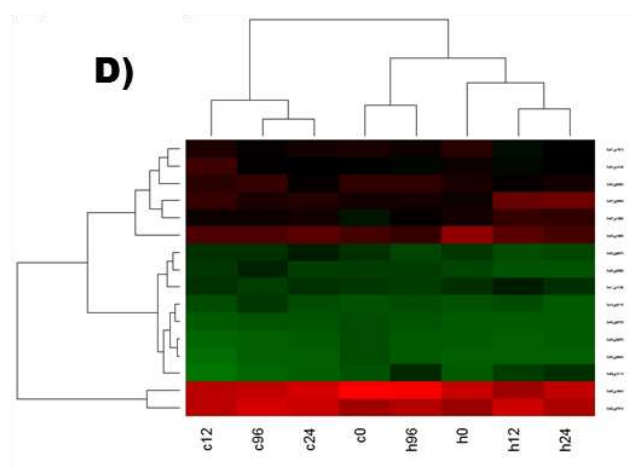
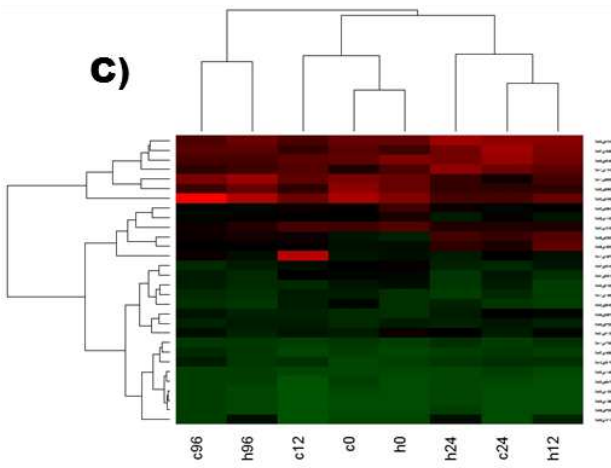
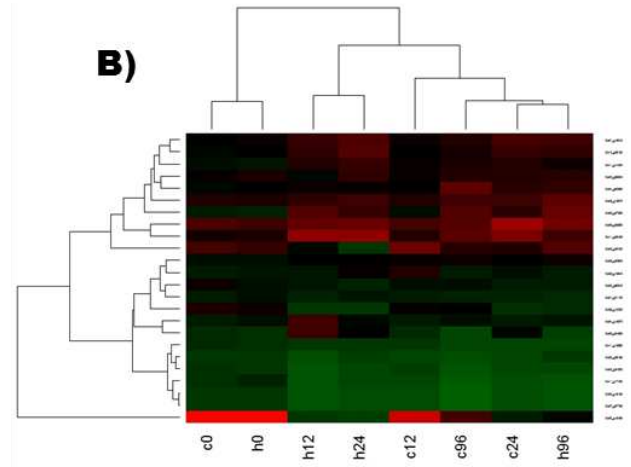
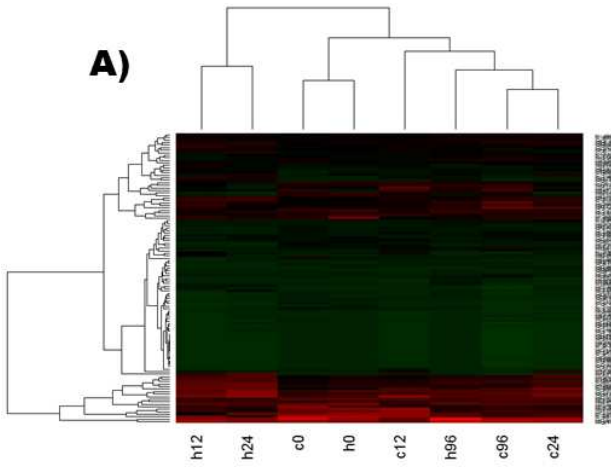
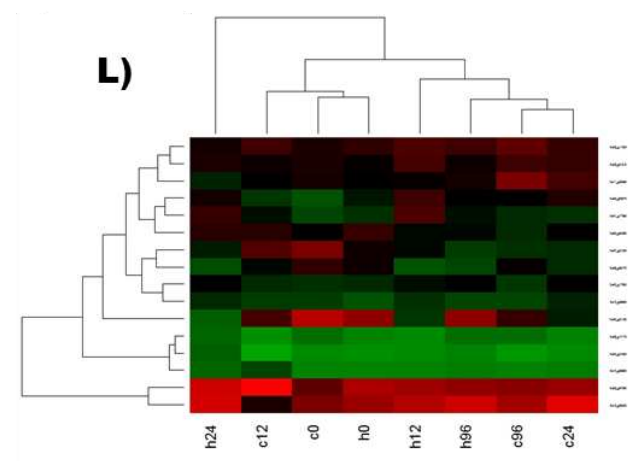
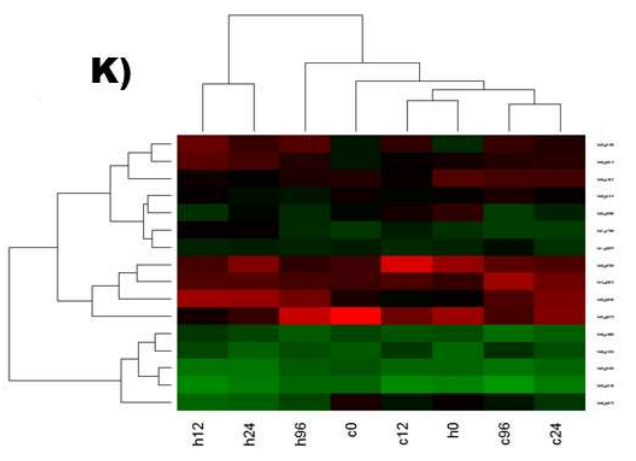
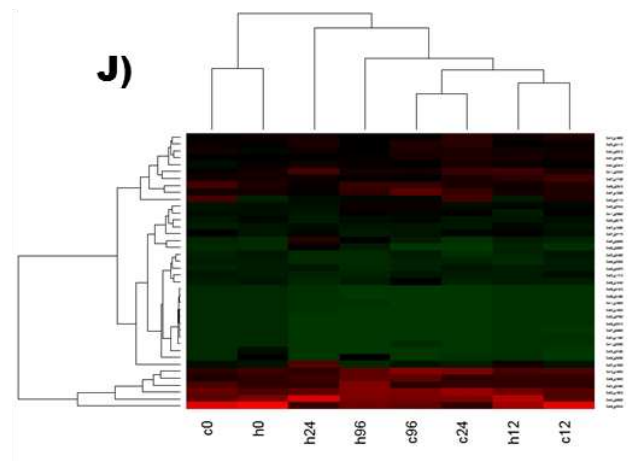
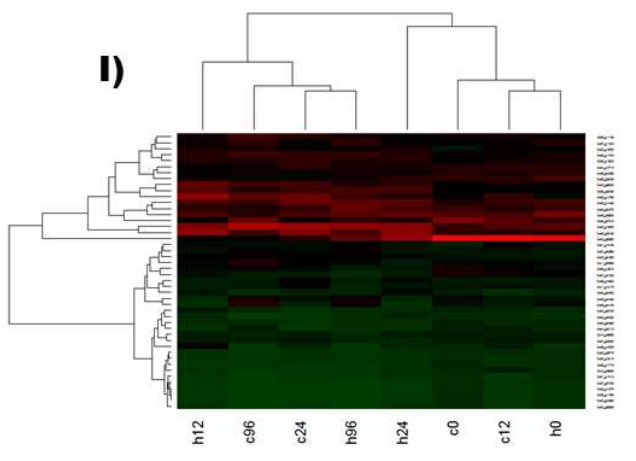
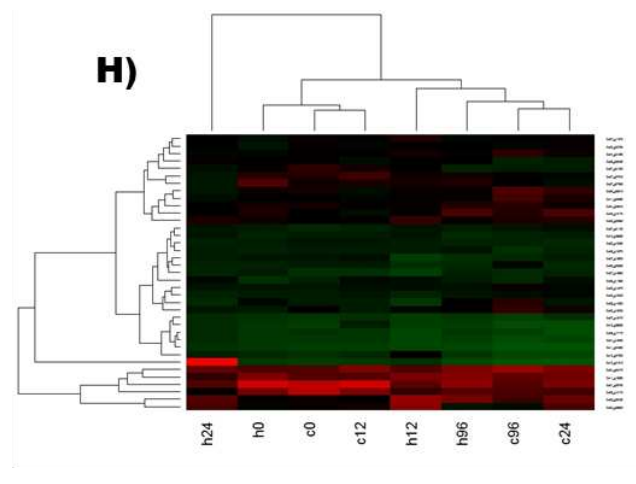
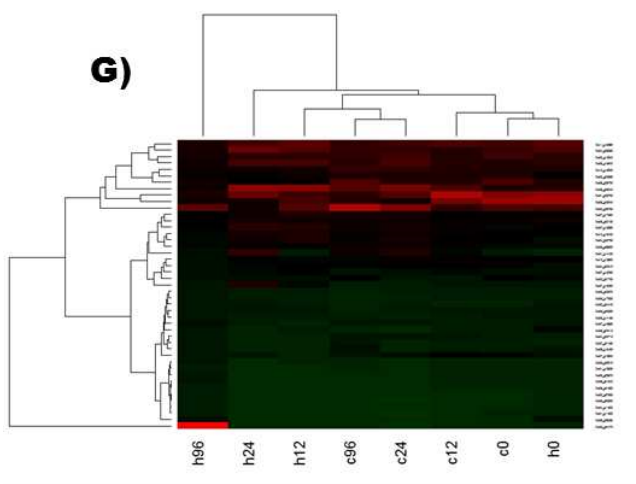


Figura 6. Continua...



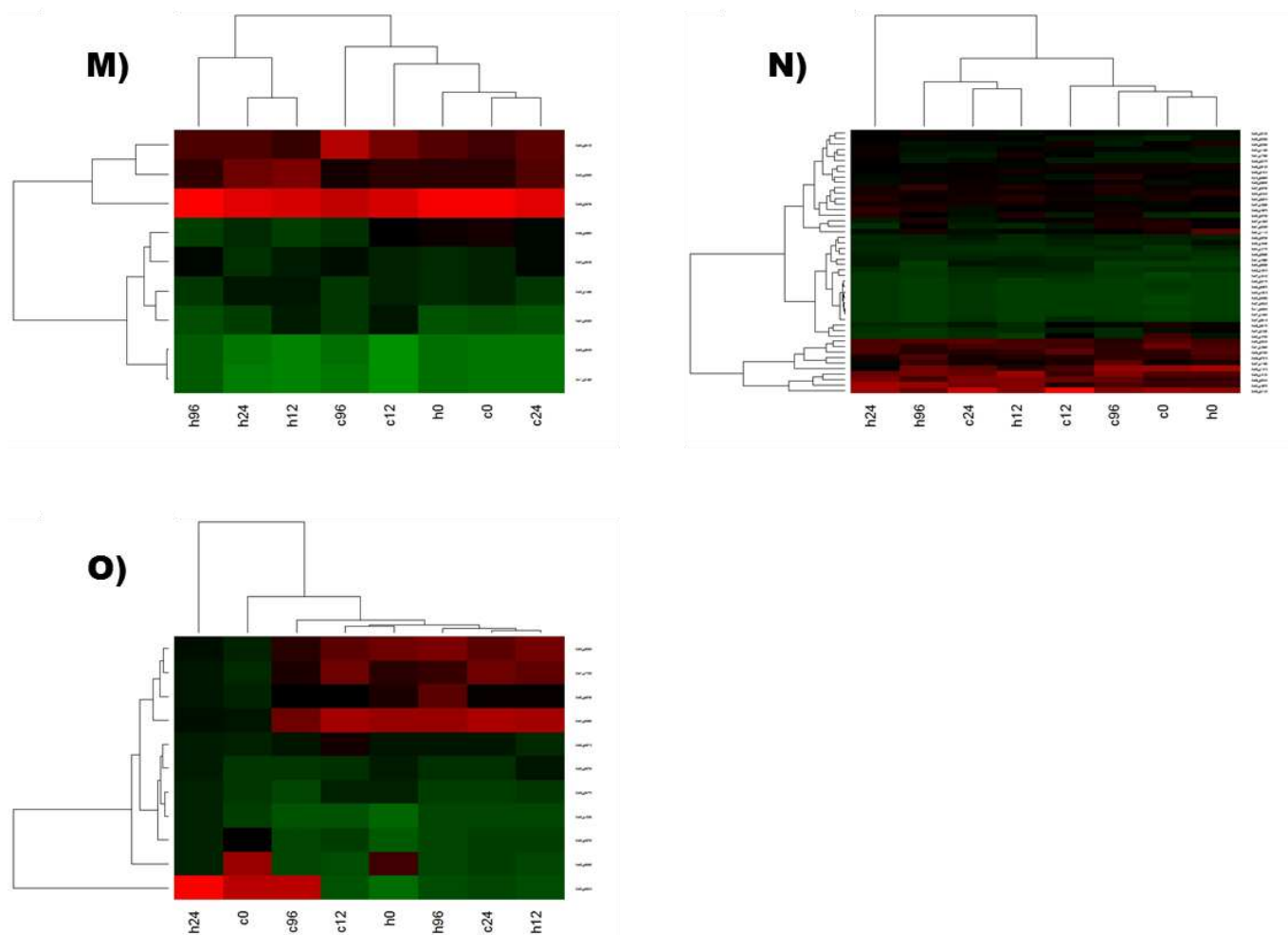


Figura 6. *Heatmaps* de expressão gênica nos cultivares susceptível (c) e resistente (r) ao longo dos tempos testados (0, 12, 24 e 96h), agrupados por vias metabólicas. **A**, Via glicolítica / gliconeogênese; **B**, Ciclo do Ácido Cítrico; **C**, Via das Pentoses Fosfato; **D**, Metabolismo de Frutose, Manose e Glucuronato; **E**, Metabolismo de Ácidos Graxos; **F**, Biossíntese de Ubiquinonas e Terpeno-quinonas; **G**, Metabolismo de Alanina, Aspartato e Glutamato; **H**, Metabolismo de Glicina, Serina e Treonina; **I**, Metabolismo de Cisteína e Metionina; **J**, Metabolismo de Arginina e Prolina; **K**, Metabolismo de Valina, Leucina e Isoleucina; **L**, Metabolismo de Lisina; **M**, Metabolismo de Histidina; **N**, Metabolismo de Fenilalanina, Tirosina e Triptofano; **O**, Metabolismo de Beta-alanina.

Impacto da integração dos dados de transcriptômica ao fluxo do metabolismo primário

Com os dados de expressão diferencial obtidos no pacote Cuffdiff, foi calculado o *fold-change* com os valores de FPKM do cultivar resistente e susceptível. Para avaliar o efeito dos genes up-regulados no Híbrido de Timor,

foi utilizado o *fold-change* igual ou superior a 2 como ponto de corte para o programa GIMME. Após a integração dos dados ao modelo baseado no genoma, foram gerados quatro modelos contexto-específicos (0, 12, 24 e 96h) e os fluxos preditos para cada reação foram comparados entre os diferentes modelos. De modo geral, não foi possível observar grandes variações entre os fluxos para a maioria das vias metabólicas avaliadas (dados não apresentados). A via glicolítica / gliconeogênese e o ciclo do ácido cítrico foram os que apresentaram maior variação (figura 7).

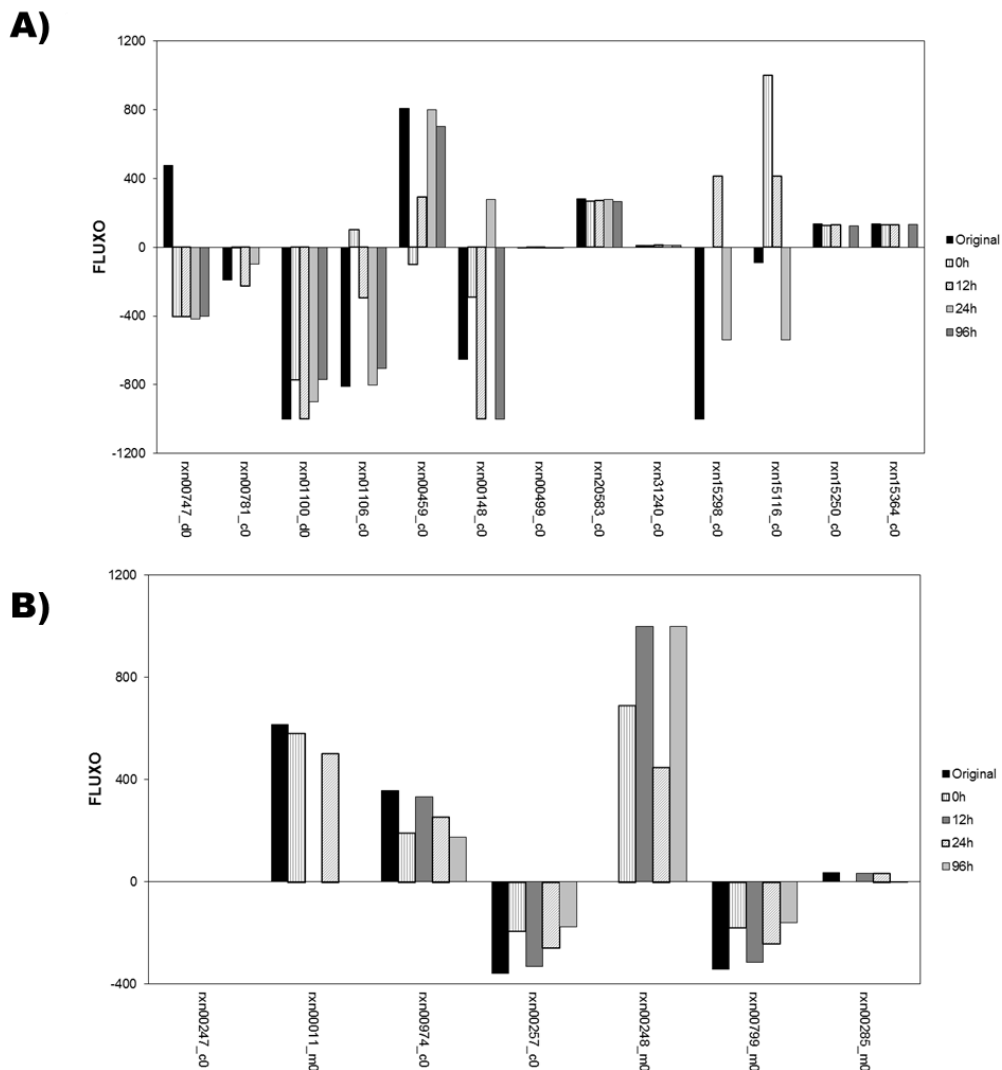


Figura 7. Simulação do fluxo do modelo baseado no genoma e os modelos após a integração do transcriptoma. O código abaixo de cada barra indica a reação da via (material suplementar) e o valor (positivo ou negativo) indica a direção do fluxo da reação (fluxo positivo indica formação de produto – metabólitos à direita da reação; fluxo negativo indica formação de reagentes – metabólitos à esquerda da reação). **A**, Via Glicolítica / Gliconeogênese; **B**, Ciclo do Ácido Cítrico.

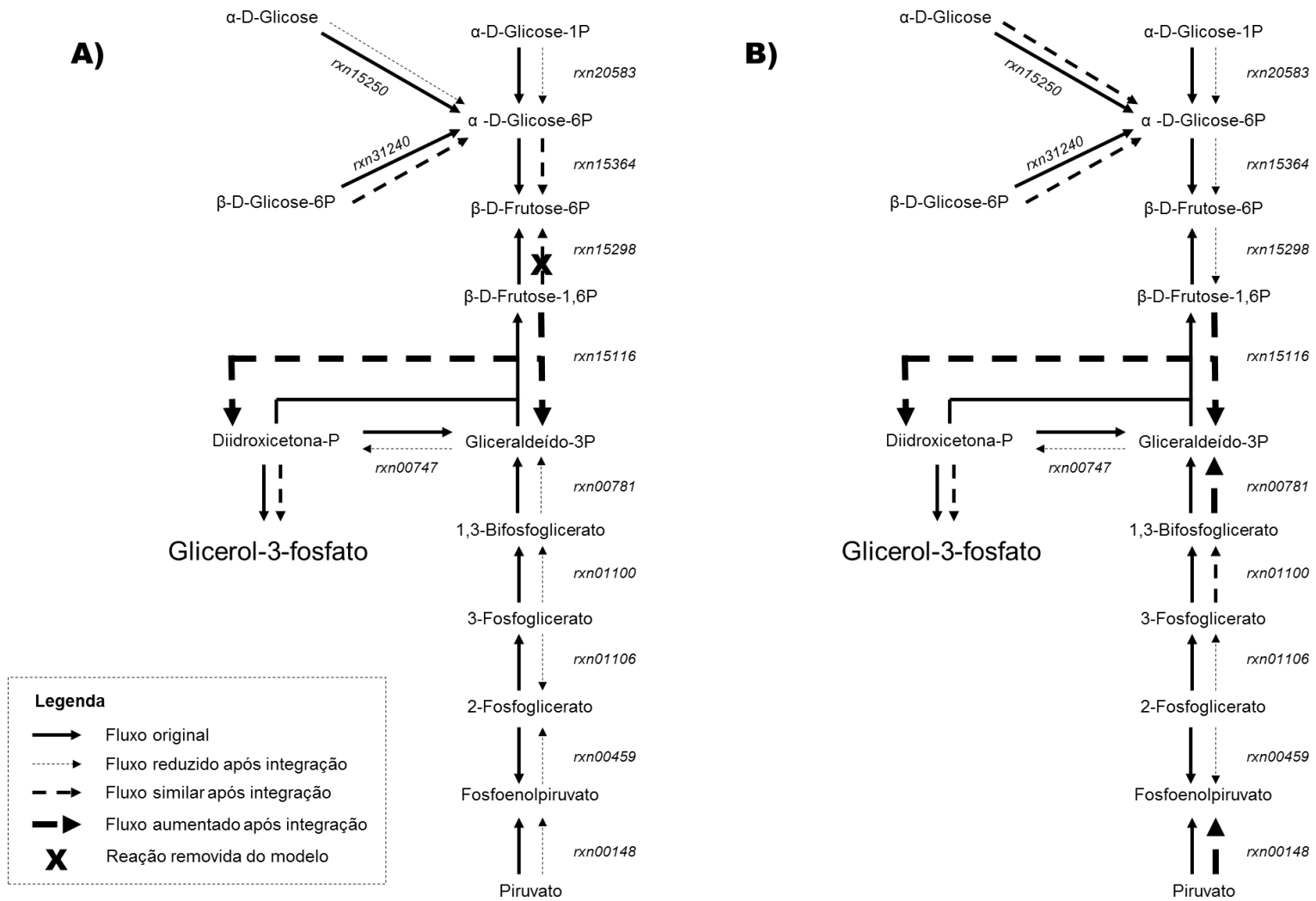
Para o ciclo do ácido cítrico, não foi observada alteração no sentido das reações entre o modelo original e os modelos após integração. A reação rxn_00248_m0 não apresentou fluxo no modelo original e após a integração houve fluxo positivo para os quatro modelos gerados. Para as demais reações, as alterações observadas consistem na variação da intensidade do fluxo ou na sua remoção.

Em contrapartida, a via glicolítica / gliconeogênese apresentou alterações no sentido e intensidade dos fluxos das reações. A partir desse perfil único, as reações do modelo foram esquematizadas (figura 8) para melhor avaliação da orientação da via, deixando claro que a resposta à infecção promove alteração do fluxo metabólico desta via ao longo das horas. A análise dessa reconstrução indica um possível consumo de glicose, direcionando o metabolismo de carboidratos para a produção de gliceraldeído-3-fosfato e diidroxicetona-fosfato. Adicionalmente, observa-se nas horas iniciais a conversão de gliceraldeído-3-fosfato para a diidroxicetona-fosfato e deste para o glicerol-3-fosfato.

Quantificação de glicose por HPLC

Como as maiores alterações no fluxo foram vistas na via glicolítica / gliconeogênese, a glicose foi quantificada por HPLC nos cultivares susceptível e resistente nos quatro tempos dos modelos (0, 12, 24 e 96 *h.a.i.*). Foi significativa a redução na concentração de glicose no cultivar resistente ao longo da infecção, enquanto que pouca ou nenhuma variação foi observada para o susceptível (figura 9).

Figura 8. Continua...



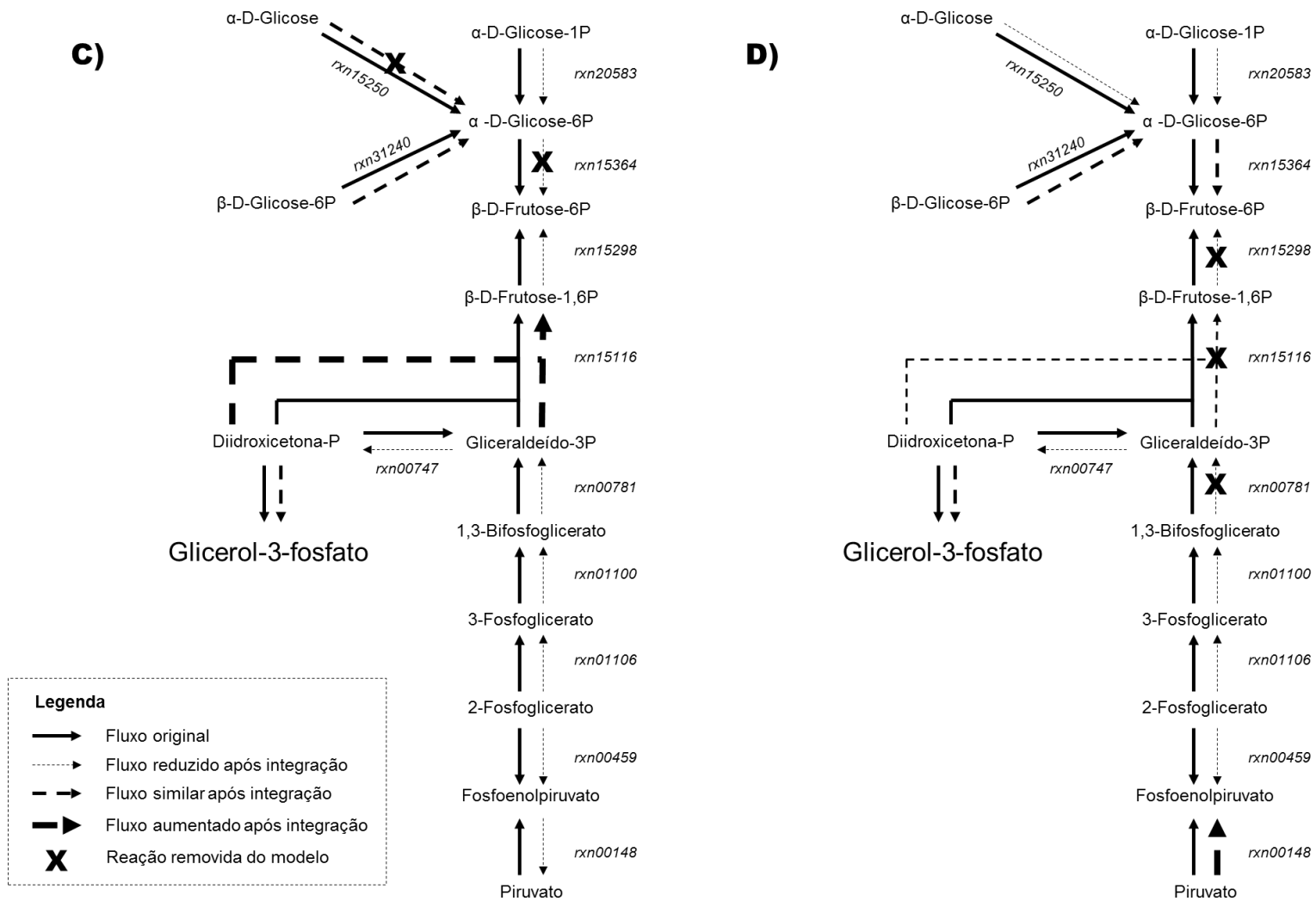


Figura 8. Reconstrução da via glicolítica / gliconeogênese a partir do modelo de fluxo original (seta preenchida), gerando modelos contexto-específico a partir da incorporação dos dados de transcriptoma (seta pontilhada). As vias reconstruídas foram baseadas nos genes up-regulados (fold-change > 2) no Híbrido de Timor, nas **A**, 0; **B**, 12; **C**, 24 e **D**, 96 horas após a infecção.

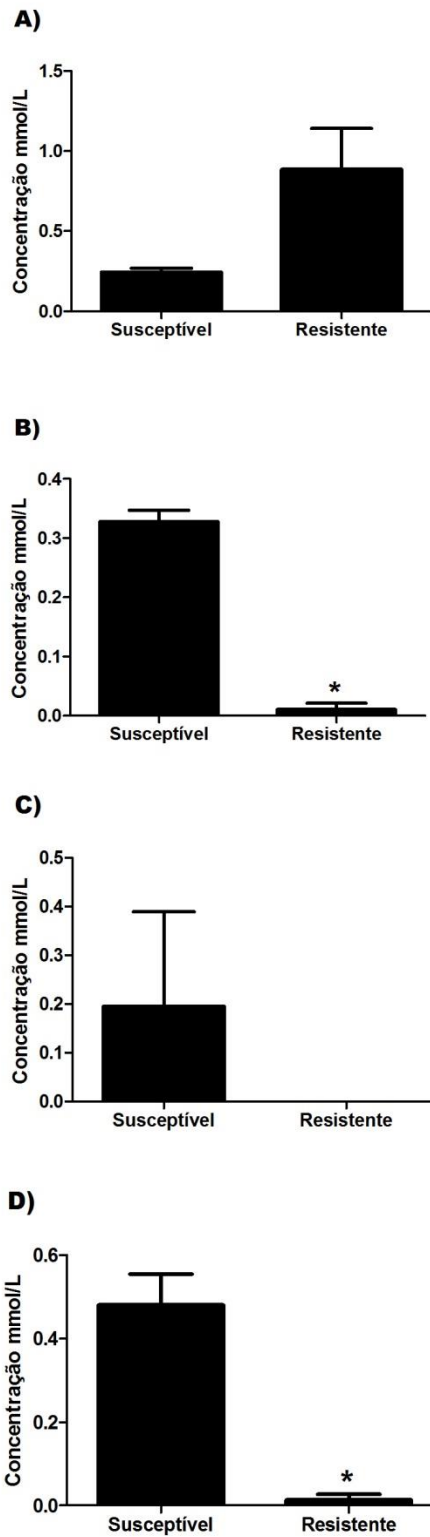


Figura 9. Quantificação de Glicose por HPLC dos extratos de metabólitos totais dos tempos de 0 (A), 12 (B), 24 (C) e 96 (D) horas após a infecção. Análise estatística feita por teste-t não pareado unicaudal (p -valor $< 0,05$).

DISCUSSÃO

A escolha das vias de metabolismo primário para gerar o modelo baseado no genoma é pautada em algumas dificuldades em simular análises do metabolismo secundário, uma vez que este é variável entre diferentes espécies de planta, há pouca informação sobre seu controle e modelagens de fluxo baseados no genoma apresentam pouco ou nenhum fluxo através destas vias [31-35]. O metabolismo primário, por sua vez, é bem estabelecido e apresenta um banco de dados (PlantSEED) rico em informações utilizadas para geração de modelos [36].

É importante notar que os fluxos reacionais são gerados levando em consideração apenas a identificação das enzimas existentes no organismo e as vias reconstruídas, sem considerar elementos importantes como disponibilidade de metabólitos, além da concentração e parâmetros cinéticos das enzimas, como K_{cat} [37-39]. Entretanto, esse modelo inicial gerado é essencial para estudos adicionais através da associação de outras ômicas, como transcriptômica e metabolômica, que permitem a obtenção de modelos contexto-específicos que explicam o comportamento celular em uma dada condição mais próxima à realidade [40-41].

O primeiro modelo baseado em genoma publicado para plantas foi referente à *Arabidopsis thaliana* em 2009 [42]. Desde então, outros organismos tiveram seu metabolismo reconstruído como arroz, milho e tomate [43-45]. A demora na utilização de modelos para plantas, em relação a microrganismos, se deve a algumas limitações. Dentre elas estão a compartimentalização celular, a diversidade de tipos celulares e a complexa diversidade metabólica desses organismos [46]. No presente trabalho, a ausência de genoma de referência para *Coffea arabica* implica em prováveis perdas de informação na geração do modelo. Apesar disso, a estratégia adotada acrescenta sólidos conhecimentos sobre o comportamento celular, permitindo fazer inferências sobre o metabolismo de maneira geral.

A integração dos dados de transcriptômica aos modelos metabólicos é a principal ferramenta *high-throughput* para geração dos modelos contexto-específicos [47]. Assim, os dados de transcriptômica cedidos por Florez e equipe

[14] nos permitiu analisar a expressão diferencial de genes do metabolismo primário entre os cultivares resistente e susceptível, integrar os perfis de transcrito ao modelo original, além de buscar correlações entre expressão gênica e metabolismo primário para compreender como estes podem estar envolvidos com a resposta de resistência a ferrugem.

A identificação de genes unicamente expressos, e sua validação como marcadores moleculares, é uma abordagem de interesse para programas de melhoramento de plantas. O uso destes marcadores tem como principal vantagem a economia de tempo, recursos e esforços, devido a três fatores principais: i) mais simples, seguro e rápido que o *screening* fenotípico, pois não é influenciado por fatores externos e interpretações; ii) a seleção pode ser conduzida ainda no estágio de semente; e iii) genótipos únicos podem ser selecionados e utilizados para novos rounds de melhoramento [48-49]. Ao analisar o transcriptoma dos cultivares em estudo, alguns poucos genes do metabolismo primário foram identificados como unicamente expressos no Híbrido de Timor ou no Caturra CIFC 19/1 antes da infecção. Estudos de confirmação e validação destes alvos como marcadores moleculares para a seleção de linhagens resistentes e susceptíveis a ferrugem serão uma importante contribuição para processos de seleção de plantas provenientes do melhoramento clássico.

A análise da expressão gênica do metabolismo primário, como um todo ou discriminado em vias específicas, indica que o cultivar resistente (h12) apresenta uma resposta antecipada quando comparado ao susceptível (c24) (figura 4), bem como apresenta respostas únicas (h24 e h96) (figura 5), o que pode explicar sua eficiência no controle da doença. Florez e colaboradores [14] identificaram em estudo com os mesmos cultivares a resposta antecipada na expressão de genes de resposta a infecção no cafeeiro resistente, observando perfil similar do genótipo resistente e susceptível em 12 e 24 *h.a.i.*, respectivamente. Estudos indicam que a resposta do cafeeiro resistente é do tipo pré-haustorial, ou seja, ocorre antes da formação do haustório de *H. vastatrix*. Em contrapartida, cafeeiros susceptíveis respondem de forma pós-haustorial [15]. De forma geral, o haustório é formado nas horas iniciais e o seu desenvolvimento é essencial para determinar a progressão da infecção.

Cafeeiros susceptíveis infectados apresentam expressão de enzimas e mecanismos de defesa de forma similar aos resistentes, mas o atraso nessa resposta permite que o fungo se prolifere, implicando em um controle ineficiente que leva ao desenvolvimento dos sintomas da ferrugem [16,50].

Trabalhos recentes têm apresentado que a expressão diferencial de genes é um importante elemento para a determinação da resistência a estresses bióticos e abióticos. Auguy e colaboradores [51] verificaram que a tolerância ao chumbo em *A. thaliana* (susceptível) e *Hirschfeldia incana* (resistente) está envolvida com a expressão diferencial de genes relacionados à fotossíntese e a parede celular, sendo a intensidade da expressão um fator importante para a resposta fisiológica. Em alguns estudos de estresse biótico, observa-se resultado similar. Chen e equipe [52] verificaram no patossistema tomate-TYLC (*tomato yellow leaf curl virus*) que a diferença entre os cultivares resistentes e susceptíveis do tomateiro reside na proporção de genes diferencialmente expressos. Enquanto o cultivar resistente apresentava um total de 58,37% dos genes up-regulados (em comparação ao controle não infectado), o susceptível tinha apenas 9,17% de genes up-regulados.

A resistência também está associada ao momento em que ocorre a expressão diferencial e não apenas ao conjunto de genes modulados. Em *Medicago sativa*, a resistência à infecção por *Pseudomonas syringae* é determinada principalmente pela expressão diferencial antecipada de um conjunto de genes de defesa [53]. Em estudos sobre a ferrugem do trigo [54], foi visto que os cultivares resistentes apresentaram uma up-regulação de genes três dias após a infecção; em contrapartida, os cultivares susceptíveis só tiveram genes up-regulados após sete dias. Esse mesmo estudo mostrou que os genes alterados estão envolvidos principalmente na via glicolítica e ciclo do ácido cítrico, sugerindo, a princípio, uma alta demanda energética para a defesa contra o patógeno. Entretanto, o mesmo não foi observado neste trabalho, uma vez que o fluxo metabólico não é direcionado para o ciclo do ácido cítrico, mas sim para intermediários da via glicolítica.

Diferenças observadas para a expressão de genes do metabolismo de aminoácidos (figuras 5 e 6) sugerem que estes podem contribuir de maneira essencial para a resistência do Híbrido de Timor, visto que estudos têm

demonstrado que alguns aminoácidos têm papel importante na imunidade das plantas. Návarová e colaboradores mostraram o efeito de alguns aminoácidos no aumento da indução da resposta imune adquirida (SAR) em *A. thaliana* infectadas com a bactéria *P. syringae*. Foi visto que o ácido pipecólico, produto da degradação da lisina, tem importante papel na SAR, precedendo a produção do ácido salicílico [55].

O ácido pipecólico é precursor da homostaquidrina e esse metabólito foi identificado em sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* [18]. O estudo não avaliou o papel desse metabólito no patossistema café-ferrugem, mas a concentração de homostaquidrina nas sementes do *Coffea canephora* foi cerca de vinte vezes maior que a concentração desse composto em *Coffea arabica*. Até o momento, não há publicações sobre o papel do ácido pipecólico no sistema imune de cafeeiros, mas a presença do derivado desse metabólito em maior quantidade nas sementes do café robusta indica uma diferença no perfil metabólico dos cafeeiros susceptíveis e resistentes antes mesmo da infecção. Estudos aprofundados sobre o papel da homostaquidrina nos cafeeiros durante a infecção podem ajudar a compreender se há relação entre resistência a ferrugem e concentração deste metabólito.

Estes estudos corroboram a ideia de que a resposta do Híbrido de Timor é antecipada a do Caturra CIFC 19/1 e que essa diferença temporal pode ser crucial para determinação da progressão da infecção. É importante ressaltar que aspectos específicos de cada cultivar também podem ser responsáveis pelas diferenças fisiológicas observadas. Além disso, a interação planta-patógeno afeta o metabolismo primário do cafeeiro e, possivelmente, o cultivar resistente apresenta diferenças nessas vias que contribuem direta ou indiretamente para a resistência.

Assim, é essencial a integração dos dados de transcriptoma ao modelo metabólico gerado a partir do genoma, para que seja possível avaliar o impacto das diferenças acima discutidas no fluxo reacional. De forma geral, pouca ou nenhuma alteração foi observada para os fluxos reacionais da maioria das vias metabólicas, à exceção da via glicolítica / gliconeogênese e ciclo do ácido cítrico.

Ao analisarmos as alterações previstas no fluxo das reações da via glicolítica / gliconeogênese ao longo do tempo, notou-se um possível acúmulo de diidroxicentona-fosfato nos cultivares resistentes (figura 8). Este metabólito pode ser convertido em glicerol-3-fosfato (G3P), que está envolvido na produção de energia e na biossíntese de glicerolípídeos ^[56]. Estudos mostraram que o acúmulo de G3P está relacionado com a resistência de *A. thaliana* ao fungo *Colletotrichum higginsianum* ^[57] e com a resistência sistêmica adquirida (SAR) mediada por genes de resistência ^[19]. A SAR se destaca por ser uma resposta que ocorre por toda a planta e não apenas no sítio de infecção ^[58]. Plantas que tiveram os genes que codificam a glicerol-3-fosfato desidrogenase mutados apresentaram uma SAR menos eficiente, indicando uma possível dependência desse tipo de resposta a níveis elevados de G3P ^[59]. Entretanto, não há estudos relacionados ao papel de G3P no cafeeiro como resposta a infecções fúngicas, sendo este um interessante alvo para futuras pesquisas.

Estes resultados sugerem, em um primeiro momento, que há pouca relação entre os perfis de transcriptoma e o fluxo previsto para as vias metabólicas centrais. Entretanto, a integração de dados de metabolômica, para incorporar a concentração dos intermediários das vias, é uma estratégia importante para o refinamento dos modelos contexto-específicos previstos e para validação das inferências realizadas.

A quantificação de glicose nas folhas dos cultivares, ao longo da infecção, indica uma redução deste metabólito no cultivar resistente (figura 9). Tal resultado sugere maior consumo deste metabólito, possivelmente como fonte energética para diferentes respostas fisiológicas e de defesa da planta ^[60]. Outra possibilidade é a redução da fotossíntese em resposta ao patógeno, mecanismo comumente observado em plantas ^[61-62].

Garavaglia e equipe ^[63] identificaram um peptídeo (XacPNP) de *Xanthomonas citri* pv. *citri*, causador do cancro do Citrus, essencial para a infecção. Plantas infectadas naturalmente apresentam redução da taxa fotossintética, mas este peptídeo biologicamente ativo estimula a fotossíntese no hospedeiro, garantindo a sobrevivência do patógeno. Bactérias deletadas deste peptídeo levavam a redução mais severa da taxa fotossintética da planta e conseqüentemente menor eficiência na infecção.

Estudos com *Uromyces fabae* – fungo causador da ferrugem da fava – indicam a presença da estrutura de haustório durante o início a infecção ^[64]. Nessa estrutura, há a expressão de um transportador de glicose, de onde ele provavelmente capta sua fonte de carbono. Se *H. vastatrix* possuir o mesmo mecanismo de transporte durante o período de formação de haustório, a redução da concentração de glicose – ou seu gasto como resposta ao patógeno – ainda nas horas iniciais após a infecção pode ser um mecanismo do cultivar resistente para evitar a proliferação do fungo.

Assim, a redução da taxa fotossintética pode coibir o desenvolvimento do fungo. Estudos da fusariose do trigo ^[65], doença causada por um fungo que implica em severas perdas agrícolas, indicaram que a infecção promove reduções nas taxas fotossintéticas da planta. Neste mesmo estudo, o cultivar susceptível, apesar de sofrer maior impacto no rendimento de produção, apresentou maiores taxas fotossintéticas em comparação ao cultivar resistente, indicando que o impacto fisiológico de reduzir os níveis de produção de glicose é importante para o controle da doença.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foi possível observar diferenças no metabolismo primário do Híbrido de Timor 832/2 e do *C. arabica* cv. Caturra CIFC 19/1 ao longo da infecção por *Hemileia vastatrix*. As maiores alterações na expressão gênica ocorreram entre 12 e 24 horas após a infecção sugerindo que a resposta apresentada pela planta neste período é determinante para o prosseguimento ou não da doença. Além disso, o cultivar resistente apresenta uma resposta provavelmente única após 24 horas da infecção.

A incorporação de dados de metabolômica aos modelos gerados neste trabalho bem como a análise de outros cultivares resistentes permitirão uma melhor visão das alterações metabólicas decorrentes da interação cafeeiro-patógeno, uma vez que pouca ou nenhuma diferença foi observada nos fluxos preditos após a incorporação do transcriptoma. Os resultados destes fluxos apontam para um envolvimento da via glicolítica na resistência, em paralelo ao acúmulo de diidroxicetona-fosfato no Híbrido de Timor, que pode levar à maior produção de G3P. Estudos avaliando o papel destes metabólitos no cafeeiro poderão auxiliar na compreensão de mecanismos de resistência.

Por fim, a expressão dos genes da via glicolítica / gliconeogênese serão avaliados por qPCR em outros cultivares com genótipos susceptível e resistente à ferrugem, a fim de identificar marcadores moleculares que possam ser utilizados para discriminar cafeeiros resistentes em programas de melhoramento genético, bem como para avaliar se o fluxo observado para o Híbrido de Timor é similar em outros cultivares.

REFERÊNCIAS

- [1] ICO, World Coffee Production. International Coffee Organization.
<<http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>> [accessed 18/06/2018], (2018).
- [2] Mccook S, Vandermeer J. The Big Rust and the Red Queen: Long-Term Perspectives on Coffee Rust Research. *Phytopathology*, v 105(9), p1164-73, 2015.
- [3] Zambolim, L. *et al.* Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Trop. Plant pathol.*, v 41, p 1-8, 2016.
- [4] Matiello, J. B. *et al.*, *Cultura do Café no Brasil: Novo Manual de Recomendações*. MAPA/PROCAFÉ, Fundação Procafé. p 387, 2002.
- [5] Bettencourt, A. J. Melhoramento genético do cafeeiro. Transferência de factores de resistência à *H. vastatrix* Berk & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica*. L. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC/IICT), 93 p, 1981.
- [6] Capucho, A. S. *et al.* Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, v7, p 189-191, 2012.
- [7] Barka, G. D. *et al.*, Differential expression of molecular rust resistance components have distinctive profiles in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. *Eur. J. Plant. Pathol.*, v 149, p 546-561, 2017.
- [8] Várzea, V. M. P. e Marques, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance. In *Durable resistance to coffee leaf rust* (Zambolim, L., Zambolim, E. and Várzea, V.M.P., eds.), p 53–74, 2005.
- [9] Prakash, N. S. *et al.* Breeding for rust resistance in Arabica – where we are and what next? In *Proceedings of the 25th International Conference on Coffee Science (ASIC)*, Association for Science and Information on Coffee, v 10, p 8-13, 2015.
- [10] Flor, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*, v 8, p 29-54, 1956.
- [11] Noronha, W. H., Bettencourt, A. J. Genetic study of resistance of *Coffea* sp to leaf rust. I. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Can. J. Bot.*, v 45, p 2021-2031, 1967.
- [12] Rodrigues Jr. C. J. *et al.* Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v 13, p 49-70, 1975
- [13] Bettencourt, A. J., *et al.* Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. *Coffee Agronomy*, v 4, p 199-234, 1988.
- [14] Florez, J. C., *et al.* High throughput transcriptome analysis of coffee reveals prehaustorial resistance in response to *Hemileia vastatrix* infection. *Plant. Mol. Biol.*, v 95(6), p 607-623, 2017.
- [15] Diniz, I. *et al.*, Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. *Eur J Plant. Pathol.*, v 133, p 141-157, 2012.
- [16] Guerra-Guimarães L, *et al.* Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Front Plant Sci.*, v6, p 478, 2015.
- [17] Silva, M. C. *et al.*, Hypersensitive cell death and posthaustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v 60, p 169–183, 2002.
- [18] Servillo, L. *et al.*, Homostachydrine (pipercolic acid betaine) as authentication marker of roasted blends of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* (Robusta) beans. *Food Chemistry*, v 205, p 52-57, 2016.
- [19] Mandal, M. K. *et al.*, Glycerol-3-phosphate and systemic immunity. *Plant Signal Behav.*, v 6, p 1871-1874, 2011.

- [20] Sanchez, C.E.G. and Saez, R.G.T. Comparison and analysis of objective functions in flux balance analysis. *Biotechnology Progress*, v 30, p 985–991, 2014.
- [21] Papin, J.A. *et al.*, Comparison of network-based pathway analysis methods. *Trends Biotechnol.*, v 22, p 400–405, 2004.
- [22] Denoeud, F., *et al.* The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, v 5 p. 1181-1185, 2014.
- [23] Schellenberger, J. *et al.* Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*, v 6, p 1290-1307, 2011.
- [24] MATLAB and Statistics Toolbox Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.
- [25] Bolger, A. M., *et al.* Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, v 30, p 2114-2120, 2014.
- [26] Langmead, B. *et al.* Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, v 10, Article R25, 2009.
- [27] Trapnell, C. *et al.* TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, v 25, p 1105-1111, 2009.
- [28] Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, v 28, p 511-515, 2010.
- [29] Becker S. A. e Palsson B. O. Context-specific metabolic networks are consistent with experiments. *PLoS Comput. Biol.*, v 5, p 1-10, 2008.
- [30] Lisec, J., *et al.* Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc.*;v 1(1) p 387-96, 2006.
- [31] Jespersen, D., Belanger, F. C., & Huang, B. Candidate genes and molecular markers associated with heat tolerance in colonial Bentgrass. *PLOS ONE*, v 12, e0171183, 2017.
- [32] Beyene, Y., *et al.* Improving Maize Grain Yield under Drought Stress and Non-stress Environments in Sub-Saharan Africa using Marker-Assisted Recurrent Selection. *Crop Science*, v 56, p 344, 2016.
- [33] Kelk, S. M. *et al.*, Optimal flux spaces of genome-scale stoichiometric models are determined by a few subnetworks. *Scientific Reports*, v 2, article 580, 2012.
- [34] Yuan, H. *et al.*, Flux Balance Analysis of Plant Metabolism: The Effect of Biomass Composition and Model Structure on Model Predictions. *Front. Plant. Sci.*, v 7, article 537, 2016.
- [35] Dal’Molin, C. G. O., Nielsen, L. K. Plant genome-scale metabolic reconstruction and modelling. *Current Opinion in Biotechnology*, v 24, p 271-277, 2013.
- [36] Seaver, S. M. D. *et al.*, PlantSEED Enables Automated Annotation and Reconstruction of Plant Primary Metabolism with Improved Compartmentalization and Comparative Consistency. *The Plant Journal*, 2018.
- [37] Noor, E. *et al.*, The protein cost of metabolic fluxes: prediction from enzymatic rate laws and cost minimization. *PLOS Computational Biology*, v 12, e1005167, 2016.
- [38] Hoppe, A. *et al.*, Including metabolite concentrations into flux balance analysis: thermodynamic realizability as a constraint on flux distributions in metabolic networks. *BMC Syst. Biol.*, v 1, 2007.
- [39] Tepper, N. *et al.*, Steady-State Metabolite Concentrations Reflect a Balance between Maximizing Enzyme Efficiency and Minimizing Total Metabolite Load. *PLOS One*, v 8, e75370, 2013.
- [40] Guo W. and Feng X. OM-FBA: Integrate Transcriptomics Data with Flux Balance Analysis to Decipher the Cell Metabolism. *PLoS ONE*, v 11, e0154188, 2016.

- [41] Dromms, R. and Styczynski, M. Systematic Applications of Metabolomics in Metabolic Engineering. *Metabolites*, v 2, p 1090–1122, 2012.
- [42] Poolman, M. G. *et al.*, A genome-scale metabolic model of *Arabidopsis* and some of its properties. *Plant Physiology*, v 151, p 1570-1581, 2009.
- [43] Chatterjee, A. *et al.*, Reconstruction of *Oryza sativa indica* Genome Scale Metabolic Model and Its Responses to Varying RuBisCO Activity, Light Intensity, and Enzymatic Cost Conditions. *Front. In Plant Science*, v 8, article 2060, 2017.
- [44] Saha, R. *et al.*, *Zea mays* iRS1563: a comprehensive genome-scale metabolic reconstruction of maize metabolism. *PLoS ONE*, v 6, e21784, 2011.
- [45] Yuan, H. *et al.*, A genome-scale metabolic network reconstruction of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its application to photorespiratory metabolism. *Plant J.*, v 82, p 289-304, 2016.
- [46] Collakova, E. *et al.*, Are we ready for genome-scale modeling in plants? *Plant Science*, v 191-192, p 53-70, 2012.
- [47] Kim, M. K. and Lun, D. S. Methods for integration of transcriptomic data in genome-scale metabolic models. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v 11, p 59-65, 2014.
- [48] Collard, B. C. and Mackill, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v 363, p 557–572, 2008.
- [49] Sakiyama, N. S. *et al.* Plant breeding with marker-assisted selection in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v 14, p 54–60, 2014.
- [50] Silva, M. C. *et al.*, Hypersensitive cell death and posthaustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v 60, p 169–183, 2012.
- [51] Auguy, F. *et al.*, Transcriptome Changes in *Hirschfeldia incana* in Response to Lead Exposure. *Frontiers in Plant Science*, v 6, article 1237, 2016.
- [52] Chen, T., Comparative Transcriptome Profiling of a Resistant vs. Susceptible Tomato (*Solanum lycopersicum*) Cultivar in Response to Infection by Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *PLoS ONE*, v 8, e80816, 2013.
- [53] Nemchinov, L. G. *et al.*, Resistant and susceptible responses in alfalfa (*Medicago sativa*) to bacterial stem blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *PLOS ONE*, v 12(12), e0189781.
- [54] Bolton, M. D. *et al.*, Lr34-Mediated Leaf Rust Resistance in Wheat: Transcript Profiling Reveals a High Energetic Demand Supported by Transient Recruitment of Multiple Metabolic Pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v 21, p 1515–1527, 2008.
- [55] Návarová H. *et al.*, Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell*, v 24, p 5123–5141, 2012.
- [56] Kachroo A, *et al.*, Fatty acid derived signals. *Annu Rev Phytopathol.*, v 47, p 153–176, 2009.
- [57] Venugopal, S. C. *et al.*, The common metabolite glycerol-3-phosphate is a novel regulator of plant defense signaling. *Plant Signal Behav.*, v 4, p 746-749, 2009.
- [58] Mandal, M. K. *et al.*, Glycerol-3-phosphate and systemic immunity. *Plant Signal Behav.*, v 6, p 1871-1874, 2011.
- [59] Iriti, M. and Faoro, F. Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia*, v 164, p 57–64, 2007.
- [60] Chanda, B. *et al.*, Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics*, v 43, p 421-427, 2011.
- [61] Morkunas, I. and Ratajczak, L. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, v 36, p 1607-1619, 2014.

- [62] Bilgin, D. D. *et al.*, Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell and Environment*, v 33, p 1597-1613, 2010.
- [63] Garavaglia, B. S. *et al.*, A Eukaryotic-Acquired Gene by a Biotrophic Phytopathogen Allows Prolonged Survival on the Host by Counteracting the Shut-Down of Plant Photosynthesis. *PLoS ONE*, v 5, e8950.Z4, 2010.
- [64] Talbot, N. J. Living the Sweet Life: How Does a Plant Pathogenic Fungus Acquire Sugar from Plants? *PLoS Biology*, v 8, e1000308, 2010.
- [65] Yang, S. *et al.*, Wheat Resistance to Fusarium Head Blight is Associated With Changes in Photosynthetic Parameters. *Plant Disease*, v 100, 847–852, 2016.

MATERIAL SUPLEMENTAR

ANEXO 1. Sumário das reações metabólicas dos modelos e respectivos códigos.

Código	Reação
<i>Via Glicolítica e Gliconeogênese</i>	
rxn01169_m0	ATP_m0+ beta_D_Glucose_m0 -> H_m0+ ADP_m0+ beta_D_Glucose_6_phosphate_m0
rxn02380_c0	beta_D_Glucose_6_phosphate_c0 <=> D_fructose_6_phosphate_c0
rxn00747_c0	Glyceraldehyde3_phosphate_c0 <=> Glycerone_phosphate_c0
rxn00781_c0	Phosphate_c0+ NAD_c0+ Glyceraldehyde3_phosphate_c0 <=> H_c0+ NADH_c0+ 1_3_Bisphospho_D_glycerate_c0
rxn00782_d0	Phosphate_d0+ NADP_d0+ Glyceraldehyde3_phosphate_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ 1_3_Bisphospho_D_glycerate_d0
rxn00779_c0	H2O_c0+ NADP_c0+ Glyceraldehyde3_phosphate_c0 -> 2 H_c0+ NADPH_c0+ 3_Phosphoglycerate_c0
rxn01100_c0	ATP_c0+ 3_Phosphoglycerate_c0 <=> ADP_c0+ 1_3_Bisphospho_D_glycerate_c0
rxn01106_c0	2_Phospho_D_glycerate_c0 <=> 3_Phosphoglycerate_c0
rxn00459_c0	2_Phospho_D_glycerate_c0 <=> H2O_c0+ Phosphoenolpyruvate_c0
rxn00148_c0	Pyruvate_c0 + ATP_c0 <=> H_c0+ ADP_c0+ Phosphoenolpyruvate_c0
rxn00247_c0	ATP_c0+ Oxaloacetate_c0 -> CO2_c0+ ADP_c0+ Phosphoenolpyruvate_c0
rxn00011_m0	Pyruvate_m0 + TPP_m0+ H_m0 -> CO2_m0+ 2_Hydroxyethyl_ThPP_m0
rxn00499_c0	NAD_c0+ L_Lactate_c0 <=> H_c0+ Pyruvate_c0 + NADH_c0
rxn00175_d0	ATP_d0+ CoA_d0 + Acetate_d0 -> PPI_d0+ H_d0+ AMP_d0+ Acetyl_CoA_d0
rxn00506_c0	H2O_c0+ NAD_c0+ Acetaldehyde_c0 -> 2 H_c0+ NADH_c0+ Acetate_c0
rxn00543_c0	NAD_c0+ Ethanol_c0 <=> H_c0+ NADH_c0+ Acetaldehyde_c0
<i>Ciclo do Ácido Cítrico</i>	
rxn00247_c0	ATP_c0+ Oxaloacetate_c0 -> CO2_c0+ ADP_c0+ Phosphoenolpyruvate_c0
rxn00011_m0	Pyruvate_m0 + TPP_m0+ H_m0 -> CO2_m0+ 2_Hydroxyethyl_ThPP_m0
rxn00974_c0	Citrate_c0 <=> H2O_c0+ cis_Aconitate_c0
rxn00257_c0	ATP_c0+ CoA_c0 + Citrate_c0 <=> Phosphate_c0+ ADP_c0+ Acetyl_CoA_c0+ Oxaloacetate_c0
rxn00248_c0	NAD_c0+ L_Malate_c0 <=> H_c0+ NADH_c0+ Oxaloacetate_c0
rxn00799_m0	L_Malate_m0 <=> H2O_m0+ Fumarate_m0
rxn00285_m0	ATP_m0+ CoA_m0 + Succinate_m0 <=> ADP_m0+ Phosphate_m0+ Succinyl_CoA_m0
<i>Via das Pentoses</i>	
rxn01275_c0	ATP_c0+ GLCN_c0 -> H_c0+ ADP_c0+ 6_Phospho_D_gluconate_c0
rxn01476_c0	H2O_c0+ 6_phospho_D_glucono_1_5_lactone_c0 <=> H_c0+ 6_Phospho_D_gluconate_c0
rxn01975_c0	NADP_c0+ beta_D_Glucose_6_phosphate_c0 <=> H_c0+ NADPH_c0+ 6_phospho_D_glucono_1_5_lactone_c0
rxn00779_c0	H2O_c0+ NADP_c0+ Glyceraldehyde3_phosphate_c0 -> 2 H_c0+ NADPH_c0+ 3_Phosphoglycerate_c0

rxn01115_c0	NADP_c0+ 6_Phospho_D_gluconate_c0 -> CO2_c0+ NADPH_c0+ D_Ribulose5_phosphate_c0
rxn01116_d0	D_Ribulose5_phosphate_d0 <=> D_Xylulose5_phosphate_d0
rxn00777_c0	ribose_5_phosphate_c0 <=> D_Ribulose5_phosphate_c0
rxn00770_d0	ATP_d0+ ribose_5_phosphate_d0 -> H_d0+ AMP_d0+ PRPP_d0
rxn01200_d0	Glyceraldehyde3_phosphate_d0+ Sedoheptulose7_phosphate_d0 <=> ribose_5_phosphate_d0 + D_Xylulose5_phosphate_d0
<i>Pentose e Glucuronato interconversão</i>	
rxn00211_c0	H2O_c0+ 2 NAD_c0+ UDP_glucose_c0 <=> 3 H_c0+ 2 NADH_c0+ UDPglucuronate_c0
rxn00213_c0	UTP_c0+ Glucose_1_phosphate_c0 <=> PPI_c0+ UDP_glucose_c0
rxn01116_d0	D_Ribulose5_phosphate_d0 <=> D_Xylulose5_phosphate_d0
<i>Metabolismo de Ácidos Graxos</i>	
rxn00533_d0	ATP_d0+ H2CO3_d0+ Acetyl_CoA_d0 <=> Phosphate_d0+ H_d0+ ADP_d0+ Malonyl_CoA_d0
rxn05465_d0	H_d0+ Malonyl_CoA_d0+ ACP_d0 <=> CoA_d0 + Malonyl_acyl_carrierprotein__d0
rxn05346_d0	Malonyl_acyl_carrierprotein__d0+ Butyryl_ACP_d0 -> CO2_d0+ 3_Oxohexanoyl_acp_d0+ ACP_d0
rxn05337_d0	NADP_d0+ D_3_Hydroxyhexanoyl_acp_d0 <=> NADPH_d0+ 3_Oxohexanoyl_acp_d0
rxn05330_d0	D_3_Hydroxyhexanoyl_acp_d0 <=> H2O_d0+ 2E_Hexenoyl_acp_d0
rxn05326_d0	H_d0+ NADH_d0+ 2E_Hexenoyl_acp_d0 -> NAD_d0+ Hexanoyl_ACP_d0
rxn05350_d0	H_d0+ Hexanoyl_ACP_d0+ Malonyl_acyl_carrierprotein__d0 -> CO2_d0+ ACP_d0+ 3_oxooctanoyl_acp_d0
rxn05325_d0	H_d0+ NADH_d0+ 2E-Octenoyl_acp_d0 -> NAD_d0+ Octanoyl_ACP_d0
rxn05343_d0	Octanoyl_ACP_d0 + Malonyl_acyl_carrierprotein__d0 -> CO2_d0+ 3_oxodecanoyl_acp_d0+ ACP_d0
rxn05338_d0	H_d0+ NADPH_d0+ 3_oxodecanoyl_acp_d0 -> NADP_d0+ R_3_Hydroxydecanoyl_acyl_carrier_protein_d0
rxn05348_d0	Malonyl_acyl_carrierprotein__d0+ Decanoyl_ACP_d0 -> CO2_d0+ 3_oxododecanoyl_acp_d0 + ACP_d0
rxn05340_d0	NADP_d0+ D_3_Hydroxydodecanoyl_acp_d0 <=> NADPH_d0+ 3_oxododecanoyl_acp_d0
rxn05331_d0	D_3_Hydroxydodecanoyl_acp_d0 <=> H2O_d0+ 2E_Dodecenoyl_acp_d0
rxn05324_d0	2 H_d0+ NADH_d0+ 2E_Dodecenoyl_acp_d0 -> NAD_d0+ Dodecanoyl_ACP_d0
rxn06556_d0	H2O_d0+ Dodecanoyl_ACP_d0 -> H_d0+ ACP_d0+ ddca_d0
rxn05345_d0	Dodecanoyl_ACP_d0+ Malonyl_acyl_carrierprotein__d0 -> CO2_d0+ 3_oxotetradecanoyl_acp_d0 + ACP_d0
rxn05342_d0	NADP_d0+ HMA_d0 <=> NADPH_d0+ 3_oxotetradecanoyl_acp_d0
rxn05335_d0	HMA_d0 <=> H2O_d0+ 2E_Tetradecenoyl_acp_d0
rxn00947_d0	ATP_d0+ CoA_d0 + Palmitate_d0 -> PPI_d0+ H_d0+ AMP_d0+ Palmitoyl_CoA_d0
rxn07579_d0	H_d0+ NADH_d0+ 2E-Octadecenoyl_acp_d0 -> NAD_d0+ Stearoyl_acyl_carrier_protein_d0
rxn11700_d0	H2O_d0+ Stearoyl_acyl_carrier_protein_d0 -> H_d0+ ACP_d0+ ocdca_d0
rxn00943_x0	H2O_x0+ Palmitoyl_CoA_x0 -> H_x0+ CoA_x0 + Palmitate_x0
rxn00947_x0	ATP_x0+ CoA_x0 + Palmitate_x0 -> H_x0+ Palmitoyl_CoA_x0 + PPI_x0+ AMP_x0
rxn00178_x0	2 Acetyl_CoA_x0 <=> CoA_x0 + Acetoacetyl_CoA_x0
<i>Biossíntese Ubiquinona e Terpeno-quinonas</i>	

rxn14085_d0	Homogentisate_d0 + Solanesyl_diphosphate_d0 -> PPI_d0+ CO2_d0+ 2_Methyl_6_solanyl_1_4_benzoquinol_d0
rxn01827_d0	O2_d0 + p_hydroxyphenylpyruvate_d0 -> CO2_d0+ Homogentisate_d0
rxn00527_d0	2_Oxoglutarate_d0 + L_Tyrosine_d0 <=> L_Glutamate_d0 + p_hydroxyphenylpyruvate_d0
rxn01611_c0	H_c0+ O2_c0 + NADPH_c0+ E_Cinnamate_c0 -> H2O_c0+ NADP_c0+ 4_Coumarate_c0
rxn01182_c0	ATP_c0+ CoA_c0 + 4_Coumarate_c0 -> PPI_c0+ H_c0+ AMP_c0+ 4_Coumaroyl_CoA_c0
rxn00965_c0	H2O_c0+ 4_Hydroxybenzoyl_CoA_c0 -> 2 H_c0+ CoA_c0 + 4_Hydroxybenzoate_c0
rxn01258_d0	Chorismate_d0 <=> Isochorismate_d0
rxn11702_d0	H_d0+ 2_Oxoglutarate_d0 + Isochorismate_d0 -> CO2_d0+ 2_Succinyl_5_enolpyruvyl_6_hydroxy_3_cyclohexene_1_carboxylate_d0
rxn11703_d0	2_Succinyl_5_enolpyruvyl_6_hydroxy_3_cyclohexene_1_carboxylate_d0 -> Pyruvate_d0 + SHCHC_d0
rxn02832_d0	SHCHC_d0 -> H2O_d0+ Succinylbenzoate_d0
rxn05024_d0	H_d0+ Succinylbenzoyl_CoA_d0 -> H2O_d0+ 1_4_Dihydroxy_2_naphthoyl_CoA_d0
rxn05023_d0	H2O_d0+ 1_4_Dihydroxy_2_naphthoyl_CoA_d0 -> H_d0+ CoA_d0 + 1_4_Dihydroxy_2_naphthoate_d0
Metabolismo Purinas	
rxn00770_d0	ATP_d0+ ribose_5_phosphate_d0 -> H_d0+ AMP_d0+ PRPP_d0
rxn00790_d0	H2O_d0+ L_Glutamine_d0+ PRPP_d0 -> PPI_d0+ H_d0+ L_Glutamate_d0 + 5_Phosphoribosylamine_d0
rxn02895_d0	ATP_d0+ Glycine_d0 + 5_Phosphoribosylamine_d0 -> Phosphate_d0+ H_d0+ ADP_d0+ GAR_d0
rxn03004_d0	10_Formyltetrahydrofolate_d0 + GAR_d0 -> H_d0+ Tetrahydrofolate_d0+ N_Formyl_GAR_d0
rxn03084_d0	H2O_d0+ L_Glutamine_d0+ ATP_d0+ N_Formyl_GAR_d0 -> Phosphate_d0+ H_d0+ L_Glutamate_d0 + ADP_d0+ 5_Phosphoribosylformylglycinamide_d0
rxn02937_d0	ATP_d0+ 5_Phosphoribosylformylglycinamide_d0 -> Phosphate_d0+ H_d0+ ADP_d0+ AIR_d0
rxn02938_d0	H_d0+ 5_Phosphoribosyl_4_carboxy_5_aminimidazole_d0 <=> CO2_d0+ AIR_d0
rxn03147_d0	ATP_d0+ L_Aspartate_d0 + 5_Phosphoribosyl_4_carboxy_5_aminimidazole_d0 -> Phosphate_d0+ H_d0+ ADP_d0+ SAICAR_d0
rxn03136_d0	SAICAR_d0 <=> H_d0+ Fumarate_d0+ AICAR_d0
rxn03137_d0	10_Formyltetrahydrofolate_d0 + AICAR_d0 -> Tetrahydrofolate_d0+ FAICAR_d0
rxn00832_d0	H2O_d0+ IMP_d0 <=> FAICAR_d0
rxn00361_c0	ATP_c0+ APS_c0 -> H_c0+ ADP_c0+ 3_phosphoadenylylsulfate_c0
rxn00838_d0	GTP_d0+ L_Aspartate_d0 + IMP_d0 -> Phosphate_d0+ 2 H_d0+ GDP_d0+ Adenylosuccinate_d0
rxn00800_d0	Adenylosuccinate_d0 <=> AMP_d0+ Fumarate_d0
rxn00148_d0	Pyruvate_d0 + ATP_d0 <=> H_d0+ ADP_d0+ Phosphoenolpyruvate_d0
rxn00097_d0	H_d0+ AMP_d0+ ATP_d0 <=> 2 ADP_d0
rxn00834_c0	H2O_c0+ NAD_c0+ IMP_c0 <=> H_c0+ NADH_c0+ XMP_c0
rxn00839_c0	ATP_c0+ dADP_c0 <=> ADP_c0+ dATP_c0
rxn00139_c0	PRPP_c0+ Adenine_c0 -> PPI_c0+ H_c0+ AMP_c0

rxn00134_c0 ATP_c0+ Adenosine_c0 -> H_c0+ AMP_c0+ ADP_c0

rxn00101_c0 H2O_c0+ 2 H_c0+ Urea_c0 -> CO2_c0+ 2 NH3_c0

rxn00239_c0 H_c0+ ATP_c0+ GMP_c0 <=> ADP_c0+ GDP_c0

rxn00237_d0 ATP_d0+ GDP_d0 <=> ADP_d0+ GTP_d0

rxn01353_c0 ATP_c0+ dGDP_c0 <=> ADP_c0+ dGTP_c0

rxn00915_c0 PRPP_c0+ Guanine_c0 -> PPI_c0+ H_c0+ GMP_c0

Metabolismo de Pirimidinas

rxn01465_d0 H2O_d0+ S_Dihydroorotate_d0 <=> H_d0+ N_Carbamoyl_L_aspartate_d0

rxn01362_c0 PRPP_c0+ Orotate_c0 -> PPI_c0+ H_c0+ Orotidylic_acid_c0

rxn00710_c0 H_c0+ Orotidylic_acid_c0 -> CO2_c0+ UMP_c0

rxn00654_c0 H2O_c0+ 2 H_c0+ 3_Ureidopropanoate_c0 -> CO2_c0+ NH3_c0+ beta_Alanine_c0

rxn01626_c0 H2O_c0+ Hydrouracil_c0 -> H_c0+ 3_Ureidopropanoate_c0

rxn00720_d0 NADP_d0+ Hydrouracil_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ Uracil_d0

rxn00708_c0 H2O_c0+ UMP_c0 <=> Phosphate_c0+ Uridine_c0

rxn00116_c0 H2O_c0+ UDP_c0 -> Phosphate_c0+ 2 H_c0+ UMP_c0

rxn00119_c0 H_c0+ ATP_c0+ UMP_c0 <=> ADP_c0+ UDP_c0

rxn00117_d0 ATP_d0+ UDP_d0 <=> ADP_d0+ UTP_d0

rxn00120_c0 H2O_c0+ UTP_c0 -> Phosphate_c0+ H_c0+ UDP_c0

rxn01018_d0 L_Aspartate_d0 + Carbamoylphosphate_d0 <=> Phosphate_d0+ H_d0+ N_Carbamoyl_L_aspartate_d0

rxn00414_d0 H2O_d0+ L_Glutamine_d0+ 2 ATP_d0+ H2CO3_d0 ->
Phosphate_d0+ 2 H_d0+ L_Glutamate_d0+ 2 ADP_d0+ Carbamoylphosphate_d0

rxn00408_c0 H2O_c0+ CTP_c0 -> Phosphate_c0+ H_c0+ CDP_c0

rxn00364_c0 H_c0+ ATP_c0+ CMP_c0 <=> ADP_c0+ CDP_c0

rxn00363_c0 H2O_c0+ CMP_c0 <=> Phosphate_c0+ Cytidine_c0

rxn00366_c0 H2O_c0+ CDP_c0 -> Phosphate_c0+ 2 H_c0+ CMP_c0

rxn00409_c0 ATP_c0+ CDP_c0 <=> ADP_c0+ CTP_c0

rxn01673_c0 ATP_c0+ dCDP_c0 <=> ADP_c0+ dCTP_c0

rxn01217_c0 H2O_c0+ H_c0+ dCMP_c0 -> NH3_c0+ dUMP_c0

rxn01519_c0 H2O_c0+ dUTP_c0 -> PPI_c0+ 2 H_c0+ dUMP_c0

rxn01678_c0 ATP_c0+ dUDP_c0 <=> ADP_c0+ dUTP_c0

rxn01520_c0 5_10_Methylenetetrahydrofolate_c0+ dUMP_c0 -> Dihydrofolate_c0 + dTMP_c0

rxn01512_c0 ATP_c0+ dTDP_c0 <=> ADP_c0+ TTP_c0

rxn01513_c0 H_c0+ ATP_c0+ dTMP_c0 <=> ADP_c0+ dTDP_c0

rxn01511_c0 H2O_c0+ dTDP_c0 -> Phosphate_c0+ 2 H_c0+ dTMP_c0

rxn01514_c0 H2O_c0+ TTP_c0 -> Phosphate_c0+ H_c0+ dTDP_c0

Metabolismo Frutose, Manose, Galactose e Ascorbato

rxn00747_c0	Glyceraldehyde3_phosphate_c0 <=> Glycerone_phosphate_c0
rxn00213_c0	UTP_c0+ Glucose_1_phosphate_c0 <=> PPI_c0+ UDP_glucose_c0
rxn00211_c0	H2O_c0+ 2 NAD_c0+ UDP_glucose_c0 <=> 3 H_c0+ 2 NADH_c0+ UDPglucuronate_c0

Metabolismo Alanina, Aspartato e Glutamato

rxn01018_d0	L_Aspartate_d0 + Carbamoylphosphate_d0 <=> Phosphate_d0+ H_d0+ N_Carbamoyl_L_aspartate_d0
rxn00416_c0	H2O_c0+ ATP_c0+ L_Glutamine_c0+ L_Aspartate_c0 -> PPI_c0+ 2 H_c0+ AMP_c0+ L_Glutamate_c0 + L_Asparagine_c0
rxn01434_d0	ATP_d0+ L_Aspartate_d0 + Citrulline_d0 -> PPI_d0+ 2 H_d0+ AMP_d0+ L_Argininosuccinate_d0
rxn00838_d0	GTP_d0+ L_Aspartate_d0 + IMP_d0 -> Phosphate_d0+ 2 H_d0+ GDP_d0+ Adenylosuccinate_d0
rxn00800_d0	Adenylosuccinate_d0 <=> AMP_d0+ Fumarate_d0
rxn00802_d0	L_Argininosuccinate_d0 <=> L_Arginine_d0+ Fumarate_d0
rxn00260_c0	2_Oxoglutarate_c0 + L_Aspartate_c0 <=> L_Glutamate_c0 + Oxaloacetate_c0
rxn00272_d0	L_Alanine_d0+ Glyoxalate_d0 <=> Pyruvate_d0 + Glycine_d0
rxn00191_c0	2_Oxoglutarate_c0 + L_Alanine_c0 <=> Pyruvate_c0 + L_Glutamate_c0
rxn00184_c0	H2O_c0+ NADP_c0+ L_Glutamate_c0 <=> H_c0+ NADPH_c0+ NH3_c0+ 2_Oxoglutarate_c0
rxn00069_d0	NAD_d0+ 2 L_Glutamate_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ 2_Oxoglutarate_d0 + L_Glutamine_d0
rxn00187_d0	L_Glutamate_d0 + ATP_d0+ NH3_d0 -> Phosphate_d0+ H_d0+ L_Glutamine_d0+ ADP_d0
rxn00189_c0	H2O_c0+ L_Glutamine_c0 -> NH3_c0+ L_Glutamate_c0
rxn00414_d0	H2O_d0+ L_Glutamine_d0+ 2 ATP_d0+ H2CO3_d0 -> Phosphate_d0+ 2 H_d0+ L_Glutamate_d0 + 2 ADP_d0+ Carbamoylphosphate_d0

Metabolismo Glicina, Serina e Treonina

rxn01106_c0	2_Phospho_D_glycerate_c0 <=> 3_Phosphoglycerate_c0
rxn01106_d0	2_Phospho_D_glycerate_d0 <=> 3_Phosphoglycerate_d0
rxn01011_d0	NAD_d0+ Glycerate_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ Hydroxypyruvate_d0
rxn01102_d0	ATP_d0+ Glycerate_d0 -> H_d0+ 3_Phosphoglycerate_d0 + ADP_d0
rxn01101_d0	3_Phosphoglycerate_d0 + NAD_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ 3_Phosphonooxypyruvate_d0
rxn02914_d0	2_Oxoglutarate_d0 + phosphoserine_d0 <=> L_Glutamate_d0 + 3_Phosphonooxypyruvate_d0
rxn00420_d0	H2O_d0+ phosphoserine_d0 <=> Phosphate_d0+ L_Serine_d0
rxn00425_c0	L_Serine_c0 <=> D_Serine_c0
rxn00166_c0	D_Serine_c0 -> Pyruvate_c0 + NH3_c0
rxn00424_x0	Glyoxalate_x0 + L_Serine_x0 <=> Glycine_x0 + Hydroxypyruvate_x0
rxn00692_c0	H2O_c0+ Glycine_c0 + 5_10_Methylenetetrahydrofolate_c0 <=> L_Serine_c0+ Tetrahydrofolate_c0
rxn00275_d0	2_Oxoglutarate_d0 + Glycine_d0 <=> L_Glutamate_d0 + Glyoxalate_d0
rxn00541_c0	L_Threonine_c0 <=> Acetaldehyde_c0+ Glycine_c0
rxn00737_d0	L_Threonine_d0 -> NH3_d0+ 2_Oxobutyrate_d0

rxn01069_d0	H2O_d0+ O_Phospho_L_homoserine_d0 <=> Phosphate_d0+ L_Threonine_d0
rxn01301_d0	NAD_d0+ L_Homoserine_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ L_Aspartate4_semialdehyde_d0
rxn01643_d0	Phosphate_d0+ NADP_d0+ L_Aspartate4_semialdehyde_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ 4_Phospho_L_aspartate_d0
rxn00337_d0	ATP_d0+ L_Aspartate_d0 <=> ADP_d0+ 4_Phospho_L_aspartate_d0
<i>Metabolismo de Cisteína e Metionina</i>	
rxn00423_d0	Acetyl_CoA_d0+ L_Serine_d0 -> CoA_d0 + O_Acetyl_L_serine_d0
rxn00649_d0	O_Acetyl_L_serine_d0+ H2S_d0 <=> Acetate_d0 + L_Cysteine_d0
rxn00337_d0	ATP_d0+ L_Aspartate_d0 <=> ADP_d0+ 4_Phospho_L_aspartate_d0
rxn01643_d0	Phosphate_d0+ NADP_d0+ L_Aspartate4_semialdehyde_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ 4_Phospho_L_aspartate_d0
rxn01301_d0	NAD_d0+ L_Homoserine_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ L_Aspartate4_semialdehyde_d0
rxn02302_c0	L_Cysteine_c0+ O_Acetyl_L_homoserine_c0 <=> H_c0+ Acetate_c0 + Cystathionine_c0
rxn00141_c0	H2O_c0+ S_Adenosyl_homocysteine_c0 <=> Adenosine_c0+ Homocysteine_c0
rxn00452_c0	S_Adenosyl_L_methionine_c0+ Homocysteine_c0 -> H_c0+ L_Methionine_c0+ S_Adenosyl_homocysteine_c0
rxn00693_c0	Homocysteine_c0+ 5_Methyltetrahydrofolate_c0 <=> L_Methionine_c0+ Tetrahydrofolate_c0
rxn00126_c0	H2O_c0+ ATP_c0+ L_Methionine_c0 -> Phosphate_c0+ PPI_c0+ H_c0+ S_Adenosyl_L_methionine_c0
rxn00128_c0	S_Adenosyl_L_methionine_c0 <=> H_c0+ 5_Methylthioadenosine_c0 + 1_Aminocyclopropane_1_carboxylate_c0
rxn01021_c0	H2O_c0+ 5_Methylthioadenosine_c0 <=> Adenine_c0+ 5_Methylthio_D_ribose_c0
rxn02894_c0	ATP_c0+ 5_Methylthio_D_ribose_c0 -> H_c0+ ADP_c0+ methylthioribose_1_phosphate_c0
rxn03057_c0	methylthioribose_1_phosphate_c0 <=> methylthioribulose_1_phosphate_c0
rxn05104_c0	methylthioribulose_1_phosphate_c0 -> H2O_c0+ 2_3_diketo5_methylthio_1_phosphopentane_c0
rxn05105_d0	2_Hydroxy_3_keto_5_methylthiopentenyl_1_phosphate_d0 -> 2_3_diketo5_methylthio_1_phosphopentane_d0
rxn05106_d0	H2O_d0+ 2_Hydroxy_3_keto_5_methylthiopentenyl_1_phosphate_d0 <=> Phosphate_d0+ 1_2_dihydroxy_3_keto_5_methylthiopentene_d0
rxn05092_c0	O2_c0 + 1_2_dihydroxy_3_keto_5_methylthiopentene_c0 -> 2 H_c0+ Formate_c0+ 4_methylthio_2_oxobutyrate_c0
rxn00456_c0	H2O_c0+ L_Methionine_c0 -> NH3_c0+ 2_Oxobutyrate_c0+ MTTL_c0
<i>Degradação Valina, Leucina e Isoleucina</i>	
rxn01454_c0	H2O_c0+ Acetyl_CoA_c0+ Acetoacetyl_CoA_c0 -> H_c0+ CoA_c0 + HMG_CoA_c0
rxn00178_c0	2 Acetyl_CoA_c0 <=> CoA_c0 + Acetoacetyl_CoA_c0
rxn00737_d0	L_Threonine_d0 -> NH3_d0+ 2_Oxobutyrate_d0
rxn08043_d0	Pyruvate[d0] + H+[d0] + 2-Oxobutyrate[d0] => CO2[d0] + 2-Aceto-2-hydroxybutanoate[d0]
rxn02789_d0	2_Isopropylmalate_d0 <=> H2O_d0+ 2_Isopropylmaleate_d0
rxn02811_d0	3_Isopropylmalate_d0 <=> H2O_d0+ 2_Isopropylmaleate_d0
rxn03062_d0	NAD_d0+ 3_Isopropylmalate_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ 2_isopropyl_3_oxosuccinate_d0
<i>Metabolismo de Lisina</i>	
rxn00337_d0	ATP_d0+ L_Aspartate_d0 <=> ADP_d0+ 4_Phospho_L_aspartate_d0

rxn01643_d0	Phosphate_d0+ NADP_d0+ L_Aspartate4_semialdehyde_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ 4_Phospho_L_aspartate_d0
rxn01301_d0	NAD_d0+ L_Homoserine_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ L_Aspartate4_semialdehyde_d0
rxn02928_d0	NAD_d0+ tetrahydrodipicolinate_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ Dihydrodipicolinate_d0
rxn07441_d0	2_Oxoglutarate_d0 + LL_2_6_Diaminopimelate_d0 <=> H2O_d0+ H_d0+ L_Glutamate_d0 + tetrahydrodipicolinate_d0
rxn01974_d0	LL_2_6_Diaminopimelate_d0 <=> meso_2_6_Diaminopimelate_d0
rxn00313_d0	H_d0+ meso_2_6_Diaminopimelate_d0 -> CO2_d0+ L_Lysine_d0
rxn00178_c0	2 Acetyl_CoA_c0 <=> CoA_c0 + Acetoacetyl_CoA_c0
<i>Metabolismo de Arginina e Prolina</i>	
rxn00189_c0	H2O_c0+ L_Glutamine_c0 -> NH3_c0+ L_Glutamate_c0
rxn00187_d0	L_Glutamate_d0 + ATP_d0+ NH3_d0 -> Phosphate_d0+ H_d0+ L_Glutamine_d0+ ADP_d0
rxn01019_d0	Ornithine_d0+ Carbamoylphosphate_d0 <=> Phosphate_d0+ H_d0+ Citrulline_d0
rxn01434_d0	ATP_d0+ L_Aspartate_d0 + Citrulline_d0 -> PPI_d0+ 2 H_d0+ AMP_d0+ L_Argininosuccinate_d0
rxn14058_d0	H_d0+ 3 NADPH_d0+ 4 O2_d0 + 2 L_Arginine_d0 -> 4 H2O_d0+ 3 NADP_d0+ 2 Citrulline_d0+ 2 NO_d0
rxn00469_c0	H2O_c0+ N_Acetylmithine_c0 <=> Acetate_c0 + Ornithine_c0
rxn01636_d0	L_Glutamate_d0 + N_Acetylmithine_d0 <=> N_Acetyl_L_glutamate_d0+ Ornithine_d0
rxn01637_d0	2_Oxoglutarate_d0 + N_Acetylmithine_d0 <=> L_Glutamate_d0 + 2_Acetamido_5_oxopentanoate_d0
rxn02465_d0	Phosphate_d0+ NADP_d0+ 2_Acetamido_5_oxopentanoate_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ n_acetylglutamyl_phosphate_d0
rxn01917_d0	ATP_d0+ N_Acetyl_L_glutamate_d0 <=> ADP_d0+ n_acetylglutamyl_phosphate_d0
rxn00192_d0	L_Glutamate_d0 + Acetyl_CoA_d0 -> H_d0+ CoA_d0 + N_Acetyl_L_glutamate_d0
rxn00184_c0	H2O_c0+ NADP_c0+ L_Glutamate_c0 <=> H_c0+ NADPH_c0+ NH3_c0+ 2_Oxoglutarate_c0
rxn00802_d0	L_Argininosuccinate_d0 <=> L_Arginine_d0+ Fumarate_d0
rxn00394_d0	H2O_d0+ L_Arginine_d0 -> Ornithine_d0+ Urea_d0
rxn00101_c0	H2O_c0+ 2 H_c0+ Urea_c0 -> CO2_c0+ 2 NH3_c0
rxn00929_d0	NAD_d0+ L_Proline_d0 <=> 2 H_d0+ NADH_d0+ 1_Pyrroline_5_carboxylate_d0
rxn00931_d0	NADP_d0+ L_Proline_d0 <=> 2 H_d0+ NADPH_d0+ 1_Pyrroline_5_carboxylate_d0
rxn00179_d0	L_Glutamate_d0 + ATP_d0 <=> ADP_d0+ L_Glutamyl_5_phosphate_d0
rxn02373_d0	Phosphate_d0+ NADP_d0+ L_Glutamate5_semialdehyde_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ L_Glutamyl_5_phosphate_d0
<i>Metabolismo de Histidina</i>	
rxn00789_d0	ATP_d0+ PRPP_d0 -> PPI_d0+ H_d0+ Phosphoribosyl_ATP_d0
rxn02834_d0	H2O_d0+ Phosphoribosyl_ATP_d0 -> PPI_d0+ 2 H_d0+ Phosphoribosyl_AMP_d0
rxn02835_d0	H2O_d0+ Phosphoribosyl_AMP_d0 <=> phosphoribosylformiminoacar_phosphate_d0
rxn03175_d0	H_d0+ phosphoribosylformiminoacar_phosphate_d0 <=> phosphoribulosylformimino_AICAR_phosphate_d0
rxn02473_d0	D_erythro_imidazol_glycerol_phosphate_d0 -> H2O_d0+ imidazole_acetol_phosphate_d0
rxn02320_d0	2_Oxoglutarate_d0 + L_histidinol_phosphate_d0 <=> L_Glutamate_d0 + imidazole_acetol_phosphate_d0
rxn02159_d0	NAD_d0+ L_Histidinol_d0 <=> H_d0+ NADH_d0+ L_Histidinal_d0

rxn00863_d0 H2O_d0+ NAD_d0+ L_Histidinal_d0 <=> 2 H_d0+ NADH_d0+ L_Histidine_d0

Metabolismo de Tirosina, Fenilalanina e Triptofano

rxn00527_d0 2_Oxoglutarate_d0 + L_Tyrosine_d0 <=> L_Glutamate_d0 + p_hydroxyphenylpyruvate_d0

rxn01494_c0 O2_c0 + L_Dopa_c0 -> H_c0+ 4_L_Alanyl_2_hydroxy_cis_cis_muconate_6_semialdehyde_c0

rxn01827_d0 O2_d0 + p_hydroxyphenylpyruvate_d0 -> CO2_d0+ Homogentisate_d0

rxn00493_d0 2-Oxoglutarate[d0] + L-Phenylalanine[d0] <=> L-Glutamate[d0] + Phenylpyruvate[d0]

rxn00495_c0 L_Phenylalanine_c0 -> NH3_c0+ E_Cinnamate_c0

rxn01611_c0 H_c0+ O2_c0 + NADPH_c0+ E_Cinnamate_c0 -> H2O_c0+ NADP_c0+ 4_Coumarate_c0

rxn01182_c0 ATP_c0+ CoA_c0 + 4_Coumarate_c0 -> PPi_c0+ H_c0+ AMP_c0+ 4_Coumaroyl_CoA_c0

rxn01426_c0 S_Adenosyl_L_methionine_c0+ Caffeoyl_CoA_c0 <=> H_c0+ S_Adenosyl_homocysteine_c0+ Feruloyl_CoA_c0

rxn00178_c0 2 Acetyl_CoA_c0 <=> CoA_c0 + Acetoacetyl_CoA_c0

rxn01332_d0 H2O_d0+ Phosphoenolpyruvate_d0+ D_Erythrose4_phosphate_d0 -> Phosphate_d0+ DAHP_d0

rxn02212_d0 DAHP_d0 -> Phosphate_d0+ 5_Dehydroquininate_d0

rxn02213_d0 5_Dehydroquininate_d0 -> H2O_d0+ 3_Dehydroshikimate_d0

rxn01740_d0 NADP_d0+ Shikimate_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ 3_Dehydroshikimate_d0

rxn01739_d0 ATP_d0+ Shikimate_d0 -> H_d0+ ADP_d0+ 3_phosphoshikimate_d0

rxn02507_d0 H_d0+ 1_2_carboxyphenylamino_1_deoxyribose_5_phosphate_d0 -> H2O_d0+ CO2_d0+ Indoleglycerol_phosphate_d0

rxn02476_d0 Phosphoenolpyruvate_d0+ 3_phosphoshikimate_d0 <=> Phosphate_d0+ 5_O__1_Carboxyvinyl_3_phosphoshikimate_d0

rxn01255_d0 5_O__1_Carboxyvinyl_3_phosphoshikimate_d0 -> Phosphate_d0+ Chorismate_d0

rxn00791_d0 PRPP_d0+ Anthranilate_d0 -> PPi_d0+ H_d0+ N_5_phosphoribosyl_anthranilate_d0

rxn01256_d0 Chorismate_d0 -> Prephenate_d0

rxn00493_d0 2-Oxoglutarate[d0] + L-Phenylalanine[d0] <=> L-Glutamate[d0] + Phenylpyruvate[d0]

rxn00527_d0 2_Oxoglutarate_d0 + L_Tyrosine_d0 <=> L_Glutamate_d0 + p_hydroxyphenylpyruvate_d0

Metabolismo de β-alanina

rxn00720_d0 NADP_d0+ Hydrouracil_d0 <=> H_d0+ NADPH_d0+ Uracil_d0

rxn01626_c0 H2O_c0+ Hydrouracil_c0 -> H_c0+ 3_Ureidopropanoate_c0

rxn00654_c0 H2O_c0+ 2 H_c0+ 3_Ureidopropanoate_c0 -> CO2_c0+ NH3_c0+ beta_Alanine_c0

rxn01791_c0 ATP_c0+ beta_Alanine_c0+ Pantoate_c0 -> PPi_c0+ 2 H_c0+ AMP_c0+ PAN_c0

ANEXO 2. Genes unicamente expressos em cafeeiros (susceptível e resistente) após infecção por *Hemileia vastatrix*, agrupados por vias do metabolismo primário. Os números em cada círculo indicam a quantidade de genes únicos no cultivar correspondente; os números na interseção representam a quantidade de genes expressos em ambos os cultivares.

