

VALDIR DIOLA

**RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO CAFEEIRO: MAPEAMENTO
GENÉTICO, FÍSICO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM
RESPOSTA A INFECÇÃO DE *H. vastatrix***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

T

D591m
2009

Diola, Valdir, 1970-

Resistência à ferrugem do cafeeiro : mapeamento genético, físico e análise da expressão gênica em resposta a infecção de *H. vastatrix* / Valdir Diola. – Viçosa, MG, 2009.

x, 90f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Café - Resistência à *Hemileia vastatrix*.
 2. *Hemileia vastatrix*.
 3. Mapeamento cromossômico.
 4. Marcadores genéticos.
 5. Polimorfismo (Genética).
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.7394

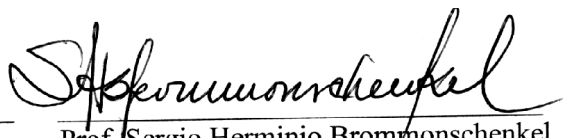
VALDIR DIOLA

**RESISTÊNCIA À FERRUGEM DO CAFEEIRO: MAPEAMENTO GENÉTICO,
FÍSICO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA A INFECÇÃO
DE *H. vastatrix***

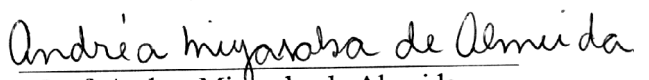
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

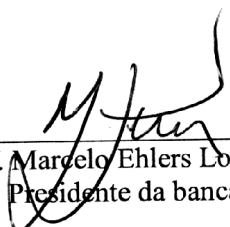
APROVADA: 17 de Junho de 2009


Pesq. Eveline Teixeira Caixeta


Prof. Sergio Herminio Brommonschenkel


Pesq. Luiz Filipe Protasio Pereira


Prof. Andrea Miyasaka de Almeida


Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
Presidente da banca

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, por financiar parte da pesquisa de doutorado.

Ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade, disponibilidade de espaço físico e convívio social.

Ao meu orientador, Marcelo Ehlers Loureiro, pela oportunidade a mim estendida, pela amizade, confiança depositada, preocupação e generosidade. Também, pelo constante incentivo e encorajamento.

Aos professores que ministram disciplinas durante o Doutorado: Marco Aurélio, Fábio da Matta, Raimundo Barros, Elizabeth Fontes, Andrea Miyasaka, José Cambraia, Ney Sussumo, Marcio Barbosa e Tuneo Sedyama.

A Pesquisadora Eveline Teixeira Caixeta, pela co-orientação, contribuições profissionais e sugestões.

Ao Pesquisador do IAPAR, Luiz Felipe Protassio Pereira, pela cooperação no trabalho de pesquisa, desde o material cedido, às sábias sugestões e a Sandra Cação pelo oportuno auxílio nos trabalhos de duplicação da BAC.

A Pesquisadora Eunize Maciel Zambolim pela disponibilidade de materiais e espaço no laboratório, bem como às valiosas orientações e amizade.

A Ana Paula Gallina, Bolsista do projeto pela amizade e disposição em ajudar-me na execução do trabalho.

Ao professor Ney Sussumo Sakiyama, pelas orientações e valorosa amizade.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição e Metabolismo e do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, pelo convívio e amizade, especialmente aos que

acompanharam desde o início do doutorado: Werner, Marcelo, Danilo, Giselle, Roosilene, Daniela, Sabrina, Eduardo, Gustavo, Carla, Francis, Agnaldo e Samuel.

A Rita que me auxiliou no estudo de expressão gênica para a manipulação do equipamento de Real Time.

A Técnica de Laboratório Mercês, pelo auxílio e disponibilidade na realização das atividades laboratoriais.

A minha família que sempre depositou confiança contribuiu para que alcançasse mais esta etapa, em especial, quem sempre esteve transmitindo apoio e confiança, minha esposa Adriana.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal: Carlos Raimundo, Gerlido, Reginaldo, Oswaldo e José Antônio pela disposição em ajudar.

Aos funcionários do banco de germoplasma de de café da UFV, Mário e Sebastião pelo auxílio indispensável nos trabalhos de campo.

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

BIOGRAFIA

VALDIR DIOLA, filho de Achilino Diola e Adelaide Pasquali Diola, nasceu no Município de Irani, Santa Catarina no dia 31 de janeiro de 1970. Em 1992 ingressou no Colégio Agrícola da Água Doce-SC e obteve o diploma de Técnico em Agropecuária em 1995. Entre 1995 a 1998 exerceu esta profissão em diversas áreas agrícolas. Entre 1998 a 2002 atuou como Professor do ensino profissionalizante em nível médio de Técnico em Agropecuária no Estado de Santa Catarina. Em 1998, iniciou a graduação em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, completando o curso em 2002. Em 2003 realizou curso de especialização Lato-sensu de Fundamentos em Biotecnologia pela Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. Em 2004 iniciou o mestrado no Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, completando o curso 17 meses após. Em agosto de 2005 iniciou o doutorado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Em 17 de junho de 2009 defendeu sua tese, completando os requerimentos para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1 RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS.....	3
2 INTERAÇÕES PLANTA-PATÓGENO BIOTRÓFICO.....	5
3 RESPOSTA DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM NÍVEL MOLECULAR.....	6
4 BIOLOGIA MOLECULAR E RESISTENCIA A FERUGEM EM CAFEIEIRO	10
4.1 Marcadores moleculares.....	11
4.2 Mapeamento genético e físico	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPÍTULO 1 – MAPEAMENTO GENÉTICO E FÍSICO DO GENE DE RESISTÊNCIA A <i>H. vastatrix</i> RAÇA II	21
1 RESUMO	22
2 INTRODUÇÃO.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Avaliação da resposta fenotípica da resistência.....	24
3.1.1 Material genético.....	24
3.1.2 Avaliação da resistência à ferrugem	25
3.2 Obtenção dos marcadores moleculares.....	26
3.2.1 Extração do DNA.....	26
3.2.2 Digestão do DNA e ligação dos adaptadores.....	26
3.2.3 Amplificação pré-seletiva.....	27
3.2.4 Formação dos BSAs (<i>bulked segregant analysis</i>) e amplificação seletiva.....	27
3.2.5 Eletroforese.....	28

3.2.6 Revelação da eletroforese.....	28
3.3 Análise da ligação.....	29
3.4 Clonagem	29
3.4.1 Recuperação da banda polimórfica e Reação de PCR	29
3.4.2 Purificação do fragmento genômico	30
3.4.3 Ligação do fragmento no vetor pGEM [®] -T.....	30
3.4.4 Preparação das células ultracompetentes	30
3.4.5 Transformação das células ultacompetentes	31
3.4.6 Recuperação do DNA plasmidial	32
3.5 Sequenciamento do fragmento de DNA e desenho de <i>primers</i>	32
3.5.1 Sequenciamento de DNA.....	32
3.5.2 Desenho dos <i>primers</i> SCARs	33
3.6 Validação dos SCARs (<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i>).....	33
3.7 Isolamento dos clones da biblioteca de BAC (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>).....	33
3.7.1 Cultivo dos clones e isolamento dos plasmídeos	33
3.7.2 Identificação dos clones portadores dos marcadores moleculares.....	34
3.8. Construção dos <i>Contigs</i>	35
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Herança da resistência da raça II de <i>H. vastatrix</i>	35
4.2 Identificação dos marcadores AFLPs ligados à resistência da ferrugem....	36
4.3 Análise da ligação.....	38
4.4. Obtenção dos marcadores <i>SCARs</i>	40
4.5. Identificação dos clones positivos e ordenação dos <i>contigs</i>	42
4.6 Comparação de similaridade das sequencias de DNA de cafeeiro com <i>Vitis sp.</i>	45
5 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA DE RESISTÊNCIA A INFECCÃO DA RAÇA II DE <i>H. vastatrix</i>	57
1 RESUMO.....	58

2 INTRODUÇÃO.....	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.1 Material genético e desenho experimental.....	62
3.2 Extração do RNA total.....	62
3.3 Síntese de cDNA e da dupla fita.....	62
3.4 Identificação dos TDFs por cDNA-AFLP	64
3.5 Clonagem, seqüenciamento.....	64
3.6 Avaliação da similaridade dos TDFs	65
3.7 Análise da expressão diferencial dos fragmentos de transcritos por qRT-PCR	65
4 RESULTADOS.....	67
4.1 Identificação dos fragmentos de transcritos diferencialmente expressos relacionados com a resistência do cafeeiro a infecção de <i>H. vastatrix</i>	67
4.2 Avaliação da similaridade dos TDFs da resposta de resistência a <i>H. Vastatrix</i>	68
4.3 Avaliação quantitativa e temporal da expressão diferencial dos fragmentos de transcritos por qRT-PCR	72
4.3.1 Análise quantitativa da expressão dos TDFs.....	73
4.3.2 Análise temporal da expressão dos TDFs	74
4.3.3 Agrupamento dos TDFs segundo o padrão de expressão.....	77
4.3.3 Coexpressão entre TDFs	78
5 DISCUSSÃO.....	80
6 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

RESUMO

DIOLA, Valdir, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2009. **Resistência à ferrugem do cafeeiro: mapeamento genético, físico e análise da expressão gênica em resposta a infecção de *H. vastatrix***. Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-orientadores: Eveline Teixeira Caixeta, Fabio Murilo da Matta, Raimundo Santos Barros e Andrea Miyasaka de Almeida.

A ferrugem alaranjada causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* é uma das doenças que mais causa prejuízos econômicos aos cafeicultores. O melhoramento genético de cafeeiros visando obtenção de cultivares resistentes é lento e os estudos moleculares de identificação dos genes de resistência a *H. vastatrix* ainda são pouco informativos. Este estudo teve como objetivo obter informações de genética estrutural e funcional desta interação incompatível. Avaliou-se uma população UFV F₂421-4 (Híbrido de Timor x Catuaí) com 224 cafeeiros segregantes para um gene que confere resistência a raça II de *H. vastatrix*. Foi obtido um mapa genético saturado com 25 marcadores *AFLP* que possibilitou a elaboração do mapa genético de alta densidade com 6 marcadores *SCARs* delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM e flanqueando o gene de resistência a 0,7 e 0,9 cM. Os marcadores *SCARs* constituem-se as primeiras ferramentas disponíveis para estratégias para obter a resistência à ferrugem do cafeeiro por seleção assistida por marcadores moleculares. O mapa genético de marcadores *SCARs* orientou a construção do *contig* com 4,7 cM e ~360 kb, obtido pelo ordenamento de 5 clones *BAC* que continham simultânea a presença de dois marcadores. Foram isolados dois clones *BAC* portadores dos marcadores que flanqueiam o gene de resistência compreendendo a uma região ~120 kb. A obtenção do *contig* possibilitará a clonagem do primeiro gene de resistência a ferrugem em café. No estudo de expressão gênica diferencial foram identificados 108 Fragmentos Derivados de Transcritos (*TDF*) através da técnica de *cDNA-AFLP*, sendo 93 desta similares com genes envolvidos em processos biológicos de metabolismo, crescimento, ativação gênica, sinalização, respostas de defesa e degradação controlada de proteínas. Destes, foram selecionados 21 *TDFs* potencialmente envolvidos na sinalização e respostas de defesa para a análise de expressão por *PCR* em tempo real. Os genes selecionados são

ativados 12 h pós-inoculação. Aqueles classificados como envolvidos na sinalização apresentaram maior expressão 24 h após a inoculação e para defesa, aumentaram a expressão exponencialmente até 72 h. Para *TDFs* similares a genes de sinalização, o maior nível de expressão foi observado para um gene *NBS-LRR* e, para a resposta de defesa, um gene que codifica para proteínas relacionadas à patogênese *PR5* (semelhantes à Taumatina). O *TDF NBS-LRR* é um gene candidato do reconhecimento do elicitor do patógeno e *PR5* pode ter um importante papel na resposta de defesa em cafeeiro. A identificação de genes diferencialmente expressos em cafeeiro constitui-se numa importante informação para compreender o mecanismo molecular de resistência à ferrugem.

ABSTRACT

DIOLA, Valdir, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2009. **Coffea leaf rust: genetic, physical mapping and analysis of the gene expression in response to infection the *H. vastatrix*.** Advisor: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Advisors: Eveline Teixeira Caixeta, Fabio Murilo da Matta, Raimundo Santos Barros and Andrea Miyasaka de Almeida.

The coffee leaf rust it is caused by the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix* is one diseases that more it causes economical damages. The coffee breeding for obtaining for resistance plants it is slow and the molecular studies of identification for resistance genes to *H. vastatrix* are still few informative. This study had as objective to obtain information structural and functional genetics of this incompatible interaction. A population UFV F_2 421-4 was evaluated (Híbrido de Timor x Catuai) with 224 coffee plants segregants for a gene for resistance for *H. vastatrix* race II. It was obtained a genetic map saturated with 25 AFLP markers that made possible the elaboration of the genetic map of high density with 6 SCARs markers delimiting a chromosomal region of 9,45 cM and flanking to resistance gene the 0.7 and 0.9 cM. The SCARs markers are first available tools it is constituted for strategies to obtain the resistance for coffee leaf rust by molecular markers assisted selection. The genetic mapping SCARs markers guided the construction of the contig with 4.7 cM and ~360kb, obtained of the ordering of 5 clones BAC that contained simultaneous the presence of two markers. They were isolated two clones BAC bearers of the markers that flanking the resistance gene into region ~120 kb. The obtaining of the contig will make possible the cloning of the first resistance gene the coffee leaf rust. In the study of genic expression were identified 108 Transcripts-Derived Fragments (TDF) through the cDNA-AFLP technique, being 93 of this similar with genes involved in biological processes of metabolism, growth, genic activation, signalling, defense response and protein controlled degradation. Of these, 21 TDFs were selected potentially involved in the signalling and defense response for the expression analysis for Real Time PCR. The selected genes are activated 12 h pós-

inoculation. Those classified as having involved in the signalling presented more expression 24 h pós-inoculation and for defense, increased the expression exponentially up to 72 h. Similar TDFs to signalling genes, the largest expression level was observed for a gene NBS-LRR and, for the defense, a gene that codifies for pathogenesis-related protein PR5 (similar to Thaumatin). TDF NBS-LRR is a gene candidate of the recognition for elicitor of pathogen and PR5 can have an important activity in the defense in coffee plant. The identification gene differentially expressed is constituted in an important information to understand the molecular mechanism of resistance for coffee leaf rust.

INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo do café expandiu por quase todas as regiões tropicais do planeta. No entanto, o avanço das áreas de plantio e a monocultura trouxeram alguns problemas relevantes de ordem biológica e econômica, dentre eles, destacam-se os prejuízos provocados pelas doenças. A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Brome., é uma das mais importantes patologias do cafeeiro. Apareceu inicialmente no continente africano e espalhou-se por quase todas as áreas de cultivo, exceto Austrália e Havaí. No Brasil, a doença foi diagnosticada em 1970. Nos novos locais, a pressão de seleção provocada pelo ambiente sobre o patógeno acelerou a evolução e a formação de novas raças variantes (Varzea et al., 2005). Este processo se acentuou mais em locais de uso contínuo de defensivos com princípios ativos iguais ou similares e nos plantios em larga escala de genótipos de baixa divergência genética (Silva et al., 2006). Mais de 75% das plantações são suscetíveis ao ataque das principais raças fisiológicas do patógeno, e quando não controlada, provoca perdas que situam-se entre 30 e 50% da produção (Zambolim et al., 2002). O interesse na resistência a este patógeno se deve ao fato de que os danos econômicos causados pela redução da produção em nível mundial variam de um a dois bilhões de dólares anuais (Van der Vossen, 2005).

Para contornar o grave problema, na maioria dos casos, o controle do fungo fitopatogênico é feito mediante a aplicação de defensivos agroquímicos (Guzzu, 2004), que por sua vez são potenciais contaminantes ao ambiente e de relativa toxicidade à saúde humana. Apesar do controle com agroquímicos ter apresentado resultados imediatos, em longo prazo contribuiu para a pressão de seleção exercida sobre o patógeno, predispondo o surgimento de novas raças resistentes aos produtos aplicados (Varzea et al., 2005). Uma alternativa mais eficiente é a obtenção de cultivares resistentes, portadoras de genes que conferem resistência específica. Variedades resistentes foram desenvolvidas por meio do melhoramento convencional. Por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, o melhoramento genético clássico do cafeeiro é lento e necessita de técnicas que facilitem e acelerem a seleção de genótipos superiores (Teixeira-Cabral et al., 2004). As técnicas da biologia molecular são

instrumentos promissores para reduzir o tempo de criação das novas cultivares e aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (Sera et al., 2002; Fazuoli et al., 2005).

Longos e exaustivos estudos produziram conhecimento limitado sobre genes de resistência à ferrugem do cafeeiro e uma história longa de sucessos iniciais seguidos por decepções freqüentemente são relatados (Van der Vossen, 2001; Prakash et al. 2004), devido ao surgimento de novas raças virulentas do fungo. Fungos biotróficos como *H. vastatrix*, possuem grande variabilidade fenotípica, e atualmente já foram identificadas cerca de 45 raças fisiológicas (Várzea et al., 2002). No Brasil, 13 raças já foram confirmadas, sendo a raça II, predominante em cultivos comerciais. As principais cultivares plantadas possuem o fator S_H5 de resistência a esta raça de ferrugem (Fazuoli et al., 2005), mas não de seus novos variantes (Caixeta et al., 2003). A identificação molecular dos fatores de resistência é uma tarefa necessária, pois gera informações úteis para sua aplicação imediata e consequente aceleração dos métodos de melhoramento convencional. Embora a resistência da ferrugem tenha sido amplamente estudada e documentada, a elaboração de estratégias que envolvam o uso de marcadores moleculares é incipiente (Herrera et al., 2009).

Existem razões importantes para se estudar a resistência do café à ferrugem. A primeira delas reside no fato de que a compreensão da interação incompatível pode resultar na geração de soluções para o controle da doença em café, minimizando os efeitos negativos do controle químico. Segundo, a existência de extensas áreas de monocultivo com baixa variabilidade genética, freqüentemente conduziu ao aumento da severidade da doença, na redução de rendimento e qualidade (Alvarado et al., 2005). E finalmente, os estudos moleculares podem auxiliar na compreensão de como as células de plantas comportam-se sob situações desse estresse biótico.

A biologia molecular embasada na genômica funcional ou estrutural é uma ferramenta que orienta a tomada de decisões em programas de melhoramento vegetal e permite avanços científicos consideráveis. Tendo como objetivo, a avaliação das respostas genética de resistência a infecção da raça II de *H. vastatrix*, foi realizado o estudo com a população F₂ UFV 421-4 resultante do cruzamento de genitores resistente x suscetível. A meta inicial foi obter marcadores moleculares associados com resistência para a construção de mapas genéticos de alta densidade e elaboração do mapa físico. No outro estudo, usando a técnica de cDNA-AFLP, visou identificar genes diferencialmente expressos associados com a resistência a doença mediante a indução promovida pela presença do patógeno em genótipos resistentes.

REVISÃO DE LITERATURA

1 RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

As plantas, devido a sua imobilidade e exposição ambiental, estão sujeitas ao ataque de vários organismos fitopatogênicos. No entanto, elas possuem adaptações evolutivas para reconhecer potenciais patógenos invasores e desenvolveram vários mecanismos de defesa elaborados para superar o ataque (Staskawicz, 2001; Agrawal e Fishbein, 2006). Ao mesmo tempo em que os patógenos desenvolveram estratégias para superar os mecanismos de resistência das plantas, o processo evolutivo selecionou novas plantas que suportam ou evitam a infecção do patógeno (Keen, 1999). Alguns destes mecanismos são constitutivamente expressos e atuam como barreiras físicas e químicas enquanto outros só são induzidos depois que os patógenos atacam e envolvem uma notável rede de transdução e a ativação da expressão de genes (Heath, 2000).

A proteção inicial da invasão do patógeno é mediada por defesas passivas, como barreiras químicas e físicas (Agrawal e Fishbein, 2006). Barreiras físicas envolvem características como quantidade e qualidade de cera e cutícula das células epidérmicas, estrutura e tamanho da parede celular, localização e forma de estômatos (Silva et al., 2006). Barreiras químicas incluem combinações de fenóis, quinonas, lactonas, glicosídeos, cianogênicos, saponinas, terpenóides, estilbenos e taninos que têm atividade antimicrobiana (Keen, 1999). A parede celular se constitui numa barreira estrutural e é capaz de ativar múltiplas vias de sinalização. Estas propriedades são essenciais para a coordenação de síntese e expansão da parede de células adjacentes (Pilling e Hofte, 2003).

A resistência em plantas pode estar associada com processos de indução pelo reconhecimento do patógeno seguido de rápida reação de hipersensibilidade (HR, *hypersensitive response*) (Agrawal e Fishbein, 2006), que leva a morte celular confinada às células atacadas e as suas adjacentes, objetivando a morte do patógeno invasor e impedir a progressão da doença (Rourke et al, 2006). A HR, quando da invasão de um

patógeno avirulento, é a resposta mais comum de interações gene-a-gene. É caracterizada pela rápida perda de integridade da membrana nas células hospedeiras infectadas e a acumulação de produtos de oxidação de fenóis (Belkhadir et al., 2004).

Embora a HR possa ser uma defesa efetiva contra patógenos biotróficos (Dietz e Edwuars, 2006), é provável que esta resposta do hospedeiro é só uma única parte da estratégia defensiva global da planta (Belkhadir et al., 2004; Agrawal e Fishbein, 2006). A morte celular programada (PCD - do inglês Program cell death) está quase sempre condicionada ao processo de HR, diferindo da habitual associação com a resistência sistêmica por indução (Bent e Mackey, 2007). A HR contribui diretamente para a resistência inicial do hospedeiro e está relacionada à expressão de defesas condicionais pela presença do patógeno (Ferrari et al., 2007).

A resistência raça específica é a resposta de resistência vertical, onde o mecanismo de reconhecimento é exclusivo do hospedeiro e geralmente expressa contra genótipos específicos do patógeno (resistência raça-específica) (Heath, 2000). Em várias interações planta-patógeno, particularmente naquelas que envolvem parasitas biotróficos como as ferrugens, as respostas de resistência são governadas por interações específicas entre locos de avirulência do patógeno (*avr*) e alelos correspondentes da resistência á doença (*R*) na planta (Hammond-Kosack & Jones, 2003). Um único gene *R* pode conferir resistência para uma ou mais raças de um patógeno particular quando transferido para uma planta da mesma espécie, previamente suscetível (Mcdowell & Woffenden, 2003).

A relação de resistência gene-a-gene foi validada na última década com a clonagem de dezenas de genes *R* e genes *avr*, e com base nas análises fenotípicas e genotípicas de incompatibilidade (elicitor-resistência) das interações de planta-patógeno (Rourke et al, 2006). Resistência específica à uma raça (monogênica ou oligogênica), normalmente produz fenótipos com um efeito qualitativo claro sem esporulação, manchas necróticas ou completa falta de sintomas (Van der Vossen, 2005, Silva et al., 2006), geralmente está associada com a morte celular programada (PCD, *programmed cell death*) pela HR por meio de várias reações bioquímicas associadas com o estresse oxidativo e a produção de fitoalexinas (Lindhout, 2002).

Um único gene *R* pode levar a resistência por um certo período, mesmo em ambiente favorável ao patógeno (Bent e Mackey, 2007). A rápida evolução de novos patótipos virulentos em cultivares previamente resistente, força os melhoristas buscarem novas cultivares portadoras de genes *R* em combinação ou não (Pink, 2002).

Outros tipos de resistências baseadas em características quantitativas (QTLs, *quantitative traits locos*) são conferidas por vários genes que atuam em conjunto, alguns com mais intensidade que outros. Embora este tipo de resistência seja a preferida pelos melhoristas porque é durável normalmente gera uma resposta de intensidade variável (Parlevliet, 2002). Este tipo de resistência se refere a resistência mediada via interação entre o produto de múltiplos genes e, não por genes *R*. Conseqüentemente, o QTL pode estar envolvido em qualquer mecanismo de resistência e conseqüentemente também em HR (Lindhout, 2002).

2 INTERAÇÕES PLANTA E PATÓGENO BIOTRÓFICO

Os organismos fitopatogênicos utilizam-se, basicamente, de uma das três estratégias conhecidas para o ataque aos seus hospedeiros, que são necrotrofia, a biotrofia e a hemi-biotrofia (Bent e Mackey, 2007). Patógenos das classes hemibiotrófico e biotrófico como, por exemplo, o fungo da espécie *Hemileia vastatrix*, invadem células vivas e subvertem os metabólicos para seu crescimento e reprodução (Silva et al., 2006). A freqüente formação de manchas esverdeadas sobre as folhas atacadas envolvendo os sítios de infecção do fungo atestam a importância da manutenção das células vivas através desta íntima associação planta-patógeno (Guzzo, 2004; Guzzo et al, 2009). Devido a natureza altamente especializada da associação patógeno e a planta, é provável que pequenas diferenças entre estes organismos possam afetar esta interação.

Voegelé e Mendgen (2003) identificaram que algumas propriedades parecem ser obrigatórias nestes fungos para o estabelecimento biotrófico: (i) estruturas de infecção altamente desenvolvidas; (ii) atividade secretória limitada, especialmente de enzimas líticas; (iii) camadas interfaciais que separam membranas fúngica e plasmáticas da planta precisam conter alto teor de proteínas e carboidratos; (iv) haustório e hifas especializados na absorção de nutrientes; (v) supressão a longo prazo das defesas e indução de genes específicos do hospedeiro.

Para este tipo de patógeno, a interação incompatível planta-patógeno freqüentemente resulta na ativação de resposta de defesa da planta, incluindo a morte confinada de células, característica típica da HR (Hammond-Kosack & Jones, 2003).

3 RESPOSTA DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM NÍVEL MOLECULAR

A resposta de defesa da plantas ao patógeno, raça-específica, se dá a partir do momento em que a planta reconhece um particular produto do patógeno codificado pelo gene de avirulência. Os produtos do gene de avirulência abrangem um grupo de moléculas coletivamente chamadas elicitores (Wang et al., 2009), que podem ser peptídeos ou proteínas, derivado de ácidos graxos, esteróis ou outras substâncias químicas de baixo peso moleculares (Wang et al., 2009), com estruturas diversas e que elicitam a resposta de defesa em muito baixas concentrações (Yamaguchi et al., 2000; Peck, 2003). Após detectarem a presença do patógeno, as plantas respondem ao ataque através da indução de proteínas de defesa que inibem o desenvolvimento do patógeno pela hidrólise enzimática das paredes celulares do fungo e ou pela biossíntese de compostos antimicrobianos (Silva et al., 2006; Guzzo et al., 2009), e fitoalexinas (Ferrari et al., 2007).

O mecanismo de percepção que contém receptores, geralmente localiza-se na superfície celular e são as proteínas *R* codificadas por genes *R*, que são específicas a cada elicitor (Pontier et al., 2002; Wang et al., 2009). Das cinco classes estruturais de proteínas *R*, duas maiores são aquelas que contem domínios de ligação aos nucleotídeos (NBDs, *Nucleotide Binding Domains* ou NBSs, *Nucleotide Binding Sites*) e repetições ricas em leucina (LRRs, *leucine-rich repeat*)(Wang et al., 2008). O NBS é conservado e está envolvido nos eventos da cascata de transdução pela fosforilação com ATP ou GTP (Dangl e Jones, 2001; Bent e Mackey, 2007). O LRR é um domínio conservado com regiões hipervariáveis e está envolvido no reconhecimento do patógeno. As duas classes de NBS-LRR podem ser divididas pela presença de domínios adicionais, como o domínio TIR (*Toll/Interleukin-1 receptor like*) e ou um domínio CC (*coil-coiled*), na sequência amino-terminal (Belkadir et al., 2004; Koornneef e Pieterse, 2008). O domínio TIR é um sinalizador induzido por estresse ambiental ou ataque de patógenos. Diferente dos demais genes de resistência em plantas, os grupos NBS-LRR atuam exclusivamente em respostas de resistência (Hammond-Kosack e Jones, 2003; Bent e Mackey, 2007).

A classe mais caracterizada de genes *R* codifica para domínios intra ou extracelular de proteínas NBS-LRR com N-terminais variáveis. O motivo NBS pode se agrupar em duas classes distintas: um com a sequência TIR no N-terminal ao NBS e outro sem esta sequência (*non-TIR*)(Koornneef e Pieterse, 2008). Menos comum é a

proteína serina/treonina cinase, classificadas em proteínas extracelular LRR (eLRR) pois possuem um único domínio transmembrana e ou um C-terminal intracelular com um domínio de proteínas cinase (Hammond-Kosack e Jones, 2003).

Mayers et al., (2003), demonstraram que o domínio catalítico de NBS do gene de resistência está dividido em 6 regiões secundárias, compostas de três α -hélices e três β -fitas. A primeira região, de 231 nucleotídeos (nts), a hélice 1, região chamada como *Apaf-1*, que tem função de indução da apoptose é o local onde ocorre a ligação do GDP ou ADP. Pequenas mudanças de aminoácidos podem promover uma ativação constitutiva do gene *R*, uma vez que ele é regulado negativamente pela desfosforilação (Takken et al., 2006). A ligação de uma proteína, chamada RIN 4 (RPM-1 -*Resistance to P. seryngae Expressing AVRRPM1 - interacting protein-4*), que contém 211 nts, promove a interação física do NBS-LRR com RPM1 e RPS-2 na membrana plasmática em Arabidopsis (Mayers et al., 2003). RIN 4 é requerida para mediar a resistência a doença e é fosforilada quando da infecção de *P. seryngae* que expressa *AvrA* e *AvrRpm1*. Estes efetores (elicitors) são cisteína-proteases que causam mudanças pós-transcricionais em RIN-4, fazendo com que seja liberada do complexo protéico que forma a *R* proteína. A quebra da interação que mantinha o NBS ligado aos primeiros dois domínios do C-terminal do LRR, favorece a mudança de conformação da proteína *R*, levando a um estado ativo (Takken et al., 2006). Belkhadir et al. (2004), propuseram que o NBS-LRR sofre regulação negativa, mostrando que quando a proteína truncada para o *Apaf-1*, ocorre a expressão constitutiva levando a célula ou ao indivíduo a morte.

Determinadas sequências diferenciais entre parálogos, resulta na alteração da especificidade. Examinando três haplotipos da família de NBS-LRR em Arabidopsis Wang et al. (2008), demonstraram as variações em um conjunto de cópias LRR. Além disso, as regiões hidrofílicas expostas do LRR em muitos genes *R* são hipervariáveis e se correlacionam com suas especificidades (Wang et al., 2008). Regiões com diferentes domínios LRR são responsáveis por reconhecer estresses e desencadear a sinalização. No arroz, no gene de resistência *Pi-ta*, uma única mudança de aminoácido dentro do LRR resultou em suscetibilidade (Huang et al., 2008). No loco *P* de linho, a mudança de seis aminoácidos dentro do motivo fita-P/hélice-P do LRR foi responsável pela especificidade de diferentes locos *P* e *P*₂ (Dodds et al. 2001). O domínio TIR também implica em especificidade ao patógeno. Sequenciando 13 alelos do loco *L* em linho, Ellis et al. (1999), mostraram que somente dois alelos diferem no domínio TIR, mas tem especificidades para diferentes isolados de fungos de ferrugem.

Também foram realizadas experiências com domínio truncado para identificar regiões requeridas para a especificidade dos genes *R*. Luck et al. (2000), usando um domínio truncado alterando o TIR e porções do NBS no loco *L*, demonstraram que houve alterações nas especificidades de resistência à doença. Além disso, combinando um TIR funcional de um gene com um LRR funcional de outro obtiveram um gene *R* não funcional, sugerindo que o TIR e LRR atuam em conjunto. Wan der Horn et al. (2000), usando um domínio truncado, identificaram regiões responsáveis pela especificidade nos genes *R Cf-4* e *Cf-9* em tomate. O gene *Mi* (resistência a *Meloidogyne incognita*) funcional com LRR não funcional foi incapaz de conferir resistência. Porém, *Mi-1* não funcional com *Mi* com LRRs ativos, favoreceu o aparecimento de um fenótipo letal pela expressão constitutiva do gene de defesa (Koornneef e Pieterse, 2008). Estes resultados sugerem que novas combinações de genes *R* são potencialmente úteis para a especificidade do patógeno.

A conformação mais compacta do complexo da proteína *R* é a forma ativa, enquanto a linearização leva a inativação e resposta de defesa. O padrão ativo é regulado pela ausência de estímulo. O comportamento das “proteínas-guardas” parece se repetir em vários produtos dos genes *R* (Hammond-Kosack e Jones, 2003; Takken et al., 2006), embora seja mais caracterizado na família de genes NBS-LRR.

Vários receptores, como a família proteína cinase (RLK), que são proteínas com motivos transmembrana com domínios cinase citoplasmáticos de serina/treonina. Elas são rapidamente ativadas na presença do receptor, transferindo um sinal para proteínas da família MAPKs (*mitogen activated kinases*) (Jonak et al., 2002; Zhang et al., 2006), proteínas cinases dependentes de cálcio (CDPK) (Romeis et al., 2001), assim como proteínas cinases associadas a parede celular (WAK) (Wu et al., 2008).

O modelo mais aceitável para o complexo de sinalização durante a ativação de um gene de resistência é proposto pela existência do NBS-LRR na membrana plasmática (Koornneef e Pieterse, 2008; Zipfel, 2008). A associação com um adaptador junto com proteínas de sinalização é responsável pela regulação negativa e torna o gene ativo durante o evento de ligação de elicitores específicos provenientes do patógeno (Wang et al., 2008). O elicitor interage com a proteína e modifica o adaptador. Uma proporção pequena do complexo modificado se associa com o complexo de ativação. A associação do complexo modificado com proteínas ativas resulta no deslocamento do regulador negativo e outras moléculas de sinalização (Koornneef e Pieterse, 2008).

Neste momento, o complexo de ativação sofre mudança conformacional e prepara-se para a ação, recrutando novas interações em outros compartimentos celulares.

O caso mais clássico para a sinalização mediada pelos genes *R* é que as próximas proteínas a serem afetadas são aquelas codificadas pelos genes *EDS* (*enhanced disease signaling*) que amplificam a resposta do sinal, transmitindo para as cinases, ou MAPKs (Zhang et al, 2006), as quais desencadeiam um processo de transfosforilação em cascata, a chamada cascata de cinases (Belkhadir et al., 2004). Pouco se sabe sobre como as cinases transmitem informação ao núcleo da célula (Peck, 2003; Koornneef e Pieterse, 2008). O reconhecimento do patógeno provoca outros eventos de sinalização e numerosas mudanças celulares, como influxo Ca^{2+} , produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zhang et al, 2006), aumento de actina no citoesqueleto, mudanças nos níveis de transcrição (Dangl e Jones, 2001; Peck, 2003), aumento de NADPH oxidases, peroxidases de parede celular, oxidases e amino e fosfoproteínas no apoplasto (Laloi et al., 2004).

A ativação da cascata de sinalização é iniciada na membrana plasmática, podendo desencadear a ativação de uma rede complexa de outras moléculas como ácido salicílico, ácido benzóico, ácido jasmônico, etileno, ácido nítrico, que em poucos minutos induz uma resposta de defesa geral (Zhang et al, 2006), levando a morte celular programada (programmed cell death – PDC) (Glazebrook, 2005) ou defesas diretas contra o patógeno (Harrison e Baldwin, 2004; Delledonne, 2005). Frequentemente a primeira reação de defesa é a HR (Zipfel, 2008), que envolve necrose localizada devido à morte rápida de poucas células ao redor do local da penetração, as quais liberam compostos antimicrobianos (Rourke et al., 2006; Van et al., 2008).

Alternativamente, no processo de transdução do sinal, outras proteínas podem sofrer transfosforilação alterando a conformação e promovendo atividade fisiológica (Zhang et al, 2006). Para alguns casos, a cascata de sinais pode ser desencadeada após uma reação de hipersensibilidade, que ocorre devido ao aumento de radicais livres no interior da célula, numa interação de interconversão de óxido nítrico e oxigênio reativo (Resende et al., 2003; Zipfel, 2008). A presença destes, deve-se ao estresse biótico que interfere principalmente na produção de ácidos tricarbóxicos e acumulação de radicais livres pela quebra da cadeia fotossintética (Hammond-Kosack e Jones, 2003). Quando ocorre a reação de hipersensibilidade, a área atacada pelo patógeno pode ser isolada, principalmente pela síntese de proteínas caspases para a ativação do complexo

apoptossomo (Hammond-Kosack e Jones, 2003). A produção de óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (SA) pode inibir a síntese de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e a atividade da ascorbato peroxidase (Zhang et al, 2006). Por outro lado, o H₂O₂ ativa a síntese de ácido benzóico na conversão a SA e proteínas que atuarão em nível extracelular (Hammond-Kosack e Jones, 2003; Zipfel, 2008).

Normalmente, o processo de transdução de sinais é transmitido para o interior do núcleo celular, onde uma proteína fosforilada é reconhecida por outra proteína (o receptor) (Zipfel, 2008), geralmente o produto de *NPR1* (*nonexpresser of PR gene1*) que fosforilado ativa os *TGAs* (*transcription factors*) (Hammond-Kosack e Jones, 2003). Estes reconhecem seqüências de promotores específicos dos genes de proteínas *PR* (*Pathogenesis-related protein*). Uma vez ativada a transcrição, o produto é traduzido em uma série de proteínas específicas (Bent e Mackey, 2007). Estas são sintetizadas no retículo endoplasmático, envolvidas por vesículas, transportadas para a membrana plasmática e exteriorizadas para a parede celular da planta. Duas grandes classes são mais conhecidas; as β 1,3-glucanases e quitinases. Estas proteínas hidrolíticas reconhecem β 1,3-glucanos da parede do patógeno, atacando-as e degradando a estrutura fúngica, provocando extravasamento e morte do fungo patogênico (Wan et al., 2008; Koornneef e Pieterse, 2008).

Outros modos de ativação da tradução que não sejam por *R proteínas* podem ser ativadas através de receptores de jasmonatos e poliaminas, fosfolipases D (receptor de fitotoxinas), lipoxigenases (receptores de ácido araquidônico), receptores de glucanos da parede do fungo (Wan et al., 2008), receptores de enzimas fúngicas, receptores de glicoproteínas e outros peptídeos elicitores (Van Loon et al., 2006) e ainda, proteases fúngicas de degradação de proteínas da planta (Lin et al., 2009).

4 BIOLOGIA MOLECULAR E RESISTENCIA A DOENÇA EM CAFEIEIRO

Atualmente (junho de 2009) dispõe-se de razoável informação sobre o genoma estrutural e funcional em cafeeiro. Considerando o grande volume de informações depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), encontram-se armazenadas 64.750 seqüências nucleotídicas, destes 3.398 sequencias genômicas, 57.474 ESTs, 3.398 GSSs e 391 cDSs com 160 genes clonados de café.

Um dos estudos que tange maior volume de informações foi o seqüenciamento de ESTs do Genoma Café que gerou mais de 200 mil seqüências e detectou por homologia cerca de 33 mil genes expresso para diferentes estímulos. Dentre as bibliotecas, destaca-se a RM1 por ser gerada a partir de genes expressos em folhas de café infectadas com bicho-mineiro (*Perileuoptera coffeella*) ou com *H. vastatrix*. Esta biblioteca contém 5.567 seqüências validadas (Vieira et al., 2006). Trabalhos relevantes a mesmo nível são encontrados no CIRAD (Centro de Cooperação Internacional de Investigação Agronômica para o Desenvolvimento) na França em combinação com o CIFC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro) de Portugal. Pesquisadores do CENICAFÉ (Colômbia) identificaram 5.980 clones (<http://bioinformatics.cenicafe.org/SI/transcriptAssembly/contigSearch.php>) com similaridade a genes de diversas espécies do banco de dados do NCBI.

Os estudos específicos de relevância para a resistência específica a ferrugem raça II foi produzido por Guzzo (2004) e Guzzo et al. (2009), que identificou mais de 700 clones diferencialmente expressos por hibridação subtrativa por PCR, relacionados a SAR em genótipo suscetível ou presença de *H. vastatrix* em genótipo resistente. Outro estudo realizado por Silva et al. (2006), estudando ESTs originadas da expressão diferencial de genes pela presença de *H. vastatrix* em café, identificaram 10% dos genes ligados a sinalização e 12% dos genes associados a defesa contra a infecção.

Apesar do grande volume de dados gerados e armazenados, fica clara a dificuldade em se identificar genes específicos. Este volume de informações genéticas é ainda maior, pois uma parcela considerável dos dados gerados nos projetos de pesquisa em café, estão indisponíveis ao acesso público.

4.1 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Se um loco molecular apresenta segregação mendeliana este poderá ser considerado um marcador. Devido a isto, os marcadores de DNA podem ser utilizados no estudo de genética de populações, mapeamento, como DNA *fingerprinting* ou para complementares estudos de sistemática, entre outros possíveis usos. Todavia, a opção pela adoção de uma destas técnicas deverá levar em conta alguns aspectos, tais como o objetivo do estudo, as características apresentadas pelo

material genético, a disponibilidade de estrutura física, de recurso financeiro e de tempo, os quais serão determinantes para escolha do tipo de marcador a ser empregado.

Mais de 100 genes envolvidos na resistência a ferrugem foram identificados utilizando técnicas de marcadores moleculares em várias espécies de interesse agrônomico (Bent e Mackey, 2007). No trigo, marcadores ligados ao gene de resistência a *Puccinia recondita* f. Sp. *Tritici* tem sido obtido em *Triticum aestivum* e em espécies selvagens do mesmo gênero (Sun et al., 2008). Em espécies leguminosas, dois marcadores ligados ao gene de resistência determinando resposta de hipersensibilidade ao fungo *Uromyces viciae-fabae* foram obtidos através do uso da metodologia de BSA (*bulks segregants analysis*) (Avila et al., 2003). Em *Populus deltoides*, foi possível flanquear o gene de resistência a *Melampsora medusae* pela obtenção de dois marcadores ligados ao gene de resistência (Tabor et al. 2000).

Em espécies do gênero *Coffea*, poucas informações estão disponíveis a este nível. Alguns trabalhos como de Moreno et al. (2000) e Prakasch (2004), apresentaram uma contribuição inicial. Dentre os poucos marcadores ligados a genes de resistência a ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada por *H. vastatrix*, até o momento, destacam-se os marcadores associados ao fator S_{H3} de resistência à ferrugem (Prakash et al., 2004; Mahé et al., 2008). No primeiro estudo foram identificados 21 marcadores moleculares e no segundo estudo, os marcadores foram transformados em SCARs, dos quais foram identificados marcadores co-segregando com o gene. Em outro estudo, na fase inicial do presente trabalho, Brito (2007), identificou três marcadores moleculares de AFLP ligados ao gene de resistência a *H. vastatrix*, patótipo da raça II.

Marcadores moleculares foram largamente empregados em melhoramento assistido e na clonagem de genes de interesse, para uma extensa lista de espécies cultivadas. Em espécies do gênero *Coffea*, onde as informações disponíveis são muito escassas em nível molecular, a obtenção de marcadores ligados a principal doença desta cultura auxiliará tanto os programas de melhoramento assistido, como para o estabelecimento de estratégias de clonagem de genes da resistência a *H. vastatrix*.

4.2 Mapeamento genético e físico

Um mapa genético de ligação mostra os locais relativos aos marcadores de DNA ao longo do cromossomo. Qualquer característica herdada física ou molecular

que difere entre genótipos distintos é facilmente detectável usando marcadores. Estes podem ser compostos de fragmentos de restrição de sequências expressas (genes) ou segmentos de DNA que não têm nenhuma função de codificação conhecida, mas que tem padrão de herança constante. Um mapa de ligação é obtido mediante a ordenação do conjunto de marcadores sobre um plano de segmento de reta, pelo posicionamento baseado na taxa de recombinação dos genótipos (Shultz, 2007).

A partir do mapa genético e da identificação de clones BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) que contenham a mesma sequência do marcador, é possível obter o mapa físico. O sequenciamento das pontas de dos clones a ordenação por alinhamento dos *contigs* de espécies com genoma conhecido facilitam a clonagem posicional (Lai et al., 2006). As bibliotecas de BAC são preferidas por apresentarem fácil manipulação, estabilidade e baixo quimerismo dos clones em relação às demais vetores de clonagem com grandes insertos de DNA (Zhang e Wu, 2001; Ammiraju et al., 2006).

O *contig* consiste em um arranjo ordenado dos clones BAC sobrepondo-se em pequenos ou extensos fragmentos, que pode representar uma sequência curta, uma região ou um segmento cromossômico completo. É a técnica mais utilizada para encontrar genes localizados em uma área pequena, abaixo de 2 Mb (Shultz, 2007). Mapas de *contigs* são difíceis de serem produzidos quando é necessário cobrir grandes regiões cromossômicas, pois ocorrem muitas regiões que não foram clonados os BACs (Lai et al., 2006). Podem ser usadas técnicas que usam sondas de DNA para preencher as lacunas, ou fazer o caminhamento cromossômico (*chromosome walking*), ou ainda usar de estratégias de sintenia por similaridade de genomas. O ordenamento dos *contigs* gera o mapa físico de uma região cromossômica, que contém os locos candidatos delimitados pelos marcadores moleculares. Este mapa possibilita a identificação precisa do fragmento de DNA que é transmitido mendelianamente pelas sucessivas gerações.

Mapas físicos foram obtidos a partir de mapas de ligação pelo ancoramento de clones BAC de grandes insertos formando contigs. Estes, auxiliaram na elucidação pelo ordenamento de genomas inteiros por meio de técnicas de *whole genome shotgun* (WGS) em projetos de sequenciamento (Jailon et al., 2007). Usando clones BAC, Barker et al. (2005) definiram estratégias que possibilitaram a clonagem posicional e facilitou estudos estruturais dos genes do desenvolvimento de tubo polínico de plantas, enquanto Castellarin et al. (2007), identificaram estas famílias de genes e seus QTLs. Esta técnica também contribuiu para o isolamento de genes de glutenina em trigo e serviu de modelo para plantas de interesse ou genes homólogos em espécies poliplóides

(Gu et al., 2006). Atualmente, dentre as espécies vegetais que dispõem de mapas físicos mais detalhados, destacam-se; arábida (Mozzo et al., 1999), sorgo (Klein et al., 2000), arroz (Jena e Mackill, 2008), soja (Wu et al., 2004), macieira (Han et al., 2007), algodoeiro (Kelleher et al., 2007) e videira (Troggio et al., 2007). Os mapas físicos genômicos usam grandes bibliotecas contendo clones que carregam grandes inserções de DNA e tem se tornado o centro de atenção das pesquisas atuais, bem como, das comparações virtuais de sequências genômicas para espécies animais e vegetais. Os mapas físicos proveem plataformas essenciais para grandes sequenciamentos e para a identificação de genes específicos e suas regiões regulatórias (Zhang e Wu, 2001).

A identificação de genes de interesse e o seu posicionamento com as regiões regulatórias completas é o objetivo principal nos projetos de pesquisa que envolve respostas monogênicas específicas, como neste caso de resistência vertical ao fungo biotrófico da ferrugem alaranjada da folha do cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, A.A.; Fishbein, M. Plant defense syndromes. *Ecology*, Supplement, 2006. **87(7)**:132–S149
- Alvarado, G.A. Evolution of *Hemileia vastatrix* virulence in Colombia. pp. 99- 115. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea VMP (eds), *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa, 2005.
- Ammiraju, J.S.S.; Luo, M.; Goicoechea, J.L.; Wang, W. ; Kudrna, D.; Mueller, C.; Talag, J.; Kim, H.; Sisneros, N.B.; Blackmon, B.; Eric Fang, E.; Tomkins. J.B.; et al. The *Oryza* bacterial artificial chromosome library resource: Construction and analysis of 12 deep-coverage large-insert BAC libraries that represent the 10 genome types of the genus *Oryza*. *Genome Research*. 2006 **16**: 140-147
- Ávila, C.M.; Sillero, J.C.; Rubiales, D.; Moreno, M.T.; Torres, A.M. Identification of RAPD markers linked to the Uvf-1 gene conferring hypersensitive resistance against rust (*Uromyces viciae-fabae*) in *Vicia faba* L. *Theoretical Applied Geneicst*. 2003. **2**:353-358
- Barker, C.L.; Donald, T.; Pauquet, J.; Ratnaparkhe, A.; Bouquet, A.; Adam-Blondon, F.; Thomas, M.R.; Dry, I. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical Applied Geneicst*, 2005. **111**:370-377.

Belkhadir, Y.; Subramaniam, R.; Dangl, J.L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*. 2004. 7:391-399.

Bent AF, Mackey D: Elicitors, effectors, and *R genes*: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review Phytopathology*. 2007, **45**:399-436.

Brito, G.G. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. *Doctor Scientiae*, Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2007. 98pp.

Caixeta, E.T.; Rufino, R.J.N.; Oliveira, A.C.B.; Sakiyama, N.S.; Zambolim, E.M.; Zambolim, L. Caracterização da resistência genética do híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, (eds): Porto Seguro. Anais. Brasília, DF : Embrapa Café. 2003. p. 226. 447pp.

Castellarin, S.D.; Di Gaspero, G.; Marconi, R.; Nonis, A.; Peterlunger, E.; Paillard, S.; Adam-Blondon, A.F.; Testolin, R. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*. 2007. 7:12-21.

Dangl, J.L.; Jones, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 2001. **411**:826-833.

Delledonne M. NO news is good news for plants. *Current Opinion Plant Biology*. 2005. **8**:390-396.

Dietz, H.; Edwards, P.J. Recognition that causal processes change during plant invasion helps explain conflicts in evidence. *Ecology*: Vol. 87. 2006. **6**:1359-1367

Dodds, P.N.; Lawrence, G.J.; Ellis, J.G. Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat b-strand/b-turn motif determine the difference between the *P* and *P2* rust resistance specificities in flax. *Plant Cell*, 2001.**13**: 163–178.

Ellis, J.G.; Lawrence, G.J.; Luck, L.E.; Dodds, P.N. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determines differences in gene-for-gene specificity. *Plant Cell*. 1999. **11**: 495–506.

Fazuoli, L.C.; Oliveira, A.C.B.; Toma-Braguini, M.; Silvarolla, M.B. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at the IAC. In: Zambolim, L. (ed) *Durable resistance to coffee leaf rust*. UFV, Viçosa, 2005. pp137-185

Ferrari, S.; Galletti, R.; Denoux, C.; De Lorenzo, G.; Ausubel, F.M.; Dewdney J. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires *PHYTOALEXIN DEFICIENT3*. *Plant Physiol* 2007, **144**:367-379.

Glazebrook J. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens, *Annual Review of Phytopathology*, 2005. **43**: 205-227

Gu, Y.Q.; Salse, J.; Coleman-Derr, D.; Dupin, A.; Crossman, C.; Lazo, G.R.; Huo, N.; Belcram, H.; Ravel, C.; Charmet, G.; Charles, M.; Anderson, O.D.; Chalhoub, B. Types and rates of sequence evolution at the high-molecular-weight glutenin *locus* in hexaploid wheat and its ancestral genomes. *Genetics*, 2006. **174**:1493-1504.

Guzzo, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese de doutorado, Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2004. 236pp.

Guzzo, S.D.; Harakava, R.; Tsai, S.M. Identification of coffee gene expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. *Journal Phytopathology*. 2009. **1**:1-14

Hammond-Kosack, K.E.; Jones, J.D.G. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003. **14**:177-193.

Han, Y.; Gasic, K.; Marron, B.; Beever, J.E.; Korban, S.S. A BAC-based physical map of the apple genome. *Genomics*, 2007. **89**:630-637.

Harrison, M.J.; Baldwin, I.T. Biotic interactions: Ploy and counter-ploy in the biotic interactions of plants. *Current Opinião Plant Biology*, 2004. **7**:353-355.

Heath, M.C. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 2000. **44**:321-334.

Herrera, J.C.; Alvarado, G.; Cortina, H.; Combes, M.C.; Romero, G.; Lashermes, P. Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica*, 2009. in press.

Huang, C.L.; Hwang, S.I.; Chiang Y.C.; Lin, T.P. Molecular evolution of the *Pi-ta* Gene Resistant to Rice Blast in Wild Rice (*Oryza rufipogon*). *Genetics*, 2008. **179**:1527-1538.

Jaillon, O.; Aury, J.M.; Noel, B.; Policriti, A.; Clepet, C.; Casagrande, A.; Choisne, N.; et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 2007. **449**:463-468.

Jena, K.K.; Mackill, D.J. Molecular markers and their use in marker-assisted Selection in Rice. *Crop Science*, 2008. **48**: 1266-1276

Jonak, C.; Okresz, L.; Bogre, L.; Hirt, H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002. **5**:415-424.

Koornneef, A.; Pieterse, C.M.J. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, 2008, **146**:839-844.

Keen, N.T. Plant Disease Resistance: Progress in basic understanding and practical application. In: Callow JA (eds), *Advances in Botanical Research*, 1999. pp.291-328.

Klein, P.E.; Klein, R.R.; Cartinhour, S.W.; Ulanich, P.E.; Dong, J.; Obert, J.A.; Morishige, D.T.; Schlueter, S.D.; Childs, K.L.; Ale, M.; Mullet, J.E. A highthroughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. *Genome Reserch*, 2000.**10**:789-807.

Kelleher, C.T.; Chiu, R.; Shin, H.; Bosdet, I.E.; Krzywinski, M.I.; Fjell, C.D.; Wilkin, J.; et al. A physical map of the highly heterozygous *Populus* genome: integration with the genome sequence and genetic map and analysis of haplotype variation. *Plant Journal*, 2007. **50**:1063-1078.

Lai, C.W.; Yu, Q.; Hou, S.; Skelton, R.L.; Jones, M.R.; Lewis, K.L.; Murray, J.; Eustice, M.; Guan, P.; Agbayani, R.; Moore, P.H.; Ming, R.; Presting, G.G. Analysis of papaya BAC end sequences reveals first insights into the organization of a fruit tree genome. *Moecularl Genet Genomics*, 2006. **276(1)**:1-12

Laloi, C.; Apel, K.; Danon, A. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004. **7**:323-328.

Lin, F.; Ding, H.; Wang, J.; Zhang, H.; Zhang, A.; Zhang, Y.; Tan, M.; Dong, W.;Jiang, M. Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. *Journal of Experimental Botany*, 2009. p. 1-18

Lindhout, P. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable resistance. *Euphytica*, 2002. **124**:217-226.

Luck, J.; Lawrence, G.; Dodds, P.; Shepher, K.; Ellis, J. Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. *Plant Cell*, 2000. **12**: 1367–1377.

Mahé, L.; Combes, M.C.; Várzea, V.M.P.; Guilhaumon, C.; Lashermes, P. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica*). *Molecular Breeding*, 2008.**21**:105–113.

Mcdowell, J.M.; Woffenden, B.J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, 2003. **21**:178-183

Meyers, B.C.; Kozik, A.; Griego, A.; Kuang, H.; Michelmore, R.W. Genome-Wide analysis of NBS-LRR–encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2003. **15**: 809-834.

Moreno, G.; Alvarado, G. La variedad Colombia: veinte anos de adopcion y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. *Cenicafe Technical Bulletin*, 2000. pp. 22:32.

Mozo, T.; Dewar, K.; Dunn, P.; Ecker, J.R.; Fischer, S.; Kloska, S.; Lerhach, H.; Marra, M.; Martienssen, R.; Meier-Ewert, S.; Altmann, T. A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genet*, 1999. **22**:271-275.

Parlevliet, J.E. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, 2002. **124**:147-156.

- Peck, S.C. Early phosphorylation events in biotic stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003. **6**:334-338.
- Pilling, E.; Hofte, H.. Feedback from the wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003. **6**:611-616.
- Pink, D.A.C. Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica*, 2002. **124**:227-236.
- Pontier, D.; Mittler, R.; Lam, E. Mechanism of cell death and disease resistance induction by transgenic expression of bacterio-opsin. *Plant Journal*, 2002. **30**:499-509.
- Prakash, N.S.; Marques, D.V.; Varzea, V.M.P.; Silva, M.C.; Combes, M.C.; Lashermes P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. *Theoretical Applied Genet*, 2004. **109**:1311-1317
- Resende, M.V.; Salgado, S.L.; Chaves, Z.M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. *Fitopatologia brasileira*, 2003. **28(2)**:123-130.
- Rourke, D.O.; Baban, D.; Demidova, M., et al. Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Research*. 2006. **16**: 1005-1016.
- Romeis, T.; Ludwig, A.A.; Martin, R.; Jones. J.D.G. Calcium-dependent protein kinase plays an essential role in the plant defense response. *EMBO Journal*, 2001. **20**:5556-5567.
- Sera, T.; Alteia, M.Z.; Petek, M.R. Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). pp217-251. In: Zambolim L (eds) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa. 2002.
- Shultz, J.L.; Kazi, S.; Bashir, R.; Afzal, J.A.; Lightfoot, D.A. The development of BAC-end sequence-based microsatellite markers and placement in the physical and genetic maps of soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007. **114(6)**:1081-1090.
- Silva, M.C.; Nicole, M.; Guerra-Guimarães, L.; Rodrigues Jr., C.J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiology Molecular in Plant Pathology*, 2002. **60**:169-183.
- Silva, M.C.; Várzea, V.; Guimarães, L.G.; Azinheira, H.G.; Fernandez, D.; Petitot, A.S.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Nicole, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 2006.**18(1)**:119-147.
- Staskawicz, B. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology*, 2001. **125**:73-76.
- Sun, X.; Bai, G.; Carver, B.F. Molecular markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr41*. *Molecular Breeding*, 2008. **23**: 311-321.

Tabor, G.M.; Kubisia, K.T.L.; Klopfenstein, N.B.; Hall, R.B.; McNabb, H.S. Bulk Segregant Analysis Identifies Molecular Markers Linked to *Melampsora medusae*. Resistance in *Populus deltoides*. *Genet Resistance*, 2000. **90**:1039-1042

Takken, F.L.W.; Albrecht, M.; Tameling, W.I.L. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 2006, **9**:383–390

Teixeira-Cabral, T.A.; Sakiyama, N.S.; Zambolim, L.; Pereira, A.A.; Barros, E.G.; Silva, D.G. Characterization of differential coffee tree hosts for *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. with RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2004. **4**:68-73.

Troggio, M.; Malacarne, G.; Coppola, G.; Segala, C.; Cartwright, D.A.; Pindo, M.; Stefanini, M.; Mank, R.; Moroldo, M.; Morgante, M.; Grando, M.S.; Velasco, R. A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics*, 2007.**176**:2637-2650.

Van der Hoorn, R.A.; Roth, R.; De Wit, P.J. Identification of distinct specificity determinants in resistance protein *Cf-4* allows construction of a *Cf-9* mutant that confers recognition of avirulence protein *avr4*. *Plant Cell*, 2000. **113**: 273–285.

Van der Vossen, H.A.M. State-of-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. UFV, Viçosa, 2005.pp1-29

Van der Vossen, H.A.M. Coffee breeding practices. In: Clarke RJ, Vitzthum OG (eds) Coffee recent Developments. *Agronomy*, 2001. **1**:184-201.

Van Loon, L.C.; Pieterse, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*. 2006. **44**:135-162,

Varzea, V.M.P.; Marques, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance pp.53-74. In: Zambolim L, Zambolim E, Várzea VMP (eds), *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, 2005.

Varzea, V.M.P.; Rodrigues Jr., C.J.; Silva, M.C.; Gouveia, M.; Marques, D.V.; Guerra-Guimarães, L.; Ribeiro, A. Resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. In: Zambolim L (ed.), *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*, 2002. pp.297-320.

Vieira, L.G.E.; Andrade, A.C.; Colombo, C.A.; Moraes, A.H.A.; Metha, A., et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 2006. **18(1)**:95-108.

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

Wan, J.; Zhang, X.; Neece, D.; Ramonell, K.M.; Clough, S.; Kim, S.; Stacey, S.G.; Stacey, G. A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2008. **20**: 471–481.

Wang, G.; Ellendorff, U.; Kemp, B.; Mansfield, J.W.; Forsyth, A.; Mitchell, K.; Bastas, K.; Liu, C.M.; Woods-Tor, W.; Zipfel, C., et al. A Genome-Wide Functional Investigation into the Roles of Receptor-Like Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2008. **147**:503-517

Wang, S.; Rao, P.; Ye, X.. Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. *Applied Microbiology for Biotechnology*, 2009. **82**:79–86

Wu, C.; Sun, S.; Nimmakayala, P.; Santos, F.A.; Meksem, K.; Springman, R.; Ding, K.; Lightfoot, D.A.; Zhang, H.B. A BAC- and BIBAC-based physical map of the soybean genome. *Genome Reserch*, 2008. **14**:319-326.

Yamaguchi, T.; Ito, Y.; Shibuya, N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. *Trends Glycoside Glycotechnology*, 2000. **12**:113-120.

Zambolim, L.; Vale, F.X.R.; Costa, H.; Chaves, G.M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: Zambolim L (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. UFV, Viçosa, 2002. pp369-450.

Zhang, A.; Jiang, M.; Zhang, J.; Tan, M.; Hu, X. Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Abscisic Acid-Induced Antioxidant Defense and Acts Downstream of Reactive Oxygen Species Production in Leaves of Maize Plants. *Plant Physiology*, 2006, **141**: 475–487.

Zhang, H.B.; Wu, C. BAC as tools for genome sequencing. *Plant Physiology Biochemistry*, 2001. **39**: 195–209.

Zipfel, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2008, **20**:10–16

CAPITULO 1

MAPEAMENTO GENÉTICO E FÍSICO DO GENE DE RESISTÊNCIA A *H. vastatrix* RAÇA II

1 RESUMO

Neste trabalho, avaliamos uma população de 224 cafeeiros segregantes contendo apenas um gene de resistência a raça II de *Hemileia vastarix*. Foi construído um mapa genético saturado com 25 marcadores AFLP, cujo qual possibilitou a elaboração do mapa genético de alta densidade com 6 marcadores SCARs delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM e flanqueando o gene de resistência a 0,7 e 0,9 cM. Baseando-se no mapa genético de alta densidade foi obtido o contig parcial desta região cromossômica com 4,9 cM e um espaço físico menor de ~360 kb por meio do ordenamento de 5 clones BAC com presença comum de dois marcadores cada. Foram isolados dois clones BAC portadores simultaneamente dos marcadores mais próximos do gene de resistência, indicando que o loco compreende um espaço físico de ~120 kb. Este estudo traz implicações potenciais para futuras aplicações de estratégias de seleção e melhoramento em café visando a resistência durável e estudos relacionados a identificação, estrutura e função dos genes que codificam para a resistência ao patógeno.

PALAVRAS CHAVES: Gene R, mapeamento genético, *contig*, ferrugem do cafeeiro

2 INTRODUÇÃO

A resistência do cafeeiro a *H. vastatrix* tem sido muito explorada em *C. arabica* e em outras espécies do mesmo gênero. Componentes de resistência ao fungo, tanto de natureza monogênica quanto oligo ou poligênica, foram identificados. A resistência raça-específica parece ser determinada por pelo menos nove genes, chamados de S_H1 a S_H9, isoladamente ou em combinação (Fazuoli et al., 2002; Sera et al., 2002). A avirulência correspondente é condicionada por fatores *avr1* a *avr9* (Bettencourt & Rodrigues 1988). Foram identificados fatores de resistência S_H1, S_H2, S_H4 e S_H5 no germoplasma de *C. arabica*. Os outros genes, S_H6, S_H7, S_H8 e S_H9, foram introgrididos de *C. canephora*, e S_H3 de *C. liberica* (Bettencourt e Rodrigues 1988; Prakash et al. 2004).

Os genótipos de café são classificados em grupos fisiológicos que são essencialmente distintos por respostas que envolvem resistência completa ou suscetibilidade (baixo e alto grau de infecção) para várias raças de ferrugem. O grupo A, encontrado em híbridos derivados de cruzamentos de *C. arábica* e *C. canephora*, como o Híbrido de Timor (HDT), um híbrido espontâneo, que é caracterizado pela resistência a todas as raças conhecidas. Plantas do grupo A são encontradas em *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. eugenoides* e *C. congensis*, etc, enquanto o grupo E, caracterizado por suscetibilidade a quase todas as raças conhecidas, inclui as cultivares derivadas das cultivares Typica e Bourbon (Bettencourt e Rodrigues Jr., 1988).

Recentemente, algumas variedades comerciais melhoradas, derivadas de HDT e outros híbridos tetraplóides interespecíficos, como Icatú, tiveram sua resistência quebrada gradualmente pela ferrugem em alguns países devido ao aparecimento de novas raças ou patótipos virulentos (Várzea e Marques, 2005). Alguns genótipos das variedades de café, porém, mantêm a resistência e outros, embora infectado no campo, apresentam um tipo incompleto de resistência com outros fortemente infectados, sugerindo que eles provavelmente possuem um tipo poligênico de resistência (Alvarado, 2005). Por outro lado, algumas variedades de *C. arabica* como o Rume Sudão e Tafarikella com baixos rendimentos classificados como pertencendo ao grupo suscetível E, mostraram resistência parcial muito alta por muitos anos no campo (Várzea e Marques, 2005). É interessante destacar que quando a produção é totalmente suprimida, a cultivar suscetível Caturra se mostra parcialmente resistente sob condições de forte infecção (Várzea et al., 2002). Em uma população F_2 derivada de genitores suscetível x resistente, os mesmos autores observaram nas plantas com baixa produtividade, resistência parcial ou total e em plantas com alta produtividade mostrando-se apenas resistentes ou suscetíveis e raramente parcialmente resistentes.

Em estudos preliminares feito por Cardoso (1986), Caixeta et al. (2003) e por Brito (2007), foi identificada uma fonte de resistência em Híbrido de Timor a um variante da raça II de *H. vastatrix*, determinada por um único gene ainda desconhecido. Sabe-se que a maioria das cultivares de *C. arabica* são resistentes a raça II (Bettencourt e Rodrigues, 1988), mas este patótipo da raça patogênica consegue infectar e completar o ciclo reprodutivo sobre estas plantas (Caixeta et al., 2003). A partir de então, estudos moleculares e genéticos desta interação em café foram realizadas (Brito, 2007), mas até o momento, geraram pouca informação que permitisse amplo conhecimento sobre este gene de resistência.

O emprego das técnicas moleculares e o desenvolvimento de tecnologias eficientes aumentam a velocidade de identificação e isolamento de genes de plantas (Tanksley et al., 1989). O número de marcadores e informações moleculares sobre os genes de resistência a ferrugem do cafeeiro é limitado (Herrera et al., 2009). Dois estudos voltados a identificação de marcadores ligados em genes S_H foram elaborados nos últimos anos. O loco S_H3 , derivado de introgressão de *C. liberica* em *C. arabica* foi identificado por Prakash et al. (2004), e estudado por Mahé et al. (2008). Estudando uma população derivada de Híbrido de Timor, Brito (2007) identificou três marcadores AFLP ligados ao gene de resistência. Em ambos os estudos, os marcadores foram geneticamente posicionados em mapas genéticos.

Atualmente, para a maioria dos organismos ainda são raros os mapas genéticos, pois as técnicas para a obtenção dos marcadores moleculares que são baseado no padrão de restrição, na PCR e na visualização dos fragmentos polimórficos, são muito trabalhosas (Spigler et al., 2008). Porém, os mapas genéticos de alta densidade que incluem marcadores de DNA são úteis para análises genômicas (Altshuler et al., 2008), como para identificar os genes de interesse e seus componentes não transcritos.

O presente trabalho teve como objetivo identificar a região cromossômica do loco de resistência à *H. vastatrix* patótipo da raça II. Foram gerados 25 marcadores moleculares de AFLP e posicionados em um mapa genético saturado. Seis destes, aqueles localizados a menor distância genética, transformados em marcadores derivados (SCARs), gerando um mapa genético de alta densidade, que orientou o isolamento dos clones de biblioteca de BAC, obtendo os *contigs* e o mapa físico do loco de resistência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Avaliação da resposta fenotípica da resistência

3.1.1 Material genético

A população segregante de 224 plantas da geração F_2 oriundas da autofecundação controlada da planta F_1 UFV 421-4, híbrido derivado do cruzamento artificial do Híbrido de Timor UFV 427-15 (CIFC 1343-136) genitor resistente, e o

Catuai Amarelo UFV 2143-236 (IAC 30) suscetível, acessos do banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Brasil). A escolha do genitor suscetível de *C. arabica* foi baseada em estudos de Pereira (1995) e a variante da raça II de *H. vastatrix* utilizada neste trabalho foi caracterizada biologicamente por Cardoso (1986).

3.1.2 Avaliação da resistência à ferrugem

A avaliação da população para a resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro foi efetuada no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé) do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa, em câmaras de inoculação sob condições controladas. A caracterização da resistência à infecção foi realizada usando uredósporos da raça II de *H. vastatrix*.

Recipientes de acrílico (12,0x12,0x2,5 cm: gerbox) com tampa foram utilizados para acomodar as amostras. As caixas e materiais foram devidamente desinfestados em hipoclorito de sódio a 0,3% por 2 horas e lavados várias vezes com água destilada para remover o excesso do sanitizante. A montagem do recipiente compreendeu a colocação de uma espuma de 0,8 cm de espessura no fundo, recoberta com uma malha de nylon para evitar o contato direto das folhas com a água (30 mL) (Figura 1.2a).

De cada genótipo, foram coletadas folhas jovens completamente expandidas em plena atividade fisiológicas. Em seguida, as folhas foram lavadas em água corrente e enxaguadas duas vezes em água destilada. Procedeu-se o corte dos discos foliares de 2,5 cm de diâmetro, lavando-os em água destilada para remover o conteúdo das células lesionadas. Os discos foram acomodados nos recipientes com a superfície abaxial volta para cima. O desenho experimental foi composto de 2 parcelas (caixas) com 2 genótipos cada caixa e 8 repetições (8 discos cada genótipo = 16 discos por caixa = 16 repetições por genótipo) (Figura 1.2a).

Os discos permaneceram em câmara de inoculação com a caixa aberta por 2 a 3 horas até secar a superfície foliar exposta. Procedeu-se a inoculação de acordo com o método proposto por Tammayo (1988). Os uredósporos com viabilidade mínima de 50%, foram obtidos no laboratório do BioCafé e inoculados nos genitores (resistente e suscetível) e nas plantas da geração F_2 . Com uma micropipeta foram aplicadas 10 gotas de 5,0 μL de suspensão de uredósporos em água destilada ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) em cada disco foliar, permanecendo as caixas abertas por mais 3 a 4 horas. Os gerbox contendo os discos foliares foram colocados por um período de 24 horas na ausência de luz, depois,

por um fotoperíodo de 12 horas luz sob 22°C (±2) e saturação da umidade relativa do ar até ao final das avaliações. A avaliação aconteceu aos 18, 24, 36 e 48 dias após a inoculação de acordo com a metodologia descrita por Eskes e Toma-Braghini (1982). Foi considerado que mais de 3 discos com mais de um ponto de esporulação caracterizava a suscetibilidade (Figura 1.2b). Foram realizadas novas repetições para genótipos que apresentavam avaliação duvidosa, repetindo o mesmo processo quando apresentaram resultados contraditórios no final da genotipagem com marcadores moleculares.

Usando o aplicativo de informática “MapDisto Versão 1.7 beta para Excel” (<http://mapdisto.free.fr>) (Lorieux, 2007) para análise estatística χ^2 , foi determinada a segregação fenotípica da resistência à infecção pela raça Iib de *H. vastatrix*.

3.2 Obtenção de marcadores moleculares de AFLP

3.2.1 Extração do DNA

O DNA dos genitores e da população segregante foi obtido de folhas completamente expandidas e fisiologicamente ativas. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido usando o protocolo de extração DNA genômico com CTAB (Murray e Thompson, 1980). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Hitachi U2000) e visualizadas em gel de agarose a 1% e diluídas para uma concentração de 100 ng μL^{-1} .

3.2.2 Digestão do DNA e ligação dos adaptadores

Foram digeridos 600 ng do DNA de cada genótipo numa reação de 12,5 μL , utilizando 1,5 U de cada enzima de restrição *EcoRI* e, ou, *MseI* (*Promega*), 1,25 μL de tampão OPA 1X (*One phor all – Pharmacia*), e 0,065 μL de BSA 10mg.mL⁻¹ (*Pharmacia*), de acordo com Sambrook et al. (1989). A digestão ocorreu por um período de 8 h a 37° C. Em um gel de agarose (1%) foram aplicados 5 μL da reação para avaliar visualmente a eficiência da clivagem.

A reação de ligação dos *primers* adaptadores foi preparada com os outros 7,5 μL da reação de digestão ($\sim 400\text{ng}$ de DNA), mais 0,5 μL de cada *primer* ($75\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), *primer dsEcoRI* 5' CTAGTAGACTGCGTACC 3' e ou *primer dsMseI* 5' GACGATGAGTCCTGAGT 3', 1 U de T4 DNA ligase (*Biosystem*), 2,0 μL do tampão de ligação 10X (*Biosystem*), completando o volume para 20 μL com água estéril. A ligação correu por um período de 12 h (*overnight*) a 16° C. As amostras foram diluídas em tampão TE (1x) na razão de 1/10 e armazenado a -20 °C.

3.2.3 Amplificação pré-seletiva

A amplificação pré-seletiva foi realizada em termociclador Mastercycler personal (*Eppendorf*) usando os primers *EcoRI* 5' GACTGCGTACCAATTCN 3' e *MseI* 5' GATGAGTCCTGAGTAA N 3'. Para um volume final de 25 μL , utilizou 2,5 μL da reação de ligação diluída 10X, e os demais reagentes: tampão de reação de PCR 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, 0,01 mM DTT e 0,02 mM de triton 100), 1,5 mM de MgCl, 0,25 mM de cada dNTP (*Promega*), 1 μL de cada *primer* ($75\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (*Bioneer*) e 2 U Taq DNA polimerase (*Phoneutria*). As etapas da amplificação compreenderam um *Hot-start* de 94 °C por 180s, seguido de 24 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 60 s e 72 °C por 60 s. O produto da pré-amplificação foi avaliado em gel de agarose a 1% mediante visualização, e a reação foi diluída na razão de 1:40.

3.2.4 Formação dos BSAs (*bulked segregant analysis*) e amplificação seletiva

Os BSAs foram montados conforme proposto por Michelmore et al. (1991), adicionando igual volume de reação de pré-amplificação dos 5 indivíduo de cada grupo resistentes ou suscetível.

Na amplificação seletiva utilizou-se primers com a mesma sequência dos primers *pré-seletivos* constituídos por mais duas bases aleatórias adicionais. A PCR (*polymerase chain reaction*) foi realizada usando um *touchdown* PCR de 13 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C (-0,7 °C a cada ciclo) por 30 s e 72 °C por 60s, seguido de 26 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 60 s em um volume final de 20 μL , utilizando 4,0 μL da reação pré-seletiva diluída 40X, e os demais reagentes: tampão de

reação de PCR 1x, 1,25 mM de MgCl, 0,25 mM de cada dNTP (*Promega*), 25 ng de cada *primer* seletivo (*Bioneer*) e 1,5 U Taq DNA polimerase (*Phoneutria*).

Ao produto da reação foram adicionados 8,0 µL do tampão de corrida [formamida 98%, EDTA pH 8,0 10 mM, xileno cianol 1mg/mL e azul de bromofenol 1 mg/mL], desnaturadas em termociclador a 95° C por cinco minutos e avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% visualizada em transiluminador de luz UV.

3.2.5 Eletroforese

Os produtos de amplificação foram separados em sistema eletroforético “Sequi-GenT” (*BioRad*) em gel de poliacrilamida [acrilamida/bis-acrilamida (19:1) 6,0%, 7,5 M de uréia, TBE 1,0X], de dimensões 50,0x38,0x0,035 cm. Foram empregados 80 mL da solução de bis-acrilamida 6%, 75 µL de TEMED e 350 µL de persulfato de amônio 10%, polimerizado por 40 minutos. Depois procedeu-se o pré-aquecimento do equipamento conectando a cuba eletroforética a uma fonte de energia (*PowerPlus – Biorad*) sob uma voltagem de 1800 a 2000V e 90 a 100 Watts por um período de 60 a 90 minutos até atingir 50 °C. Em seguida o pente de separação das amostras com 49 poços foi acomodado no gel. Foram aplicados 7,5 µL de cada reação de PCR desnaturada e submetido a eletroforese com 80 Watts por aproximadamente 3 h.

3.2.6 Revelação do produto eletroforético

Empregou-se o método de coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata (Creste et al., 2001), adaptado por Brito (2007). Após a eletroforese, a placa contendo o gel foi imersa em solução de fixação contendo etanol absoluto 10% e ácido acético 1%, sob agitação lenta por 12 min, lavando-se em seguida com 2 L de água ultrapura por 1 minuto, colocando-se solução de oxidação [ácido nítrico 1,5%] por 3 min e lavando-se novamente com água ultrapura. O gel foi corado com solução de AgNO₃ (0,3%) por 25 min, lavado duas vezes por 30 s e colocado em 1 L de solução de revelação [Na₂CO₃ (3%) (*GE Healthcare*) e formaldeído (0,02%)], mantendo sob agitação até que as primeiras bandas foram visualizadas. A solução foi descartada e mais 1 L de nova solução adicionada ao processo. Após a completa revelação, o gel foi

imerso em solução bloqueadora [ácido acético a 5%] por 5 min e lavado em seguida. O gel corado foi mantido na posição vertical em local arejado para secagem e posterior análise dos fragmentos de DNA amplificados pela conversão em imagem digital.

3.3 Análise da ligação

A ordem de aplicação obedeceu a sequência; genitor suscetível, genitor resistente, grupo suscetível e grupo resistente de acordo com a combinação de *primers* (figura 1.3a). A análise do polimorfismo foi realizada visualmente e confirmado mediante densitometria digital pelo software McdiTM - Gel & Blot Analysis System (<http://www.mcid.com.uk/>) considerando intensidade >10 (valores em pixels). As combinações de *primers* que apresentaram polimorfismo foram analisadas individualmente para cada genótipo que formavam os agrupamentos suscetível e resistente (abertura do grupo) (figura 1.3b). Confirmado o polimorfismo, aplicava-se a combinação de primers a toda a população de mapeamento.

A segregação Mendeliana dos marcadores na população F_2 foi testada pela análise do χ^2 para dominância (3:1), usando a planilha do Excel preparada para o “MapDisto Versão 1.7 beta” (<http://mapdisto.free.fr>) (Lorieux, 2007). O mesmo programa foi usado para analisar o grupo de ligação considerando a taxa máxima de recombinação entre o gene e o marcador 30% ($r \max 0,3$) e *LOD score* mínimo 5,0 (LODmin 5). As frequências de recombinação foram convertidas em distâncias centiMorgans (cM) pelo método clássico e a função de mapeamento Haldane com o método II de seriação e ordenação dos locos por *Bootstrap*, usando o critério SARF (*sum of adjacent recombination fractions*) com os dados normalizados pelos LODs. A plotagem dos mapas foi realizada no modo “*Mapmaker*”.

3.4 Clonagem

3.4.1 Recuperação da banda polimórfica e reação de PCR

Após a comprovação da ligação do marcador molecular, a banda polimórfica das plantas resistentes foi recuperada do gel de poliacrilamida usando um protocolo proposto por Caetano-Anollés e Trigiano (1996), com as seguintes modificações. Foi

demarcada e cortada a região desejada do gel, reidratada com 30 μL de tampão TE 1x. O gel hidratado foi macerado em 80 μL de tampão TE 1x dentro de um tubo de microcentrífuga de 0,6 mL e centrifugando a 12.000g por 5 min. Foram usados 5 μL da solução para realizar a PCR com conjunto de *primers* específicos que deram origem ao fragmento amplificado. A PCR foi feita com 32 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 60 s e um ciclo final de 72 °C por 5 min. O volume final da reação foi de 40 μL , usando além da suspensão da matriz gélida, os reagentes: tampão de reação de PCR 1x, 1,25 mM de MgCl, 0,15 mM de cada dNTP (*Promega*), 25 ng de cada oligo específico e 2,0 U Taq DNA polimerase (*Phoneutria*).

3.4.2 Purificação do fragmento genômico

Com o objetivo de eliminar componentes da reação de PCR, o produto da amplificação foi aplicada a um gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a 0,002% e submetida a eletroforese em tampão TBE 1x a uma voltagem de 70V por 25 minutos para fragmentos de ~500 pb (pares de bases)(variando o tempo proporcionalmente com o tamanho do fragmento). A banda foi cortada e eluída do gel utilizando o Kit ilustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (*GE Healthcare*) de acordo com as recomendações do fabricante. O fragmento recuperado foi quantificado em espectrofotômetro e armazenado a -20° C.

3.4.3 Ligação do fragmento no vetor pGEM®-T

A ligação do fragmento de interesse foi feita em vetor de clonagem pGEM®-T (*Promega*) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação com volume final de 10 μL , contendo 5 μL de 2X *Rapid Ligation Buffer*, 3 U μL de T4 DNA ligase, 10 ng de fragmento genômico, 50 ng de plasmídeo pGEM®-T (relação plasmídeo/vetor de 3/1). A reação ocorreu por 12 horas a 8 °C, em seguida armazenada a -20 °C.

3.4.4 Preparação de células ultracompetentes

Foi usado o protocolo proposto por Inoue et al. (1990), utilizando a linhagem DH5 α de *E. coli*. Inicialmente, 50 μL da solução estoque de bactérias (glicerol 15%)

foram plaqueados em meio LB+Agar (1%) e crescidas por 12-16 h a 37 °C. Foram coletadas 10 a 12 colônias de crescimento radial maior de 1 mm e cultivadas em 250 mL meio SOB [extrato de levedura 5%, bacto-triptona 2%, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl e 10 mM de MgSO₄] sob agitação a 19° C até atingir OD 600 (Densidade óptica). As culturas foram colocadas em gelo por 10 min, centrifugadas a 4000xg por 10 min a 4 °C, ressuspensas em 80 mL de meio TB [Tampão MES 10 mM, CaCl 15 mM, KCl 250 mM e MnCl₂ 55 mM], mantidas em gelo por 10 min e centrifugando a 4000xg por 10 min a 4 °C. Em seguida foram ressuspensas em 20 mL de meio TB e 1,4 mL de DMSO, aliquotadas em volumes de 150 µL, congeladas com nitrogênio líquido e estocadas em ultrafreezer a -80 °C.

As células foram testadas utilizando vetores fechados e vazios (o vetor controle do kit pGEM[®]-T-*Promega*). Foram aceitos índices de transformantes $>1 \times 10^8$ cfu.µg⁻¹ de DNA (conforme orientação da fabricante).

3.4.5 Transformação de células ultracompetentes

A transformação foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (1989). O descongelamento das células foi feito em gelo e a reação de ligação (item 3.4.4) foi adicionada ao tubo. Depois de 20 min procedeu-se a transformação promovendo o choque térmico a 42 °C durante 45 a 50 s e retornando os tubos em gelo por 2 min. Acrescentou-se 850 µL de meio SOC em pH 7,0 [10g.L⁻¹ de bacto-tryptona, 5g.L⁻¹ de extrato de levedura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, de MgCl₂ 10 mM, 10 mM MgSO⁴ e 20 mM de glicose], incubando a 37 °C sob agitação por 1,5 horas. Depois foram plaqueados 200 µL do meio em crescimento com alça de Drigasliki em placas contendo 20 mL de meio LB [10g L⁻¹ de bacto-tryptona, 5g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5g.L⁻¹ de NaCl], agar 1%, ampicilina 100 µg mL⁻¹, 0,5 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalatosideo = indutor do *operon* Lac de *E.coli*) e X-GAL 80 µg mL⁻¹ (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galatosideo). Após, as colônias bacterianas foram crescidas a 37 °C por 16 horas. Colônias brancas, portadoras de plasmídeos com inserto, isoladas e com desenvolvimento acima de 1 mm de diâmetro foram cultivadas em 10 mL de meio LB+ampicilina a 37° C durante 16 horas sob agitação.

3.4.6 Recuperação do DNA plasmidial

Para a extração dos plasmídeos foi usado o método de lise alcalina proposto por Birnboim e Doly (1979) com modificações. Os cultivos foram centrifugados a 4000 g por 8 min a 4 °C, descartando o sobrenadante e ressuspensando o pellet em 180 µL de solução I [50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl e 10 mM de EDTA]. O homogenato foi lisado com 20 µL de lisozima (10 mg mL⁻¹) em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, levou-se os tubos ao gelo e adicionou-se 400 µL da solução II [0,1 M de NaOH e SDS 1%], homogeneizando a solução por inversão e mantendo em gelo por 5 min. Foi acrescentado 500 µL da solução III [29,5% de KAc e 11% de ácido acético glacial], permanecendo em gelo por 10 min com inversão a cada 2 min e centrifugado a 12.000 g por 5 min a 4 °C, recuperado o sobrenadante e adicionado a 0,6 volumes de isopropanol. Os plasmídeos foram precipitados a 12.000 g por 5 min, os pellets lavados com etanol 70% e depois etanol absoluto e secados. Depois o pellet foi resuspendido em 100 µL TE 1x e 6 µL de RNase A (10 mg mL⁻¹) e exposto a 37 °C por 15 min. Adicionou-se mais 100 µL TE 1x e 100 µL clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e armazenado em gelo por 10 min invertendo os tubos a cada minuto. Em seguida foi centrifugado a 12.000 g por 8 min a 4 °C e coletado o sobrenadante, adicionando 15 µL de NaAc pH 5 [3M] e 2,5 volumes de etanol absoluto, armazenando por 12 h a -20 °C. Foi centrifugado a 12.000 g a 4 °C durante 10 min, descartando o sobrenadante, lavando o pellet com etanol 90% e secando a 37 °C por 10 min, diluindo em 25 µL de TE e quantificando em espectrofotômetro. Também foi avaliada a integridade do material genético por eletroforese em gel de agarose a 1% e as concentrações foram ajustadas para 100 ng µL⁻¹. Em seguida foi armazenado a -20 °C.

3.5 Sequenciamento do fragmento de DNA e desenho de *primers*

3.5.1 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado em aparelho sequenciador MegaBACETM 1000 (*Amersham-Biosciences*) no Laboratório de Genômica do Bioagro, na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa-MG e no Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática da USP de Ribeirão Preto-SP. Os *primers* usados foram pUC/M13

forward (24mer) for 5'-d(CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC)-3' e pUC/M13
Reverse (22mer): 5'-d(TCACACAGGAAACAGCTATGAC)-3' .

3.5.2 Desenho dos *primers*

Seis pares de *primers* para as sequências de interesse foram desenhados e testados com auxílio do software *Primer-Blast*, disponível gratuitamente no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Tabela 2.3).

3.6 Validação dos SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*)

Foi realizada a validação dos SCARs nos 224 genótipos da população de mapeamento por PCR de acordo com a metodologia proposta por Paran e Michelmore (1993) com modificações. A amplificação dos SCARs foi realizada usando *touchdown*, com 4 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C (-2 °C a cada ciclo) por 30 s e 72 °C por 60 s, seguido de 28 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 60 s, em um volume final de 20 µL, utilizando 2,0 µL de DNA genômico (100 ng.µL⁻¹), e os demais reagentes: tampão de reação de PCR 1x, 1,25 mM de MgCl, 0,2 mM de cada dNTP (*Promega*), 7 ng de cada *primer* (*Bioneer*) e 1,5 U Taq DNA polimerase (*Phonetrria*). O produto destas reações multiplex foi analisado em gel de poliacrilamida conforme os itens 3.2.5 (eletroforese) e 3.2.6 (revelação) e 3.3 (análise da ligação).

3.7 Isolamento dos clones da biblioteca de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)

3.7.1 Cultivo dos clones e isolamento dos plasmídeos

A biblioteca de BAC de 56.832 clones contendo fragmentos de DNA genômico de *C. arabica* (HT 832/2) foi replicada a partir da biblioteca de BAC existente no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR (Londrina-PR). Foram utilizadas placas de 384 poços (*Corning*), cultivando os clones em 80 µL de cada poço com meio LB enriquecido baseado nas recomendações de Qatibi (1991) [Bacto-triptona 1%,

extrato de levedura 0,5%, glicerol 5%, 10 mM de NaCl, 13 mM de KH_2PO_4 , 36mM de K_2HPO_4 , 1,7 mM de citrato de sódio, 6,8mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 mM de MgSO_4] em meio seletivo com cloranfenicol (*Sigma-Aldrich*) ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As placas foram inoculadas usando um replicador de 384 poços e crescidas por 18 a 22 horas a 37 °C, em seguida, armazenadas a -80 °C. .

3.7.2 Identificação dos clones portadores dos marcadores moleculares

O cultivo dos grupos de clones foi realizado em 10 mL de meio LB enriquecido (excluindo o glicerol), sob temperatura de 37° C por 18 h. Os procedimentos metodológicos adotados para a extração dos clones BAC foi realizada de acordo com o item 3.4.6. A seleção dos clones foi realizada por PCR adaptando o protocolo ao método descrito por Zhu (2002). A PCR compreendeu um *touchdown* com 4 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C (-2 °C a cada ciclo) por 30 s e 72 °C por 60s, seguido de 28 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 60 s. Para um volume final de 20 μL foram utilizados 5 μL de solução de DNA plasmidial (50 ng. μL^{-1}), e os demais reagentes: tampão de reação de PCR 1x, 1,25 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP (*Promega*), 7 ng de cada *primer* e 1,5 U Taq DNA polimerase (*Phonetreria*). Os *primers* utilizados foram os mesmos do mapeamento SCAR.

O produto da reação de PCR foi desnaturado conforme citado no item 3.3.2. Na primeira fase de seleção, as reações de dos grupos com 192 clones foram pré-avaliado por eletroforese em gel de agarose a 1%, sendo os grupos positivos pré-identificados, analisados em gel de poliacrilamida a 6% conforme citado nos itens 3.2.5 (eletroforese) e 3.2.6 (revelação). Nas demais fases, o isolamento dos grupos e clones positivos foi realizado apenas em gel de agarose. A identificação dos clones positivos foi realizada pelo método de decomposição do agrupamento (Figura 1.1):

1ª etapa – 296 grupos de meia placa com 192 clones BAC em duas repetições, totalizando 592 reações.

2ª etapa – redução da meia placa em 4 grupos de 48 clones; 24 meias placas x 4 grupos = 96 reações + repetição do grupo positivo, totalizando 120 reações.

3ª etapa – divisão do grupo de 48 clones em 6 colunas verticais na placa, contendo 8 clones por grupo = $24 \frac{1}{8}$ de placa x 6 grupos = 144 reações + repetição do grupo positivo, totalizando 168 reações.

4ª etapa – isolamento de individual do plasmídeo para cada clone: 24 grupos com 8 clones cada = 192 reações + repetição do clone positivo = 216 reações.

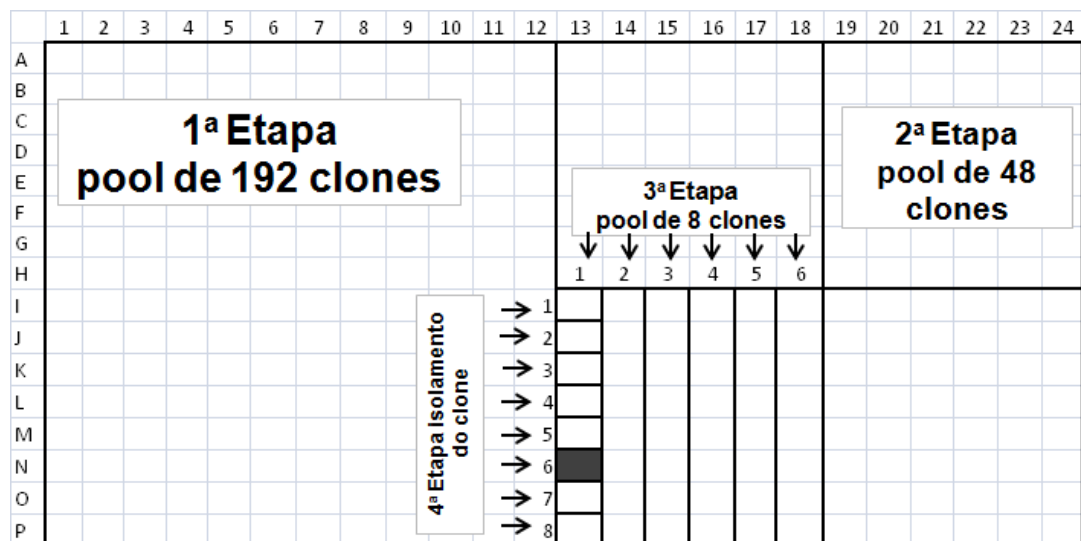


Figura 1.1. Esquema de isolamento e etapas da decomposição dos grupos de clones nas placas de BAC durante a seleção de clones portadores dos marcadores moleculares. Ex. Clone isolado: n° da placa; linha N; coluna 13 (clone 65N13).

3.8. Construção dos *Contigs*

O sequenciamento dos clones BAC (citados na Figura 1.6) contendo 28 locos de marcadores SCARs foi realizado com os *primers* pcc1BAC Senso 5'GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG3' e antisenso 5'CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC3'. O alinhamento das sequências das pontas de BAC (*BAC ends*) foi feita com auxílio dos programas CLC Main Workbench 5 (<http://mac.softpedia.com/get/Math-Scientific/CLC-Combined-Workbench.shtml>) e CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>).

4 RESULTADOS

4.1 Herança da resistência a raça II de *H. Vastatrix*

As plantas resistentes não apresentaram inóculos completando o ciclo de vida (presença de esporulação) em todas as avaliações e repetições efetuadas, enquanto que

nas plantas suscetíveis houve a infecção e esporulação do inóculo, evidenciando o completo ciclo reprodutivo do patógeno (Figura 1.2). Na população segregante F_2 foram identificados 166 genótipos resistentes (74,1%) e 58 suscetíveis (25,9%). Estes dados confirmaram o padrão de segregação de 3:1, esperado para um único gene dominante ($\chi^2=0,09524$ e probabilidade de ligação em 75,76%) (Tabela 1.2). Este estudo confirmou resultados semelhantes alcançados por Brito (2007).

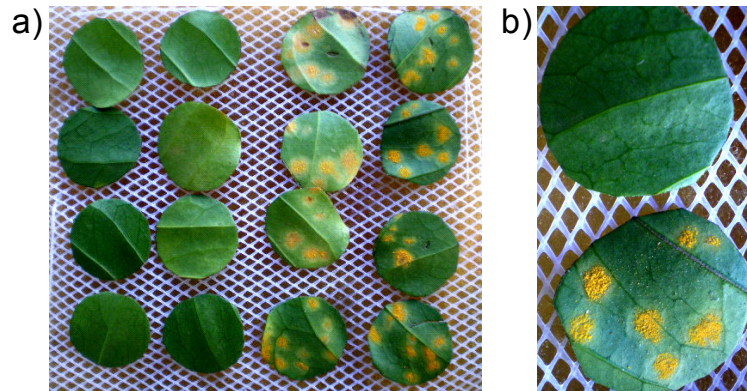


Figura 1.2 a) Montagem de uma réplica do desenho experimental contendo 8 discos foliares de cada genótipo, apresentando os aspectos da análise fenotípica do grau de resistência entre genótipos resistentes (esquerda) e suscetíveis (direita), 24 dias após a inoculação. A presença de esporos indica o completo ciclo reprodutivo e a interação compatível planta/patógeno. b) aproximação da imagem entre genótipos contrastantes.

4.2 Identificação dos marcadores AFLP ligados à resistência da ferrugem

Foram analisadas 1.154 combinações de *primers* seletivos de AFLP, das quais foi possível realizar a análise de aproximadamente 80.000 locos (Tabela 1.1). De acordo com a combinação pré-seletiva (*EcoRI* ou *MseI*), detectaram-se entre 22 e 302 fragmentos de DNA amplificados a cada reação de PCR (dados não apresentados), com média de ~ 70 fragmentos amplificados por combinação de *primer* (Tabela 1.1). O padrão eletroforético de AFLP analisado mostrou que a maior variação encontrada dependeu do padrão de restrição enzimática. O menor número médio de bandas por combinação de *primers* e o maior tamanho médio dos fragmentos foi obtido a partir da restrição com *EcoRI* (restrição rara), e inversamente observado para *MseI* (frequente).

Tabela 1.1 Análise do polimorfismo observado por meio de AFLP na população F2 UFV 421-4

Análise	<u>Combinação pré-seletiva</u>									Total
	EANN/ MTNN	EGNN/ MTNN	ETNN/ EGNN	ETNN/ EANN	ECNN/ MTNN	ECNN/ MANN	EGNN/ MGNN	MCNN/ MGNN		
Número de locos analisados	21044	1682	13162	15797	2141	4066	5491	1623	80151	
Nº de combinações analisadas	256	239	256	256	33	48	60	6	1154	
Locos polimórficos	188	409	596	606	18	149	172	4	2142	
Número de locos por combinação	81.31	70.4	51.4	61.7	64.86	84.70	91.51	270.5	69.45	
Tamanho médio dos fragmentos polimórficos (pb)	403.03	623.7	476.4	398.2	217.50	452.68	378.24	435.25	483.59	
Locos plomórficos por combinação	0.73	1.7	2.3	2.3	0.85	1.10	1.87	0.67	1.86	
Combinações polimórficas (%)	42.97	56.90	87.1	89.84	66.67	71.67	76.67	33.33	77.88	
Polimorfismos em plantas resistentes	21	16	184	103	16	15	8	0	363	
Polimorfismos em plantas suscetíveis	23	25	47	25	5	6	7	0	138	
Razão do polimorfismo R/S	0.94	0.64	3.93	4.12	1.60	2.50	1.14	0	2.48	
Marcadores identificados	0	0	12	7	6	0	0	0	25	

Nota: E ou M; inicial do tipo de adaptador usado para as enzimas, E para EcoRI e M para MseI.

A, T, C ou G; primeira base aleatória adicionada ao adaptador para o *oligo* pré seletivo.

N refere-se a cada nucleotídeo adicional presente nos *oligos*.

Foi observada a presença de polimorfismos em 77,88% das combinações de *primers* analisadas. O tamanho médio dos fragmentos polimórficos foi de aproximadamente 480 pb, deve-se à influência da(s) enzima(s) de restrição usada(s) (preferencialmente *EcoRI* apenas) e ao tempo de extensão na PCR (1 min). Foram identificados 2.142 polimorfismos e cerca de 16,9% destas continham bandas polimórficas no genitor e indivíduos F_2 resistentes. Dos 363 locos polimórficos para indivíduos resistentes foi realizada a abertura dos grupos para apenas 273 polimorfismos (apenas os mais destacados: ex. Figura 1.3), sendo identificados 25 marcadores, ou seja, uma relação de falsos positivos de ~10:1 (Tabela 1.1).

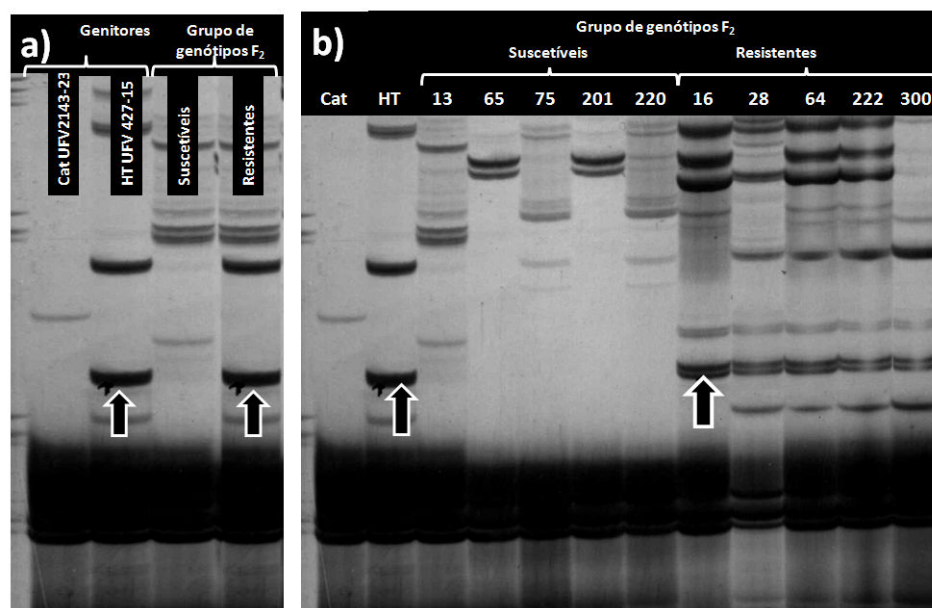


Figura 1.3 Identificação do polimorfismo em indivíduos resistentes indicado pelas setas para combinação de *primers* ETCA/EATG do marcador AFLP M19. a) Grupo fechado (na ordem: genitor suscetível, genitor resistente, grupo suscetível e grupo resistente). b) Abertura dos grupos. (Na ordem: genitor suscetível, genitor resistente, cinco genótipos da população F_2 UFV 421-4 do grupo suscetível e cinco genótipos do grupo resistente).

4.3 Análise da ligação

Os 25 marcadores moleculares AFLPs e os 6 marcadores SCARs foram testados nos 224 genótipos da população segregante F_2 e confirmaram a ligação ao gene de resistência à ferrugem alaranjada do cafeeiro. A Tabela 1.2 apresenta os polimorfismos

encontrados, tamanho aproximado do fragmento, a segregação e a taxa de recombinação dos marcadores em relação ao gene de resistência à ferrugem.

Foi gerado um mapa genético saturado com os marcadores AFLPs para o gene *R* que codifica para a resistência a *H. vastatrix* raça II. O mapa representa uma região cromossômica de aproximadamente 137,39 cMs (Figura 1.5a) e foi a base para a obtenção dos marcadores derivados (SCARs) e a geração do mapa genético de alta resolução (Figura 1.5b).

Tabela 1.2 Marcadores AFLPs e SCARs: combinações de *primers*, tamanho do fragmento polimórfico, análise da segregação e recombinação para o gene de resistência do Híbrido de Timor UFV 427-15 na população F₂ UFV 424-1.

Loco testado	Combinação de <i>primers</i> *	Fragmento (pb)	Nº Individuos		Relação Observada	χ^2 **	p (%)	Recomb. (%) / R***
			-	+				
Gene R	Fenotipagem	-	58	166	2.86	0.095	75.76	0.89
M1	EGTA/ETGA	605	53	171	3.23	0.214	64.34	6.70
M2	ECTC/MTTT	280	58	166	2.86	0.095	75.76	6.25
M3	ECCT/MTTC	300	46	178	3.87	2.381	12.28	8.48
M4	ECGT/MTGT	280	48	176	3.67	1.524	21.70	14.29
M5	ECGT/MTGT	210	54	170	3.15	0.095	75.76	15.18
M6	ECAT/MTCT	150	57	167	2.93	0.024	87.74	20.54
M7	ECAT/MTCT	130	61	163	2.67	0.595	44.04	19.64
M8	ETGA/EGCA	310	46	178	3.87	2.381	12.22	13.39
M9	ETGA/EGCA	280	51	173	3.39	0.595	44.04	16.07
M10	ETAT/EGGC	480	57	167	2.93	0.024	87.74	12.95
M11	ETAT/EGGC	380	53	171	3.23	0.214	64.34	11.61
M12	ETAT/EGTT	385	60	164	2.73	0.381	53.71	16.96
M13	ETTC/EGAG	450	48	176	3.67	1.524	21.70	16.07
M14	ETTA/EGTA	650	47	177	3.77	1.929	16.49	14.73
M15	ETTA/EGTA	230	41	183	4.46	5.357	2.06	9.82
M16	ETCA/EGTA	480	58	166	2.86	0.095	75.76	9.82
M17	ETTC/EGAT	230	46	178	3.87	2.381	12.22	10.71
M18	ETGT/EGGG	350	51	173	3.39	0.595	44.04	7.59
M19	ETCA/EATG	550	51	173	3.39	0.595	44.04	4.02
M20	ETCA/EAGA	320	55	169	3.07	0.024	87.74	4.02
M21	ETCT/EAGA	480	48	176	3.67	1.524	21.70	10.71
M22	ETCT/EATT	420	47	177	3.77	1.929	16.49	10.27
M23	ETGT/EACA	480	57	167	2.93	0.024	87.74	4.91
M24	ETGC/EACA	530	57	167	2.93	0.024	87.74	7.59
M25	ETGT/EACA	380	60	164	2.73	0.381	53.71	8.04
S1	SCAR M18	298	48	176	3.14	1.523	21.700	4.46
S2	SCAR M19	459	50	174	3.11	0.854	56.760	3.57
S3	SCAR M20	208	54	170	3.04	0.095	75.762	1.79
S4	SCAR M23	264	54	170	3.04	0.095	75.762	2.68
S5	SCAR M1	533	54	170	3.04	0.095	75.762	1.79
S6	SCAR M24	437	52	172	3.07	0.380	53.710	2.68

Nota: - ausência da banda (susceptibilidade), + presença da banda (resistência)

*Combinação de *primers*. E ou M: iniciais da enzima de restrição (EcoRI ou MseI) seguido das três bases adicionais ao adaptador.

**Proporção esperada para a herança monogênica e dominante presente na população F₂ (3 resistente, R₃ ou presença da banda / 1 suscetível, rr, ou ausência da banda).

*** Distância percentual estimada para a recombinação genética entre o gene e o marcador molecular específico

Baseando-se na proporção esperada para a herança monogênica e dominante presente na população F_2 de frequência genotípica de 1:2:1, ou seja; 3 genótipos resistentes (R_ ou presença da banda, +) para 1 suscetível (rr ou ausência da banda, -), a análise mostrou uma baixa taxa de segregação entre o loco de resistência e os marcadores testados. Verificou-se, que o marcador M15 está segregando em distorção ($p < 0,05$), no entanto o *LOD score* de ~ 14 entre o demais marcadores (dados não mostrados) e taxa de recombinação de 9,82%, permite considerar a aceitação de que o marcador encontra-se em mesmo grupo de ligação.

Por meio da interação entre marcadores e o gene de resistência calculado baseado nas medidas de distancia por Kosambi em análise de loco simples, foram estimados os valores em 2,1 cM para cada lado do gene R para os marcadores M19 e M20 (Figura 1.5a) resultante de 9 genótipos recombinantes em cada marcador (dados não mostrados) e da interação entre os 25 marcadores e o loco de resistência.

4.4. Obtenção dos marcadores SCARS

Os seis fragmentos correspondentes aos marcadores mais próximos que flanqueiam gene de resistência foram clonados e sequenciados. A partir das sequências foram obtidos os *primers* para os marcadores SCARs (Tabela 1.3). Foi realizada a validação dos *primers* SCARs inicialmente nos genitores e nos genótipos dos grupamentos suscetível e resistente (Figura 1.4) e em seguida na população F_2 UFV 421-4. Os algoritmos de mapeamento utilizados foram os mesmos dos marcadores AFLP (Tabela 1.2). Os marcadores SCARs mantiveram o mesmo ordenamento e possibilitaram a obtenção de um mapa genético de alta resolução (Figura 1.5b)

Tabela 1.3 Relação dos *primers* SCARs obtidos do seqüenciamento dos marcadores mais próximos e flanqueando o loco de resistência.

Marcador AFLP	Tamanho do amplicon (pb)	Primer Sense Sequência 5'→3'	Primer reverso Sequência 5'→3'
M1 EGTA/ETGA	533	CTTGCGGATCTTATCATAAC	TGCTCGACAATTTTCAGCCG
M18 ETGT/EGGG	378	CATCGCCAGGTTTCGTCAC	ATCTTCAATCGGACACAGTG
M19 ETCA/EATG	437	CTCAAAGACAAGTGGTCTCG	CGTTGGTTGCGATGCGAC
M20 ETCA/EAGA	208	GAATACGCGCTACACTATG	CTCTTTCCTATGACGCTCG
M23 ETGT/EACA	298	CAACTGTTTCGGAGAC	ACTACTGACTTACACCAGG
M24 ETGC/EACA	459	CTCTTCCGGCTATCAATCC	GTTCATCTCGACTTCAGCC

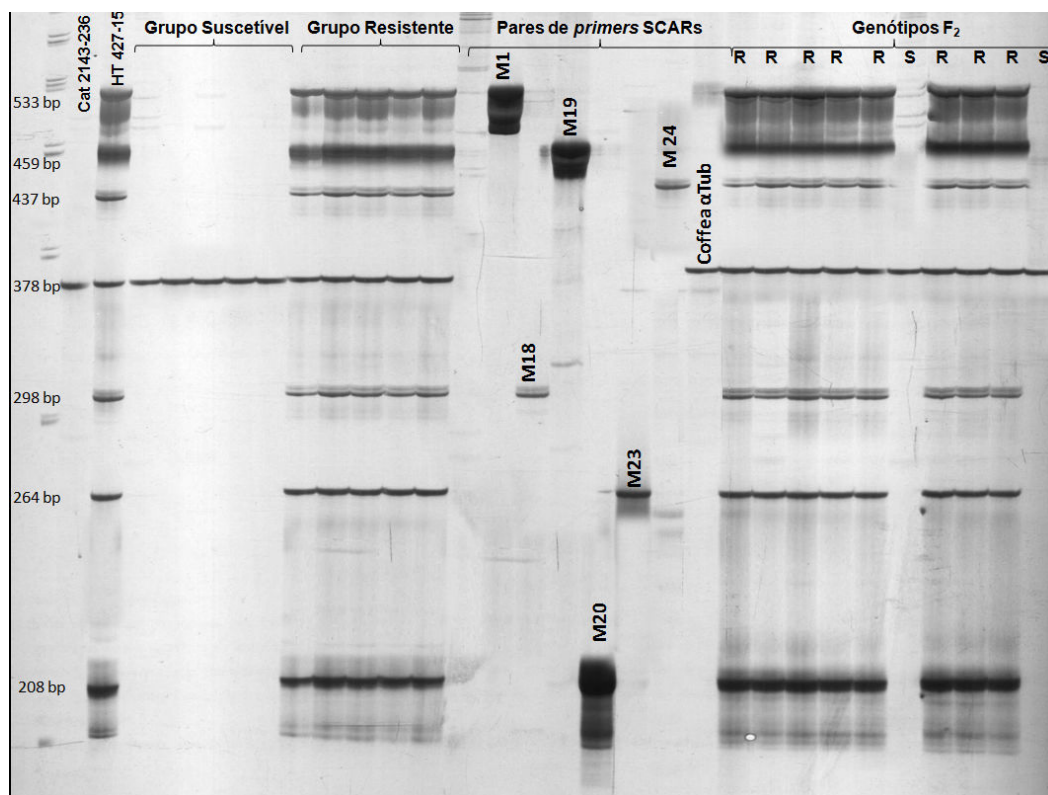


Figura 1.4 Validação dos seis marcadores SCARs mais próximos do gene R em reação multiplex. Na ordem da esquerda para a direita posicionou-se o marcador de peso molecular (100 pb) seguido do o genitor suscetível, genitor resistente, grupamentos suscetível e resistente. Segue-se a validação da determinação das bandas aos tamanhos relativos dos amplicons correspondentes (reações com pares de primers simples) com a amplificação do amplicon constitutivo do exon 2 da α -Tubulina (378 bp), e exemplo da segregação ao demais genótipos da população UFV 421-4-n, caracterizados em suscetíveis (S) e resistentes (R).

O mapa dos marcadores SCARs, apresentou-se com melhor precisão de informação, reduzindo as distâncias genéticas entre o gene de resistência. Este mapa com 6 marcadores SCARs cobriu uma região cromossômica de 9,45 cM. A região de 1,6 cM que contém o gene de interesse é delimitada pelos marcadores SCAR M19 e SCAR M20 derivados dos marcadores AFLP M19 e AFLP M20 (Figura 1.5b).

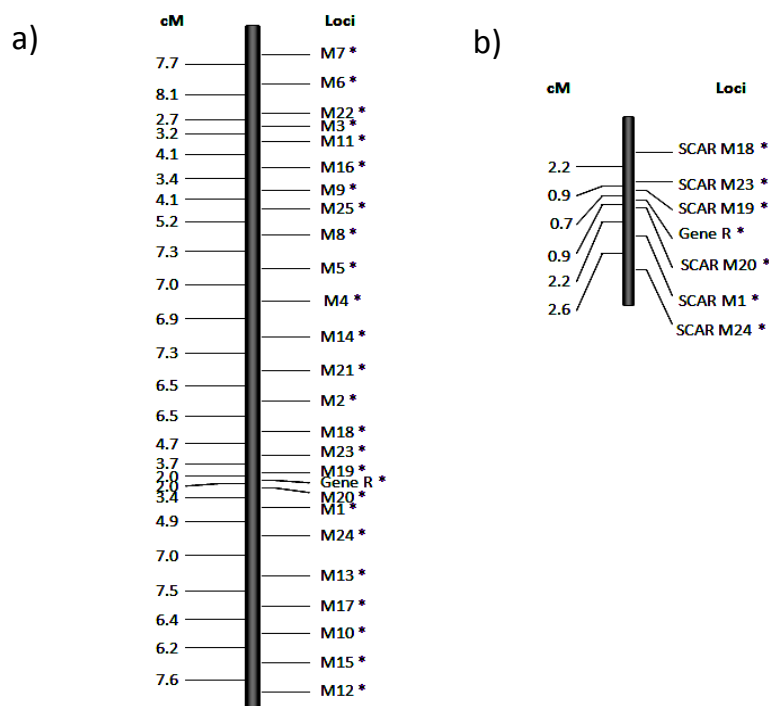


Figura 1.5 Mapa genético do grupo 1 representando a interação dos marcadores e o loco de resistência a infecção por *H. vastatrix* raça IIb. a) Mapa genético saturado por marcadores AFLP, b) mapa genético de alta densidade pelos marcadores SCARs. (Plotagem no formato “Mapmaker” do MapDisto, 2007).

* χ^2 Significativo para segregação de 3:1.

4.5. Identificação dos clones positivos e ordenação dos *contigs*

A identificação de clones BAC portadores de marcadores moleculares baseado na técnica de amplificação por PCR com o multiplex dos SCARs (Tabela 1.3) foi eficiente em detectar clones positivos. A primeira fase da seleção com 296 grupos contendo clones de meia placa (grupo com DNA de 192 clones) permitiu a identificação de 32 clones positivos. Nesta fase foi necessária a identificação pela revelação do fragmento SCAR em gel de poliácridamida, visando separar melhor os fragmentos e melhorar a resolução, aumentando o grau de confiabilidade das fases posteriores. A partir desta fase, a visualização dos grupos de clones positivos foi realizada em gel de agarose, baseando-se na redução dos grupos de clones até encontrar e isolar o clone do respectivo marcador (Figura 1.6a). O uso de três repetições na primeira fase de identificação das meias placas positivas aumentou consideravelmente a acurácia da técnica, evitando erros comuns do isolamento dos clones BAC por PCR.

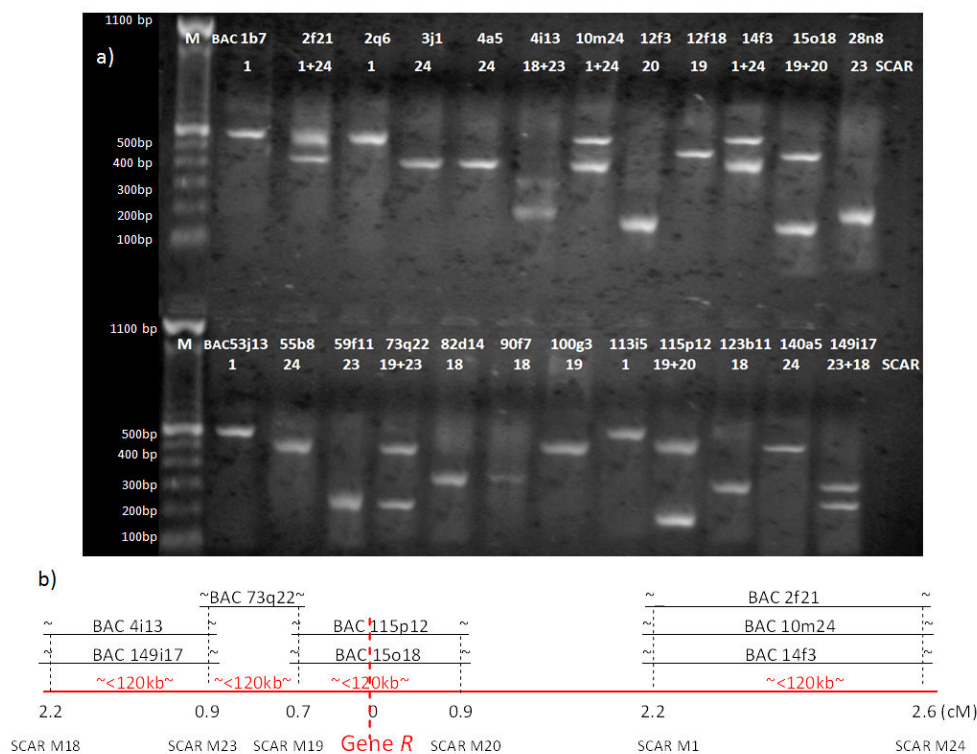


Figura 1.6 Isolamento dos clones BAC de amplificação positiva para os marcadores SCARs. a) imagem de um gel de agarose a 1% na confirmação do isolamento dos clones positivos. b) Esquema do ordenamento dos clones BAC com mais de um marcador identificado, segundo a ordem dos marcadores SCARs sobre o mapa genético.

Nota: M = marcador de peso molecular.

A barra superior indica os clones identificados (ex: clone 1b7; placa 1, na linha b na coluna 7). Na barra inferior indica os marcadores SCARs identificados no clone BAC.

Mesmo com cultivos de 10 mL de meio de cultivo enriquecido, o rendimento de material genético foi baixo, aproximadamente 3 µg. O mesmo peso molecular entre inserto de BAC comparado aos plasmídeos de clonagem (~3 a 6 kb) em relação ao número de cópias é de 15 a 40 vezes menor. Por isso, nos grupos com muitos clones, principalmente nas fases iniciais da seleção, foi necessário cultivar os clones em volumes maiores e purificar melhor o material genético extraído, visando melhorar a amplificação por PCR. Foram isolados 24 clones BAC (Figura 1.6), sendo 8 com dois marcadores cada e 16 com simples marcadores.

Dos clones BAC identificados, apenas 22 insertos genômicos de cafeeiro tiveram suas pontas sequenciadas em ambos os sentidos, excluindo-se os clones 55b8 e 4a5. Destes clones foram geradas 8 sequências contíguas (Figura 1.7) e 26 sequências simples.

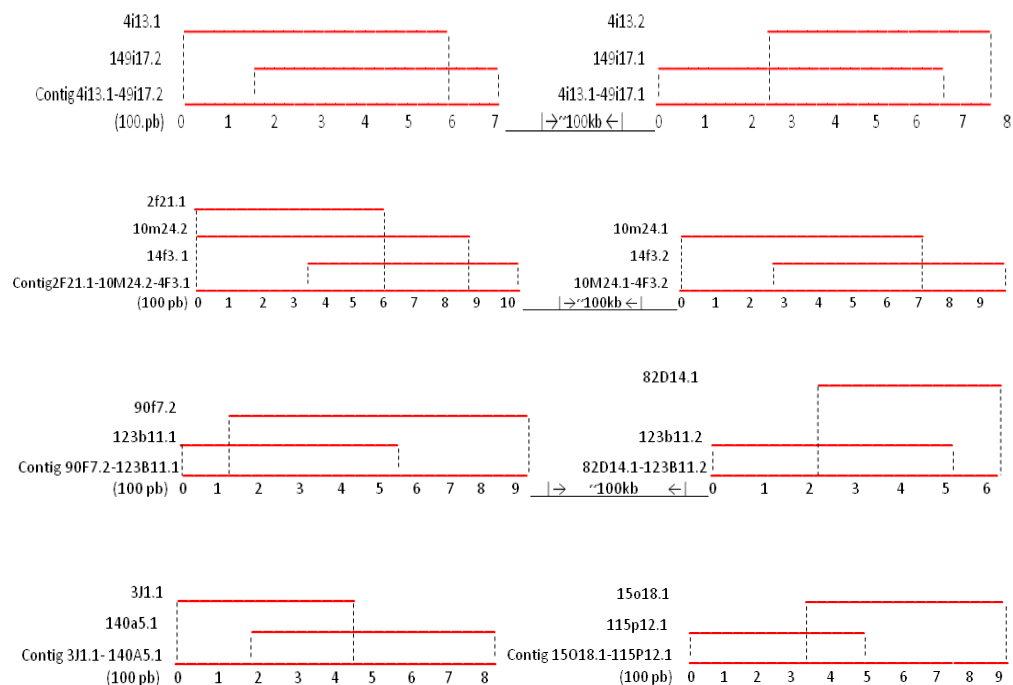


Figura 1.7 Alinhamento das sequências contíguas das pontas dos insertos dos clones da biblioteca de BAC HT 832-2.

- Nota:** 1) Numeração do contig: 90F7.1-123B11.1: 90; nº da placa onde encontra-se o clone na biblioteca, F; linha da placa, 17; coluna da placa e .1; orientação do primer 1 para sentido e 2 para antisenso.
 2) Números abaixo do *contig*, pares de bases multiplicado por 100x.
 3) *Contigs* obtidos pelo alinhamento nos programas CLC Main Workbench 4 e CAP3.

As sequências contíguas (4I13.1-149I17.2 e 4I13.2-149I17.1), (2F21.1-10M24.2-14F3.1 e 2F21.2-10M24.1-14F3.2), e (15O18.1-115P12.1) contêm regiões redundantes com similaridade acima de 95% estando posicionadas em pontas de clones diferentes, mas pertencendo aos mesmos *contigs*. Possivelmente estes 6 clones BAC são duplicatas, uma vez que isto é possível devido a cobertura da biblioteca em é de 6X o genoma do café. Os clones 15O18.2 e 115P12.2 possivelmente não são réplicas, pois suas pontas não são contíguas e provavelmente possuem tamanhos diferentes (Figura 1.7). Também ocorre com as sequências: 3J1.2; 82D14.1; 90F7.2 e 140A5.2. Os demais clones não apresentaram regiões contíguas nas extremidades dos insertos sequenciados, e potencialmente são de tamanho e composição diferente entre si e os demais.

Por se tratar de grandes fragmentos de DNA genômicos de aproximadamente 120kb, o sequenciamento pode não ter gerado sequências contíguas de clones diferentes que não fossem duplicatas. A hipótese de que os contigs na sua maioria são formados

por duplicatas, é que em 6 dos 8 *contigs* obtidos as extremidades foram complementares entre dois ou três clones em ambos os lados (Figura 1.7).

Foi possível obter o mapa físico por meio do ordenamento de clones BAC que continham simultaneamente dois marcadores que orientará o processo de clonagem do gene. Não foi possível construir uma sequência de bases contíguas para o alinhamento dos clones BAC apresentado na Figura 1.6b. Isto ocorre porque o tamanho do fragmento seqüenciado das *BACends* entre 400 e 600 pb em cada lado, somando ambos os lados, representa uma cobertura entre 0,8 a 1% do tamanho do inserto genômico do clone BAC.

4.6 Comparação de similaridade das sequencias de DNA de cafeeiro com *Vitis sp*

Usando os programas de bioinformática BLASTX e BLASTN e, foi realizado uma busca de sequências similares com outras espécies vegetais. Usando o programa Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) foram analisadas 6 sequências provenientes dos marcadores AFLP, 8 *contigs* derivados do alinhamento das pontas de BACs e 26 sequencias derivadas das pontas de BAC que não formaram *contigs* de acordo com Harris et al (2004). Foi detectado que as sequencias de DNA de cafeeiro deste estudo possuem maior similares com *Vitis vinifera*. As sequências mais similares apresentaram E-value entre $1e-03$ e $5e-124$ (Tabela 1.4). Destacam-se que os segmentos mais redundantes são so *contigs* formados pelas pontas dos clones BACs 10M24.2-14F3.2, 2F21.1-10M24.2-14F3.1 e 15O18.1-73Q22.1, cujos quais apresentaram as sequencias mais longas comuns entre as duas espécies (melhores scores). As sequências mais similares foram os marcadores AFLP 1 (74%) e 19 (90%) (Tabela 1.4). O destaque principal da análise é que os marcadores AFLP, *contigs* e sequencias de pontas de BAC, foram estatisticamente posicionados em mesmo grupo de ligação (mesmo cromossomo) em cafeeiro. Estas mesmas sequências estão distribuídas aleatoriamente em diversos cromossomos de *Vitis vinifera*(Tabela 1.4), mostrando uma quebra de sintenia entre as duas espécies durante o processo de evolução.

Tabela 1.4 Comparação de similaridade das sequências genômicas de cafeeiro com sequências genômicas de *Vitis sp.* pelo programa de bioinformática BLAST*

Identificação	Tamanho (pb)	Acesso do GenBank	Descrição da sequências de <i>Vitis sp</i> similar com as sequências de cafeeiro	Cromossomo de <i>Vitis ssp</i>	Total escore	Similaridade	<i>E-value</i>	Máxima identidade
Marcador AFLP 1	533	AM427643.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X022182.39, sequências de <i>whole genome shotgun</i>	1	221	74%	8e-56	70%
Marcador AFLP 18	298	AM437233.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X223624.13, sequências de <i>whole genome shotgun</i>	5	42.8	11%	1e-03	92%
Marcador AFLP 19	459	AM477541.1	<i>Vitis vinifera</i> , sequências de <i>whole genome shotgun</i> , contig VV79X008282.2, clone ENTAV 115	2	118	90%	4e-24	66%
Marcador AFLP 20	211	AM456112.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X111790.5, sequencia de <i>whole genome shotgun</i>	8	55.4	15%	1e-05	96%
Maracador AFLP 24	437	AM432265.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X079613.5, sequências de <i>whole genome shotgun</i>	7	45.4	12%	2e-03	92%
Contig 2F21.1-10M24.2-14F3.1	1.044	XM002273392.1	<i>Vitis vinifera</i> protein hipotética LOC100263135, mRNA	Não localizado nos cromossomos	257	43%	2e-66	72%
Contig 10M24.2-14F3.2	972	AM432323.1	<i>Vitis vinifera</i> sequências de <i>whole genome shotgun</i> , contig VV78X003748.14, clone ENTAV 115	Não localizado nos cromossomos	448	58%	5e-124	77%
Contig 15O18.1-73Q22.1	921	XM002285204.1	<i>Vitis vinifera</i> proteína hipotética LOC100267242, mRNA	6	237	29%	2e-60	80%
Contig 4I13.1-149I17.2	715	AM425635.2	<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X193119.12, sequências de <i>whole genome shotgun</i>	8	64.4	17%	2e-08	71%
Contig 90F7.2-123B11.1	946	XM002269687.1	<i>Vitis vinifera</i> protein hipotética LOC100258335, mRNA	Não localizado nos cromossomos	59.0	6%	9e-07	81%
15O18.2	427	XM002273532.1	<i>Vitis vinifera</i> protein hipotética LOC100253716, mRNA	16	48.2	10%	7e-04	84%
73Q22.2	574	XM002273061.1	<i>Vitis vinifera</i> protein hipotética LOC100259098, mRNA	2	91.5	30%	9e-17	72%

*BLAST: nucleotide blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. acessado em 16 junho de 2009) usando ao algoritmos: blastn e megablast.

5 DISCUSSÃO

Os resultados de segregação fenotípica para a população de cafeeiros descendente de Híbrido de Timor estão coerentes com estudos anteriores (Caixeta et al., 2003 e Brito, 2007), de que a variante da raça II de *H. vastatrix* não infecta o hospedeiro resistente devido a presença de um único gene expressando o caráter de dominância completa. Esta é a característica resposta de resistência vertical, onde o fenótipo apresenta-se claramente o padrão de interação compatível ou incompatível, sem gradientes de resistência. A herança monogênica torna os estudos genéticos e moleculares mais precisos, pois elimina os efeitos de interação entre genes. Os resultados mais promissores obtidos por Brito (2007), apesar de serem inéditos, não possibilitavam a aplicação imediata em MAS ou outros estudos devido a grande distância genética entre o gene de resistência e os três marcadores encontrados. O presente trabalho oferece informações complementares aos dados preliminares de biologia molecular produzidos pelos outros pesquisadores como Caixeta et al.(2003), Praksh et al. (2004), Brito (2007) e Mahé et al. (2008) e facilita o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para estudos posteriores. O conhecimento da maneira pela qual os genes S_H são herdados é de extrema importância para os programas de melhoramento que buscam resistência duradoura a *H. vastatrix*, um fungo que apresenta elevada variabilidade genética (Capucho et al., 2009). Os genes S_{H1} , 2, 4 e 5, encontrados em *C. arabica*, já foram suplantados por diversas raças de *H. vastatrix*, inclusive as identificadas no Brasil (Cardoso, 1986), cuja qual foi utilizada para este estudo. Nos últimos anos, amostras de *H. vastatrix* coletadas em derivados de Híbrido de Timor, como Catimor, Sarchimor e na cultivar Colombia, têm sido caracterizadas incorretamente como raça II (v5) (Várzea & Marques, 2005; Capucho et al., 2009). Várzea e Marques (2005) caracterizaram 12 isolados do fungo, coletados na cultivar Colombia, como raça II e, após inoculações adicionais, verificaram que esses isolados apresentavam outros genes de virulência (v5,? ou v5,7,? ou v5,7,9,?). Embora caracterizado como raça II pela série diferenciadora de raças (Cardoso, 1986), este patótipo da raça pode apresentar gene(s) de virulência adicional(is) (v5,?), uma vez que infecta genótipos com o gene de resistência S_{H5} . Este resultado demonstra a incapacidade da série diferenciadora disponível de distinguir raças de *H. vastatrix* com amplo espectro de virulência.

A análise das combinações de *primers* de AFLP possibilitou a formação detalhada de um banco de dados do padrão randômico de fragmentos genômicos. Como verificado por Prakash et al. (2004) e Brito (2007), a técnica de AFLP, constituiu-se em ferramenta adequada à identificação de marcadores moleculares ligados a resistência à ferrugem. Observou-se a presença um marcador para o loco numa frequência de 1:4000. Este fato é esperado em grandes genomas (Rishi, et al., 2004) como cafeeiro ($2C = 2.56 \cdot 10^9$ bp), o tamanho de fragmento amplificado (<1,5 kb) e ao comportamento aleatório do padrão de restrição enzimática. A taxa de 10:1 de marcadores falsos positivos (Tabela 1.1), deve-se principalmente a amplificação de um ou mais genótipos do grupamento resistente, porém não de todos. Quanto ao padrão de restrição, evidenciamos que a enzima de corte raro (*EcoRI*) produziu menor número de fragmentos amplificados por combinação de primers e fragmentos de maior tamanho; o inverso foi observado para a enzima de corte freqüente (*MseI*) (Tabela 1.1). O padrão de restrição eletroforético *EcoRI* gerou maior número médio de marcadores. Fragmentos de tamanho maior cobrem um espaço genômico maior, aumentando a probabilidade de detectar mais facilmente o polimorfismo. Informações semelhantes são relatadas por Coyle (2007) mostrando que o padrão eletroforético do AFLP é dependente de diversas variáveis, especialmente aquelas também encontradas neste estudo.

O uso de marcadores moleculares na seleção de plantas resistentes em populações segregantes é essencial na piramidação de genes de interesse (Beraldo et al., 2009). As dificuldades básicas dos marcadores AFLP limitam seu uso imediato em MAS, por isso foi preciso transformá-los em marcadores derivados, cujo o objetivo foi obter um marcador molecular mais estável e preciso. O *primer* de AFLP é dependente de restrição enzimática, possível de imperfeições, e de uma curta sequência seletiva para amplificação (Coyle, 2007). Param e Michelmore (1993) estudando marcadores RAPD, identificaram que o desenho de *primers* mais longos e específicos melhoram a precisão em detectar o polimorfismo. Assim, também foi possível identificar que os *primers* SCAR com média de 20 pb aumentaram o poder de resolução dos marcadores AFLP que possuem apenas 3 bases seletivas. Esta diminuição das distâncias genéticas entre os mapas de marcadores AFLP e SCARs é resultante da redução do tamanho do fragmento do amplicon, que possibilitou identificar genótipos polimórficos positivos para os marcadores anteriormente não detectados pelas técnicas de AFLP. O fato de genótipos cujos marcadores moleculares SCARs amplificaram bandas e foram suscetíveis (S+) em análises com a inoculação do patógeno em condições controladas

em laboratório, podem ser explicadas, pois em trabalhos com marcadores moleculares o fato de amplificarmos gene de resistência nem sempre se reflete em resistência na planta. Esses problemas muitas vezes podem ocorrer em razão de possíveis deformações no gene, principalmente devido a alguma quebra, ou até mesmo algum *crossing-over* desigual (Beraldo et al., 2009)

Outros trabalhos já utilizaram a técnica de AFLP e primers secundários para clonagem posicional. Xu e Korban (2002), construíram um mapa físico de 1,1 Mb do loco *l/f* para genes de resistência em macieira baseados inicialmente na técnica de AFLP, depois com marcadores derivados SCARs e finalmente isolando clones BAC. Os primers SCARs constituíram-se em ferramentas essenciais para isolamento e clonagem gênica a partir do material genômico. Os *primers* SCAR superaram dificuldades quanto a restrição e ligação, assim como aumentam a especificidade, reduzindo pequenos desvios de análise, mas de considerável efeito no resultado final. Como foi observado, o mapeamento dos SCARs aumentou significativamente a resolução do mapa genético. Este fenômeno pode ser originado pela alteração dos sítios de restrição enzimática em genótipos considerados segregantes ou por um dos dois efeitos descritos anteriormente. Além da aplicação direta para os estudos moleculares de localização, identificação e estudo do gene de resistência, os marcadores SCARs possuem um elevado potencial para uso em programas de melhoramento genético assistido por marcadores (Beraldo et al., 2009). Podem ser usado para o monitoramento do gene em métodos de retrocruzamentos ao longo das gerações visando a resistência da raça específica em cultivares de alta performance produtiva e em estratégias de MAS. Contribuiu efetivamente aos programas de melhoramento em café, aumentando a eficiência e reduzindo o tempo de seleção.

A disponibilidade de marcadores ancorados em mapas de alta densidade é uma condição prévia para construção segura de um *contig* de BAC com uma cobertura para a obtenção de um mapa físico de uma região cromossômica específica (Xu e Korban, 2002). A primeira etapa do isolamento do gene foi realizada neste estudo, quando da identificação de clones BAC contendo marcadores moleculares precisamente ligados ao gene de resistência. O ordenamento dos clones BAC contendo dois marcadores permitiu o correto posicionamento baseado segundo a ordem dos marcadores AFLP e SCAR nos mapas genéticos (Figura 1.6b). Os clones 15o18 e 115p12 foram os mais promissores, pois eles contem ambos marcadores que flanqueiam o gene de resistência

numa região delimitada por 1,6 cM (Figura 1.5b) do mapa genético dos marcadores SCARs.

Uma forma de orientar e reposicionar marcadores para facilitar o seqüenciamento e a clonagem dos genes de interesse é o seqüenciamento das pontas de clones BAC, uma técnica chamada de BAC-ends. Etienne et al. (2006) obtiveram mapas físicos de espécies diferentes de trigos hexaploides, ordenando as sequencias de pontas de BAC e comparando com a sequências de *Triticum durum*. As sequencias das pontas dos clones BAC do presente estudo não possibilitaram a obtenção de informações mais precisas sobre o posicionamento do gene de resistência, isto porque o tamanho do fragmento genômico obtido do seqüenciamento, representa menos de 1% do tamanho do inserto. Schlueter et al. (2008), relatam que em organismos de seqüência genômica conhecida, as seqüência de pontas de BAC permitem a rápida localização e posicionamento da região genômica que contém o gene de interesse.

Baseando-se no ordenamento dos clones BAC e no mapa genético, foi obtido o *contig* de BACs, indicando que o gene de resistência está posicionado dentro de um espaço físico <360 kb (Figura 1.5b, compreendendo o espaço entre o marcador SCAR 20 ao 18). Os resultados de citometria em *C. arabica* realizados por Cros et al (1993), Bare et al.(1996), Mahé et al (2007) e Clarindo e Carvalho (2009), indicam a massa do DNA nuclear 2C é de aproximadamente $2,62 \pm 0,016$ pg o que equivale a $2,56.10^9$ bp (Clarindo e Carvalho, 2009). Os resultados mostram que na população de mapeamento, encontramos uma região de interesse < $3,60.10^5$ pb. Isto representa um percentual de 0,014% do genoma completo de *C. arabica*. O *contig* de BACs cobre um loco com 4,7 cM e cada cM nesta região cromossômica corresponde a um espaço físico <75 kb. O aumento da taxa de segregação em razão do espaço físico do genoma pode indicar que o loco está em regiões mais passível de sofrer recombinação. Considerando, que a clonagem da maioria dos genes situa-se por volta de 0,3 a 2,0 Mb (Murakami, et al., 2007). O tamanho da região cromossômica de 0,36 Mb é semelhante ou menor que outros estudos de clonagem posicional, permitindo prosseguir com os trabalhos para a obtenção da sequencia completa do gene e das regiões vizinhas não transcritas, mas importantes para a regulação gênica.

Estudos foram realizados com macrosintenia entre diversas espécies cultivadas, geralmente comparando uma cultura com poucas informações genômicas com outra de genoma bem conhecido. Ellwood et al. (2008), utilizaram mapas de marcadores genéticos em feijão fava (*Vicia faba* L.) comparando com alfafa (*Mendicago*

trunculata), parental próximo que possui grande acervo de informações genômicas. Marcadores de genes ortólogos permitiram caracterizar regiões cromossômicas e níveis de sintenia entre as espécies, revelaram relações filogenéticas e cromossômicas, possibilitando a identificação de marcadores alvos para o melhoramento de feijão fava. Aubert et al. (2006), elaboraram um mapa funcional em ervilhas (*Pisum sativum*) para auxiliar genes candidatos de seleção e investigar a sintenia com alfafa (*Medicago truncatula*). Eles identificaram que o mapa genético com 21 genes posicionados em alfafa possuem 41 novas ligações sintenicas com o mapa de ervilha. Mathieu et al., (2008) estudaram a colinearidade entre mapas genéticos de morango e identificaram regiões ortólogas entre genomas. Estudos de macrosintenia podem facilitar o estabelecimento de estratégias futuras para aproximação do loco de genes específicos, como genes de resistência. Por isso foram comparadas todas as sequências geradas com outras espécies vegetais do *GenBank* e na Tabela 1.4 contém as sequências mais similaridades com *Vitis vinifera*, cuja espécie se apresentou comparativamente mais redundante (E-value > 1.e-3). Estes resultados são contrastantes com informações anteriores por Mahé et al. (2007) para sintenia de *A. thaliana* com café, mas coerentes com Guyot et al. (2009). As sequências localizadas em mesmo cromossomo em café (grupo de ligação) que possuem alta similaridade estão posicionadas em diferentes cromossomos de *Vitis vinifera*. (Tabela 1.4). Para Lenormand e Dutheil (2005), isto é possível devido a quebra da sintenia durante a evolução de 114 milhões de anos de separação dos clados rosídes e Asterídes, confirmado por Guyot et al. (2009).

A resistência às raças específicas de *H. vastatrix* em café pode perdurar por apenas algumas décadas (Prakash et al. 2004), mas os marcadores moleculares podem auxiliar na piramidação de diferentes genes raça-específica. Similarmente como relatado por Rosewarne et al. (2005) estudando genes de resistência à ferrugem de cereais, obtiveram aumento da durabilidade da resistência. A experiência do melhoramento de trigo para resistência à ferrugem do colmo, que gerou variedades piramidizadas com resistência a esta moléstia, é um exemplo encorajador para o uso desta estratégia (Milach e Cruz, 1997). Apesar de ser um processo trabalhoso, o uso da piramidização para obter resistência durável é atraente e a piramidização é possível, pois genes de resistência geralmente encontram-se posicionados em tandem ou em *clustres* (Micelmore e Meyers, 1998). O acúmulo de informações moleculares geradas contribui para acelerar ou facilitar a identificação e isolamentos destas regiões cromossômicas também em outras plantas. Conseqüentemente, o resultado deste estudo traz implicações potenciais para futuras aplicações de estratégias de seleção e

melhoramento em café visando a resistência e estudos relacionados a identificação, estrutura e função dos genes que codificam para a resistência ao patógeno.

6 CONCLUSÕES

Foi construído um mapa genético saturado com 25 marcadores AFLP, cujo qual possibilitou a elaboração do mapa genético de alta densidade de marcadores derivados com 6 marcadores SCARs delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM. O gene de resistência encontra-se no interior de um loco flanqueado por dois marcadores a 0,7 e 0,9 cM.

O ordenamento dos clones BAC contendo simultaneamente dois marcadores moleculares, possibilitou a obtenção do *contig* dos clones BAC, compreendendo uma região cromossômica estimada em aproximadamente 4,7 cM e <360 kb. Neste contig foram isolados dois clones BAC portadores dos marcadores que flanqueiam o gene de resistência, indicando que o loco está delimitado a uma região de <120 kb.

Apesar da similaridade das sequências genômicas entre *C. arabica* e *V. vinifera*, existe uma quebra de sintenia entre as duas espécies, não permitindo a comparação por ontologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altshuler, D.; Daly, M.J.; Lander, E.S. Genetic Mapping in Human Disease. Vol. 322. *Science*, 2008. **59(03)**: 881 - 888

Alvarado, G.A. Evolution of *Hemileia vastatrix* virulence in Colombia. pp. 99- 115In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea VMP (eds), *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa, 2005.

Aubert G, Morin J, Jacquin F, Loridon K, Quillet M, Petit A, Rameau C, Lejeune-Henaut I, Huguet T, Burstin J: Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical Applied Genetics* 2006, **112(6)**:1024-1041.

- Beraldo, A.L.A.; Colombo, C.A.; Chiorato, A.F.; Ito, M.F.; Carbonell, S.A.M. Aplicação de marcadores SCARs para seleção de linhagens resistentes à antracnose em feijoeiro. *Bragantia*. 2009, **68(1)**: 53-61.
- Barre, P.H.; Noirot, M.; Louarn, J.; Duperray, C.; Hamon, S. Reliable flow cytometric estimation of nuclear DNA content in coffee trees. *Cytometry*, 1996.**24**: 32–38
- Bettencourt, A.J.; Rodrigues, Jr.C.J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other disease. In: Clarke RJ, Macrae R (Eds) Coffee. Agronomy, vol 4. *Elsevier Applied Science*, London, 1988. pp 199–234
- Birboim, H.C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 1979. **7**:1513-1523
- Brito, G.G. 2007. Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados ao gene de resistência do Híbrido de Timor à *Hemileia vastatrix*. 57 p. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa – MG. 2007.
- Caetano-Anollés, G.; Trigiano, R.N. Recovery of DNA Amplification Products from Silver-Stained polyacrylamide Gels. *Methods in Molecular Biology*. In White BA. *PCR Cloning Protocols-From Molecular Cloning to Genetic Engineering*. Humana Press, Totowa, 1996. **67**:111-127
- Caixeta, E.T.; Rufino, R.J.N.; Oliveira, A.C.B.; Sakiyama, N.S.; Zambolim, E.M.; Zambolim, L. Caracterização da resistência genética do híbrido de Timor UFV 427-15 à ferrugem do cafeeiro In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, (eds): Porto Seguro. Anais. Brasília, DF : Embrapa Café. 2003. p. 226. 447pp.
- Capucho, A.S.; Caixeta, E.T.; Zambolim, E.M.; Zambolim, L. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. *Pesuisa Agropecuária Brasileira*.. 2009, **44(3)**: 276-282
- Cardoso, R.M.L. Novas raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Berk. no Brasil, métodos de identificação, e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. *Magister Scientiae*. Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1986.
- Clarindo, W.R.; Carvalho, C.R. Comparison of the *Coffea canephora* e *C. arabica* kariotipe based chromosomal DNA content. *Plant Cell Report*. 2008. **28**:73-81
- Coyle, H.M. *Nonhuman DNA Typing: Theory and Casework Applications*. International Forensic Science and Investigation. 2007. 248 p.
- Creste, S.; Tulmann-Neto, A.; Figueira, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular in Biology Report*, 2001. **4**:299-306
- Cros, M.C.; Gavalda, N.; Chabrilange, C.; Récalc, C.; Duperray, S.; Hamon, S. Variations in the total nuclear DNA content in african *Coffea* species (*rubiaceae*).

Quinzene colloque scientifique international sur le café. 15^oASIC. *Biotechnologies*, 1993. pp.23-32.

Ellwood, S.R.; Phan, U.T.; Jordan, M.; Hane, J.; Torres, A.M.; Avila, C.A.; Cruz-Izquierdo, S.; Oliver, O.P. Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure with *Lens culinaris*. *BMC Genomics*. 2008; **9**: 380

Eskes, A.B.; Toma-Braghini, M. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. And Br.). *Plant Protocol Bulletin FAO* (Rome), 1982. **29**:56–66

Fazuoli, L.C.; Medina Filho, H.P.; Gonçalves, W.; Guerreiro Filho, O.; Silvarolla, M.B. Melhoramento do Cafeeiro: variedades tipo arabica obtidas no Instituto Agrônômico em Campinas. In: Zambolim, L. (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Editora UFV, Viçosa, 2002. pp 63-215

Guyot, R.; Mare, M.; Viader, V.; Hamon, P.; Coriton, O.; Bustamante-Porras, J.; Poncet, C.C.; Hamon, S.; Kochko, A. Microcollinearity in an ethylene receptor coding gene region of the *Coffea canephora* genome is extensively conserved with *Vitis vinifera* and other distant dicotyledonous sequenced genomes. *BMC Plant Biology*, 2009. **9**:22-38

Harris, M.A.; Clark, J.; Ireland, A.; Lomax, J.; et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research*. 2004. **1(32)**: D258–D261.

Herrera, J.C.; Alvarado, G.; Cortina, H.; Combes, M.C.; Romero, G.; Lashermes, P. Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica*, 2009. in press.

Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990. **96**:23-28.

Lenormand, T.; Dutheil, J. Recombination Difference between Sexes: A Role for Haploid Selection. *PLoS Biology*, 2005. **3(3)**: e63:396-403.

Lorieux, M. 2007. MapDisto Version 1.7 beta for Excel 2007. <http://mapdisto.free.fr/>. acessado em fev. 2009.

Mahé, L.; Combes, M.C.; Várzea, V.M.P.; Guilhaumon, C.; Lashermes, P. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica*). *Molecular Breeding*, 2008. **21**:105–113.

Mahé, L.; Combes, M.C.; Lashermes, P. Comparison between a coffee single copy chromosomal region and Arabidopsis duplicated counterparts evidenced high level synteny between the coffee genome and the ancestral Arabidopsis genome. *Plant Molecular in Biology*, 2007. **64(6)**:699-711.

- Mathieu, R.G.; Estelle, L.K.; Laure, B.; James, S.D.; Amparo, M.; David, D.; Peres, A.; Guy, G.; Béatrice, D.R. Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics*, 2008. **27**:145-153
- Michelmore, R.W.; Paran, I.; Kesseli, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991. **88**: 9828-9832
- Michelmore, R.W.; Meyers, B.C. Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process. *Genome Research*. 1998. **8**: 1113-1130
- Milach, S.C.K.; Cruz, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. *Ciência Rural*. 1997, **27(4)**:685-689.
- Murakami, Y.; Miwa, H.; Imaizumi-Anraku, H.; Kouchi, H.; Downie, A.; Kawaguchi, M.; Kawasaki, S. Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, a putative transcription factor of the *GRAS* family, required for *NIN* and *ENOD40* gene expression in nodule initiation. *DNA Research Advance*. 2007. **11**:1-17
- Murray, M.G.; Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980. **8**: 4321-4325
- Prakash, N.S.; Marques, D.V.; Varzea, V.M.P.; Silva, M.C.; Combes, M.C.; Lashermes P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. *Theoretical Applied Genet*, 2004. **109**:1311-1317
- Paran, I.; Michelmore, R.W. Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993. **85**:985-993
- Pereira, A.A. 1975. Herança da resistência a *Hemileia vastatrix* Berk, et Br.em cafeeiros derivados do Híbrido de Timor. Tese de doutorado, Programa Pós-graduação em Fitopatologia, Viçosa, 1995. 77p
- Prakash, N.S.; Marques, D.V.; Varzea, V.M.P.; Silva, M.C.; Combes, M.C.; Lashermes, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004. **109**:1311-1317
- Qatibi, A.I.; Bories, A.; Garcia, J.L. Sulfate Reduction and Anaerobic Glycerol Degradation by a Mixed Microbial Culture . *Current Microbiology*, 1991. **22**:47-52.
- Rishi, A.S.; Nelson, N.D.; Goyal, A. Genome walking of large fragments: an improved method. vol. 111. *Journal of Biotechnology*, 2004. **1**:9-15
- Rosewarne, G.V.; Singh, R.P.; Huerta-Espino, J.; William, H.M.; Bouchet, S.; Cloutier, S.; McFadden, H.; Lagudah, E.S. Leaf tip necrosis, molecular markers and β 1-

- proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes Lr46/Yr29. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005. **112**:500-508
- Sambrook, J.; Russell, D.W. Isolation of DNA Fragments from Polyacrylamide Gels by the Crush and Soak Method. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006.: pdb.prot 2936.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular cloning – a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. 1989.
- Sera, T.; Alteia, M.Z.; Petek, M.R. Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). pp217-251In: Zambolim L (eds) *O estado da arte de tecnologias na produção de café*. UFV, Viçosa. 2002.
- Spigler, R.B.; Lewers, K.S.; Main, D.S.; Ashman, T.L. Genetic mapping of sex determination in a wild strawberry, *Fragaria virginiana*, reveals earliest form of sex chromosome. *Heredity*, 2008. **101**:507–517
- Schlueter, J.; Goicoechea, J.; Collura, K.; Gil, N.I., et al. BAC-end Sequence Analysis and a Draft Physical Map of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genome. *Tropical Plant Biology*, 2008. **1(1)**:40-48.
- Tamayo, P.J. Resistência de Progênie de Catimor a oito raças de *Hemileia vastatrix* Dissertação de Mestrado. 64p. Universidade Federal de Viçosa: UFV, MG. 1988.
- Tanksley, S.D.; Young, N.D.; Paterson, A.H.; Bonierbale, M.W. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology*, 1989. **7**:257–264.
- Varzea, V.M.P.; Marques, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance pp.53-74. In: Zambolim L, Zambolim E, Várzea VMP (eds), *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, 2005.
- Varzea, V.M.P.; Rodrigues Jr., C.J.; Silva, M.C.; Gouveia, M.; Marques, D.V.; Guerra-Guimarães, L.; Ribeiro, A. Resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. In: Zambolim L (ed.), *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*, 2002. pp.297-320.
- Varzea, V.M.P.; Marques, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance pp.53-74. In: Zambolim L, Zambolim E, Várzea VMP (eds), *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, 2005.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J. Peleman, J.; Kuiper, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995. **23**: 4407-4414.
- Xu, M.; Korban, S. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the *Vf* locus in the apple genome. *Plant Molecular Biology*, 2002. **50**:803-818.
- Zhu, J. Use of PCR in Library Screening, vol 192: in Chen, B. and Janes H.W. *Methods in Molecular Biology. PCR Cloning Protocols*. Second edition. Humana Press, Totowa, 2002. **37**:353-358.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA DE RESISTÊNCIA A INFECÇÃO DA RAÇA II DE *H. vastatrix*

1 RESUMO

O conhecimento dos processos envolvendo a resistência hospedeiro raça-específica em plantas está sendo ampliado constantemente. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação de resistência durante a interação incompatível cafeeiro-*Hemileia vastatrix*. O objetivo deste estudo foi identificar genes diferencialmente expressos desta interação e estudar o comportamento dos mesmos durante o período de infecção. Foram identificados 108 fragmentos derivados de transcritos (TDFs) entre 48 e 72 h após a inoculação através de cDNA-AFLP combinado com a validação por grupos distintamente fenotipados em resistentes e suscetíveis. Esta combinação permitiu avaliar a diferença do padrão de transcrição entre genótipos compatíveis e incompatíveis. Metade das sequências dos TDFs apresentaram similaridade com genes envolvidos em processos de sinalização e respostas de defesa e os demais estavam relacionados com metabolismo, crescimento, ativação gênica, e degradação controlada de proteínas. Foram selecionados 21 TDFs classificados nas primeiras duas classes para a análise por PCR em tempo real. Os genes de sinalização apresentaram maior nível de expressão em 24 após a inoculação de *H. vastatrix* raça II e os de defesa 72 h. Foi detectado maior nível de expressão no TDF similar a PR5 *Taumatina-like* (resposta de defesa) e TDF NBS-LRR (sinalização). O TDF NBS-LRR é um gene candidato de reconhecimento e PR5 pode ser o principal responsável por desencadear os processos de resposta de defesa em cafeeiro durante o processo de infecção de *H. vastatrix*.

PALAVRAS CHAVES: resposta de defesa, genes de sinalização, TDFs.

2.2 INTRODUÇÃO

Ferrugem do cafeeiro é uma das principais doenças que causam elevados prejuízos aos cafeeicultores. Os principais danos provocados pela doença são evidenciados pela queda prematura de folhas, redução de área foliar e seca de ramos laterais, evoluindo para deformação da planta atacada e redução da produção da safra e das que se sucedem (Guzzo, 2004). *H. vastatrix* o agente causal da ferrugem do café,

produz organizações urediais, teliais, e basidiais, mas só urediosporos dicarióticos são responsáveis pela doença (Fernandez, 2004). O fungo infecta a superfície inferior das folhas e produz grandes colônias de coloração laranja formada por uredosoros (Silva et al., 2006), levando a queda prematura das folhas e perdas de rendimento.

Urediosporos de *H. vastatrix* normalmente germinam e diferenciam igualmente bem o apressório sobre estômatos de plantas de café suscetível ou resistentes (Silva, et al., 2002). A fase inicial da infecção de *H. vastatrix* corresponde a formação de apressórios sobre os estômatos, seguido da penetração intracelular e colonização (Mendgen e Voegelé, 2005). Em folhas de cafeeiros suscetíveis, depois da germinação dos urediosporos e diferenciação dos apressórios ocorre a penetração do fungo (~12h pós-inoculação) (Silva et al., 2006), formando uma hifa de penetração na câmara subestomática. As células vegetais adjacentes são invadidas pelo haustório em torno de 36h depois da inoculação. O fungo produz mais hifas intercelulares e um número grande de haustórios nas células do parênquima esponjoso e paliçádico e até mesmo na superfície epidérmica (Takken et al., 2006). Um micélio denso é observado sob a área de penetração e um soro de urediospos aparece no local de penetração aproximadamente 20 dias depois de inoculação (Lin et al., 2003).

Depois da adesão dos urediosporos da ferrugem, o desenvolvimento das estruturas de infecção ativa um sistema de reconhecimento sofisticado em nível de epiderme no hospedeiro (Agrawal e Fishbein, 2006). Para controlar desenvolvimento fúngico, é requerida uma sequência sucessiva de sinais em nível de membrana (Mendgen e Voegelé, 2005). Para vários genótipos de café, a resistência é pós-haustorial (paralisa o crescimento do fungo depois da formação haustorial) caracteriza-se pela morte celular 2 dias após a inoculação (Silva et al., 2002). Em plantas de café suscetíveis, a morte de células-guardas e células adjacentes foi observada do 3º dia depois de inoculação, mas só em uma pequena porcentagem de locais de infecção na qual o fungo parou seu crescimento precocemente (Wang et al., 2009).

Outra resposta notável de reconhecimento precoce em nível citológico é o encapsulamento do haustório. Esta resposta do hospedeiro também foi observada em interações compatíveis, mas posterior ao processo de infecção (do 7º dia depois da inoculação) (Voegelé e Mendgen, 2003). Em várias plantas resistentes a ferrugem e outros biotróficos obrigatórios, o encapsulamento do haustório foi considerado como uma expressão de compatibilidade (Ganesh et al., 2006).

H. vastatrix contém β -1,3-glucanos e quitina como componentes principais das paredes celulares dos urediosporos (Silva et al., 2006). Ambos os polímeros são distribuídos regularmente sobre as paredes de pré-penetração das estruturas fúngicas (Guzzo et al., 2009), enquanto quitinas acumularam preferencialmente sobre a parte interna, provavelmente por estar menos exposto à ação eventual das quitinases do hospedeiro (Silva et al., 1999). Para diferentes ferrugens, Silva et al. (2006) deduziu que nas estruturas de infecção formadas no espaço intercelular da folha, as quitinas são difíceis de serem encontradas. Nestes locais ocorre a degradação destes polímeros de parede fúngica pelas quitinases do hospedeiro que atuam como enzimas de defesa a penetração fúngica, atuando como uma regra geral para as ferrugens (Lin et al., 2009).

No processo de reconhecimento do fungo, genes da classe NBS-LRR desempenham um importante papel para na resistência vegetal, devido ao seu envolvimento na via de sinalização (Ganesh et al., 2006) que tem por função ativar proteínas de resposta de defesa por proteínas *PR* (Guzzo et al., 2009). A síntese de proteínas *PR*, não só acumulam localmente nos tecidos infetados, mas também são induzidas sistematicamente (Van Loon 1999). Existem mais de 17 famílias que incluem vários componentes que são exportados ao espaço extracelular onde, é muito provável que possuam um papel fundamental na resposta de HR, atividade antimicrobiana, na biologia da parede celular e na transdução de sinal (Guzzo et al., 2009).

Um estudo realizado por Guzzo (2004) e Guzzo et al. (2009), usando bibliotecas subtrativas demonstrou que muitos genes foram ativados mediante a indução por tratamento com éster-S-metil-benzol(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotioico (acilbenzolar-S-metil: ASM) na cultivar suscetível Catuaí a raça II de *H. vastatrix*, ativando a resposta de resistência sistêmica adquirida (SAR, *Systemic Acquired Resistance*). Na cultivar resistente a biblioteca subtrativa foi realizada pela expressão diferencial de genes mediante a inoculação do fungo. Em 72h depois da inoculação, foi possível isolar 384 clones homólogos a outras espécies possivelmente envolvidos em processo de estresse oxidativo, HR, PDC, síntese de proteínas antimicrobianas, síntese e transporte de compostos antimicrobianos do metabolismo secundário, sinalização, *PR* proteínas, metabolismo de lipídios e degradação de proteínas (Guzzo, 2004; Guzzo et al., 2009).

Numa cultivar suscetível, a resposta da SAR, pode ser mediada por um conjunto de genes que atuam na mitigação dos efeitos da infecção. No genótipo resistente, apenas a presença do inóculo é capaz de ativar a sinalização e a síntese de compostos de defesa, caracterizado pela resistência vertical no HDT (Guzzo et al., 2009). Em

ambos os casos existe alteração da expressão de proteínas *PR* proteínas, no genótipo suscetível, a β -1-3-glucanase tem caráter ácido, típico das respostas mediadas pela via do ácido salicílico (Guzzo, 2004; Guzzo et al., 2009), enquanto que no genótipo resistente (HDT), a glucanase básica foi expressa diferencialmente, caso das respostas mediadas pelos genes da via do etileno (Seo et al., 2003) atuando na sinalização.

Em outro estudo, Silva et al. (2006), utilizando bibliotecas de ESTs obtidas da expressão diferencial de genes na presença de *H. vastatrix*, identificaram vários genes relacionados a sinalização, defesa, metabolismo, divisão celular, expressão gênica e estrutura celular. Muito dos genes isolados mostraram similaridade com genes de funções conhecidas, sugerindo que os mecanismos de resistência contra patógenos são conservados entre o *C. arabica* em outras plantas (Silva et al., 2006).

Embora o conhecimento dos processos moleculares envolvendo a patogenicidade esteja aumentando, pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam a sinalização de resposta de defesa no início de infecção ou da especificidade do hospedeiro aos patógenos (Dellagi et al., 2000; Glazebrook et al., 2005). A compreensão da natureza das interações planta-patógeno e a identificação de genes envolvidos facilitará o desenvolvimento de estratégias de controle de *H. vastatrix* para plantas de café (Ferenandez et al., 2004). Métodos como expressão diferencial, RT-PCR (Liang e Pardee, 1992) e cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996) renderam importantes informações sobre a expressão quantitativa e temporal de genes em eucariotos (Dellagi et al., 2000). cDNA-AFLP é um método eficiente para isolar genes diferencialmente expressos, com resultados reproduzíveis sem precisar utilizar sistemas de sondas para análise (Bachem et al., 1996). É uma ferramenta de análise gênica em larga escala que não requer informação prévia das sequências. Por esta técnica, Chuanzao et al. (2004) identificaram 31 genes diferencialmente expressos para a tolerância e sensibilidade a estresse em cultivares de arroz. Este estudo permitiu entender melhor os mecanismos de tolerância em arroz, servindo como modelo de estudo para outras espécies.

O presente estudo propõe-se uma estratégia molecular para avaliar a expressão de genes ativados pelo processo de infecção de *H. vastatrix* em folhas de café, combinando cDNA-AFLP e o uso de grupos homogêneos contrastantes para a resistência e suscetibilidade e indicar TDFs para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material genético e desenho experimental

Para o experimento do cDNA-AFLP foram utilizados: Híbrido de Timor UFV 427-15 (CIFC 1343-136) (genitor resistente), Catuaí Amarelo UFV 2143-236 (IAC 30)(genitor suscetível) e plantas da geração F_2 UFV 421-4 para compor os grupos diferenciadores: resistente composto pelas plantas F_2 UFV 221-4-:16, 28, 64, 222 e 300; e suscetível pelas plantas UFV 221-4-:13, 18, 65, 75 e 220. A inoculação foi realizada de acordo com o item 2.3.1.2 e as amostras para o cDNA-AFLP foram composta pela união das coletas em 48 e 72 horas para cada planta, seguido da extração de RNA total. A avaliação do desenvolvimento do fungo foi feita em estereoscópio óptico (10x) e por meio de amostra controle durante 24 dias.

Para a análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR) foi utilizada a mesma metodologia de inoculação do estudo anterior. Para a qRT-PCR foi adotado o delineamento em blocos com duas repetições biológicas; uma para cada genitor e outra para cada grupo suscetível e resistente e três repetições técnicas de cada tratamento em tempos de 0, 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação.

3.2 Extração do RNA total

O RNA foi extraído utilizando o reagente ConcertTM Plant RNA Reagent (*Invitrogen*) conforme recomendações do fabricante para extração de amostras em pequena escala. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (Hitachi U2000), ajustando as concentrações para $300 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e a integridade física foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Wilson e Walker, 2000).

3.3 Síntese de cDNA e da dupla fita

Com o objetivo de eliminar o DNA contaminante, foi realizado o tratamento com DNase (30 μg de RNA total para cada amostra de cDNA-AFLP e 2 μg para qRT-

PCR), numa reação contendo os seguintes reagentes: 0,5 U de DNase I (RQ1 RNase-Free DNase; *Promega*); tampão de reação 1X, completando com água estéril tratada com DEPC (dietil-piropircarbonato) para o volume final de 40 μL para cDNA-AFLP e 10 μL para qRT-PCR. A reação permaneceu a 37 °C por 45 min. A inativação da enzima ocorreu mediante a adição de 1X da solução de parada (*RQ1 DNase Stop Solution*; *Promega*) e incubando por 10 min a 65 °C e armazenando a -80 °C ou procedendo a etapa seguinte em gelo.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit Superscrip II (*Invitrogen*) baseado no protocolo proposto pelo fabricante, com modificações. Consideramos para cDNA-AFLP o volume de 4 reações e para qRT-PCR 1 reação. Para 1 reação foram utilizados: 11 μL da reação do tratamento de *DNase I*; 500 ng de oligo-dT₍₁₈₎ e 1 μL de dNTPs (10 mM cada), incubando a 65 °C por 10 min e em gelo por 1 min. Em seguida foi adicionado 9 μL da mistura composta por: 2 μL de tampão de reação 10X, 2 μL de MgCl₂ (50 mM), 2 μL de DTT (100 mM de Ditioneitol) e 1 μL de RNaseOUT inibitor (*Invitrogen*) e 1 μL de água. Depois de uma breve centrifugação (*spin*), foi incubado a 42 °C por 2 min e 1,5 μL da enzima *transcriptase reversa II* (200 unidades) foi acrescentada, seguido de incubação a 42 °C por 1 hora. A inativação da enzima ocorreu a 72 °C por 15 min. Em seguida foi colocada em gelo. Ao experimento foi adicionada uma amostra controle (sem a enzima de transcrição reversa) e no final foi avaliada a eficiência da reação por PCR com *primer* constitutivo de Ubiquitina em cefeiro.

Para a síntese da segunda fita foi utilizado o protocolo proposto por D'Alessio e Gerard (1988) com modificações. Foi acrescentada na reação do cDNA as quantidades correspondentes para 1 reação com 60 μL (total de 4 reações = volume final 240 μL): 20 μL de reação de cDNA, 1,0 μL de *RNase H* (1 U μL^{-1}) (*Promega*), 6 μL tampão de reação (10X *Second Strand-Invitrogen*); 1,5 μL de dNTPs (10 mM cada), 3 μL de DTT (100 mM); 0,8 μL de enzima *E.coli DNA ligase* (10 U μL^{-1}) (*Epicentre-Biotechnologies*); 2,5 μL de enzima *E.coli DNA polimerase I* (10 U μL^{-1}) (*Promega*), ajustando a reação para um volume final de 60 μL com água estéril.

A reação foi incubada em termociclador por 1 hora a 12 °C e 1 hora a 22 °C. Durante este período ocorreu a remoção dos fragmentos de RNA da fita híbrida DNA:RNA pela *RNase H*. Estes mesmos fragmentos serviram como *primers* que ligados a fita simples de DNA pela enzima *DNA ligase* permitiram a síntese da segunda fita pela adição de deoxinucleotídeos pela enzima *DNA polimerase I*, tanto em sentido

5':3', como no sentido 3':5'. Finalizada esta etapa, efetuou-se a remoção do RNA total pela adição de 1 μL da enzima *RNAse A* (10 $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$) seguido de incubação a 37 °C por 30 min. Em seguida o material foi tratado com 50 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) em gelo por 10 min e centrifugado a 10.000xg por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com igual volume de isopropanol gelado por meio de centrifugação a 12.000xg por 5 min a 4 °C. O pellet foi lavado com etanol 90% (v/v), secado em temperatura ambiente e ressuspendido em 6 μL de TE 1x. Depois da quantificação com 1 μL de reação de dupla fita em espectrofotômetro procedeu-se o ajuste da concentração para 40 ng. μL^{-1} e armazenado-se a -20 °C até o uso.

3.4 Identificação dos TDFs por cDNA-AFLP

Para a técnica de análise molecular por AFLP foi adotada seguindo o mesmo protocolo utilizado no primeiro capítulo deste estudo descrito no item 3.2, apenas com a alteração pelo uso de 200 ng de material genético (5 μL de DNA a 40ng. μL^{-1}) para a digestão.

A ordem de aplicação obedeceu a sequência; genitor suscetível, genitor resistente, grupo suscetível e grupo resistente de acordo com a combinação de *primers*.

A análise da expressão diferencial foi realizada visualmente, em seguida confirmada mediante densitometria digital pelo software McdiTM - *Gel & Blot Analysis System* (<http://www.mcid.co.uk/>) considerando expressão diferencial >5 (valores em pixels). A combinação de *primers* que apresentava expressão diferencial para genitor e grupo resistente foi aplicada separadamente a cada genótipo do grupo (abertura do agrupamento) para validar o TDF segundo a presença da banda em genótipos resistentes e ausência ou baixa intensidade em genótipos suscetíveis (Figura 2.1). Os TDFs validados foram clonados e sequenciados.

3.5 Clonagem, sequenciamento

Para estas técnicas foram adotados os mesmos procedimentos descritos no capítulo anterior nos item 3.4 e 3.5.1. Foram sequenciados 108 TDFs candidatos expressos diferencialmente em resposta de resistência ao patótipo da raça II de *H. vastarix*.

3.6 Avaliação da similaridade dos TDFs

Usando os bancos de dados: NCBI (National Center information biotechnology)(WWW.ncbi.org), Projeto Brasileiro Genoma Café (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/coffEST>) e programas de bioinformática do CENICAFÉ (<http://bioinformatics.cenicafe.org>), foi analisado o grau de similaridade entre os TDFs com os genes e ESTs depositados nestes locais e a possível função dos genes candidatos. A busca nos bancos de dados foi feita utilizando a ferramenta BLAST-N e BLAST-X (Altschul et al., 1990). Foi atribuída uma função a cada TDF analisando a função associada à sequência de maior similaridade, sendo referida a espécie do organismo usado para isolar o gene e o respectivo número de acesso do banco de dados (Tabela 2.3). Sequências depositadas nos bancos de dados que apresentaram valores de *E-value* maiores que 10^{-5} ($1e-05$) foram consideradas como não significativas.

3.7 Análise da expressão diferencial dos fragmentos de transcritos por qRT-PCR

Foram selecionados apenas os fragmentos que tinham maior similaridade com a via de sinalização de infecção até a ativação de proteínas responsáveis pela resposta de defesa. Foram detectados 30 candidatos e os *primers* foram desenhados da mesma forma descrita no capítulo 1 item 3.5.2 para um tamanho aproximado de 19 a 20 bases, T_m (*temperatue melting*) entre 54 e 60 °C produzindo amplicons entre 80 e 140 pares de base. Foram usados como *primers* para genes constitutivos Ca Ubi (Ubiquitina), Ca Tub (exon2 da α -Tubulina) e Ca Actin (Actina) como genes de referência. Todos os *primers* (Tabela 2.3) foram utilizados numa concentração final de 0,12 pmol de cada em reações simplex. As reações de PCR foi composta por 2,0 μ L de tampão de reação de PCR (10X *High Fidelity PCR Buffer-Invitrogen*), 1,2 μ L de $MgCl_2$ 50mM, 0,045 μ L de dNTPs (10 mM cada), 0,04 μ L de ROX (*Invitrogen*) , 0,08 μ L de BSA (soro albumina bovino), 2,0 μ L de *SYBR Green* 1:10.000 (*Invitrogen*) e 0,05 μ L de Taq Platinum 5U μ L⁻¹ (*Invitrogen*). O volume final foi completado com água para obter 20 μ L em cada reação. Foram feitas três réplicas técnicas e duas repetições biológicas para cada amostra. A PCR em tempo real foi realizada em equipamento Step-One Plus (*Applied Biosystems*, Foster City, E.U.A.).

A validação de *primers* pela curva padrão relativa foi realizada com três réplicas técnicas de amostras de genótipo compatível em 48 h pós-inoculação em diluições geométricas 1:5 em 4 concentrações a partir da reação de cDNA [1, 5, 25 e 125 vezes diluída] inicial de cDNA. Foi usado 0,28 µL de solução de cDNA em cada reação. O programa de PCR foi de 90 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min para o estágio de amplificação e um ciclo de 60 °C elevando 0,2 °C a cada 20 seg até atingir 95 °C para determinar o estágio da curva de dissociação. Foram aceitos conjuntos de *primers* com resultados de coeficiente de determinação acima de 95%, coeficiente de variância (CV%) abaixo de 15% e eficiência de amplificação entre 90 e 100%, *slope* em valores aproximados de -3,0, de acordo com as recomendações do fabricante do instrumento (*Applied Biosystems*, Foster City, E.U.A.).

A quantificação relativa foi realizada pelo método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$), conforme orientações do fabricante do instrumento Step-One Plus (*Applied Biosystems*, Foster City, E.U.A.), usando o programa comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$), cuja ciclagem é igual do programa para a curva padrão relativa. O desenho experimental para a avaliação genotípica compreendeu os tempos 0, 12, 24, 48 e 72 h pós-inoculação compostos por três réplicas técnicas e duas repetições biológicas.

Para a análise de dados da qRT-PCR foi usado o software *Step-One Plus* versão 2.0 (*Applied Biosystems*, Foster City, E.U.A.). Os valores do *threshold cycle* (C_t) das réplicas técnicas foram calculadas pelo método de quantificação relativa dos níveis de cópia de amplificação (Ali-Benali et al., 2005). Foi usado como controle o *primer* que apresentou melhor estabilidade, o gene endógeno Ca Actin, indicado pela análise do programa *geNorm*, segundo orientações de Vandesompele et al. (2002). Como referência foi utilizada a amostra inoculada do genitor resistente em tempo 0h. A mudança do nível de amplificação do cDNA do gene alvo foi analisada pela comparação relativa com o gene endógenos, segundo Nicot et al. (2005). O nível de expressão foi calculado pela fórmula seguinte: $= 2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $-\Delta\Delta C_t = (\Delta C_T \text{ do alvo}) - (\Delta C_T \text{ do gene endógeno})$.

Para determinar a expressão dos genes alvos e seus respectivos tratamentos foi a homogeneidade testada pelo teste de *Bartlett* ($p0,05$) para as três repetições técnicas dentro de cada amostra biológica. Depois da obtenção do nível de expressão de cada repetição biológica, foi obtida a média das duas e a significância foi avaliada pelo teste *t* ($p 0,05$). Para a comparação quantitativa entre genes e genótipos os dados de expressão relativa foram avaliados pela análise da variância (ANOVA simples) teve médias comparadas pelo teste *Scott-Knot* ($p0,05$).

Para a análise da expressão temporal dos transcritos foi utilizado o método de análise de regressão polinomial de terceira ordem, envolvendo todos os tratamentos em cada genótipo para cada *primer* específico.

Para analisar o grau de dissimilaridade entre os TDFS ordenando-os em grupos homogêneos utilizou-se a análise de variância multivariada (MANOVA) por agrupamento hierárquico, pelo método de ligação divisivo e encadeamento médio em distâncias euclidianas ($\sqrt{\text{da soma dos quadrados das diferenças dos valores para cada varável}}$). Representou-se a média dos grupos em um gráfico de perfis de médias.

Para avaliar o padrão de coexpressão dos genes, realizou-se a análise de correlações de *Spearman* visando detectar a redundância de atividade gênica ao longo do período de infecção. As análises estatísticas foram realizadas no programa *STATISTICA* 8.0 (Statsoft[®], 2009) e no aplicativo *Microsoft Office Excel* 2007.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação dos fragmentos derivados de transcritos diferencialmente expressos relacionados com a resistência do cafeeiro a infecção de *H. Vastatrix*

Foram analisadas 512 combinações de *primers* seletivos que geraram 33.685 fragmentos de transcritos amplificados (Tabela 2.1), com um número médio de 66 amplicons por combinação de *primers*. O cDNA-AFLP identificou 489 amplicons em polimórficos para indivíduos resistentes. Mediante a presença de polimorfismo no genitor e grupo resistente, realizou-se a desintegração do agrupamento em reações individuais. A cada quatro polimorfismos visualizados, foram confirmados um TDF correlacionado a respostas gênicas de resistência a infecção por *H. vastatrix*. Um exemplo do padrão eletroforético da confirmação do TDF é apresentado na Figura 2.1.

O número de polimorfismos em resistentes e suscetíveis é estatisticamente igual. Em média, cada combinação de *primers* detectou 65 locos e 98% das combinações foram polimórficas, e em média foi detectado um polimorfismo a cada 25 locos (Tabela 2.1). O tamanho médio dos fragmentos polimórficos foi de aproximadamente 492 pb. Este tamanho deve-se à influência do uso de enzima de corte raro (*EcoRI*) e ao tempo de extensão na PCR (1 min).

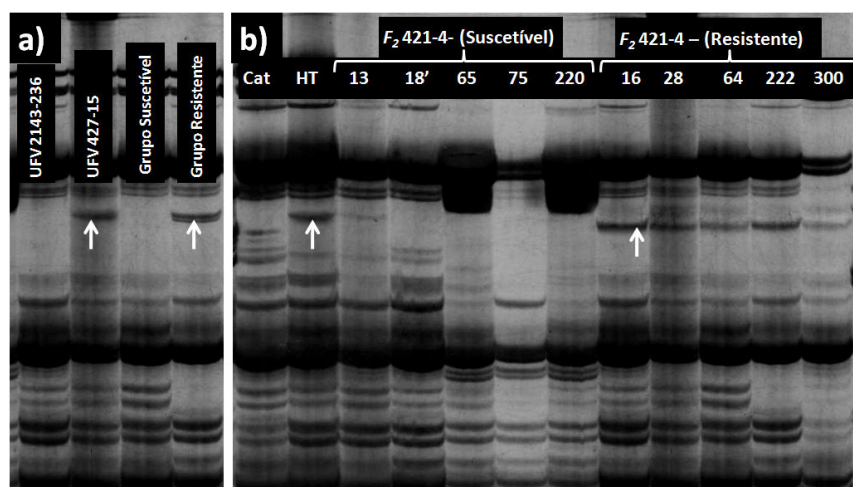


Figura 2.1 Polimorfismo entr genitor e indivíduos da geração F_2 resistentes indicado pelas setas para combinação de primers ECTA/EACG do TDF 77 similar a NBS-LRR. a) Seleção do polimorfismo na seguinte ordem: genitor suscetível, genitor resistente, agrupamento suscetível e resistente. b) Confirmação do polimorfismo pela decomposição dos agrupamentos, na ordem: genitor suscetível, genitor resistente, cinco genótipos suscetíveis e cinco resistentes.

Tabela 2.1 Análise do polimorfismo observado por meio de cDNA-AFLP em cafeeiros contrastantes para a resistência ao patótipo da raça II de *H. vastatrix*.

Análise do polimorfismo dos TDFs	EcoRI G/T*	EcoRI C/A*	Total
Número de locos analisados	15885	17800	33685
Número de combinações analisadas	256	256	512
Locos polimórficos	668	712	1380
Número médio de locos por combinação	62.1	69.5	65.8
Polimorfismos para resistência	207	282	489
Razão do polimorfismo Resistentes/Suscetíveis	1.01	0.90	0.95
Combinações com polimorfismo nos resistentes (%)	38.28	39.61	38.94
Combinações de <i>primers</i> polimórficas (%)	97.7	98.9	98.27
Agrupamentos abertos / TDFs confirmados	3.29	4.46	3.87
Tamanho médio dos TDFs (bp)	505.28	478.89	492

Nota: *Primer EcoRI GNN+TNN; N: bases aleatórias adicionais ao *oligo* de amplificação seletiva.

4.2 Avaliação da similaridade dos TDFs da resposta de resistência a *H. Vastatrix*

Dos 489 polimorfismos para resistência, foram abertos 362 agrupamentos, confirmando 108 TDFs (Tabela 2.2), isto ocorreu porque o nível de expressão em uma ou mais plantas do agrupamento resistente apresentava intensidade de amplificação abaixo dos parâmetros estabelecidos (<5vezes) para as diferenças entre indivíduos suscetíveis e resistentes. Foram detectados 62 TDFs para as combinações que utilizaram *primers* de pré-amplificação EcoRIGNN/ EcoRITNN e 46 para EcoRICNN/ EcoRIANN.

Tabela 2.2 Lista de TDFs obtidos a partir da análise de expressão gênica por cDNA-AFLP em cafeeiros resistentes como 48 + 72 h pós-inoculação com o patótipo da raça II de *H. vastatrix*

TDFs	cDNA-AFLP	bp	Acesso	Descrição da função similar	E value	Max ident
Resposta de Defesa						
1	TAA/GTA	482	AJ781007.1	<i>Raphanus sativus</i> – precursor de peroxidase	2.00e-10	100%
5	TAC/GCT	540	AB070755.1	<i>Vigna angularis</i> - glucosiltransferase-12	7.00e-25	73%
6	TAC/GGT	457	AF325721.1	<i>Pennisetum ciliare</i> - indutor de resposta hipersensível	2.00e-34	90%
14	TAA/GAA	604	AJ279690.1	<i>Betula pendula</i> - glutationa redutase	3.00e-52	85%
16	TTA/GAG	405	AF527795.1	<i>Cucurbita maxima</i> - protein heat shock 70 (Hsp70-1)	6.00e-23	100%
17	TTA/GTA	554	EU196027.1	<i>Coffea arabica</i> - PR5 – thaumatina-like	1.00e-35	90%
20	TTA/GTC	519	AB233415.1	<i>Nicotiana tabacum</i> - LOX lipoxigenase	1.00e-21	97%
18	TAG/GGT	605	AF320905.1	<i>Citrus unshiu</i> - protein metalotioneina-like (MT45)	1.00e-51	100%
24	TTC/GTC	397	X69786.1	<i>C.roseus</i> - citocromo P450 – CitP450	4.00e-08	79%
44	TCG/GCG	650	EU196030.1	<i>Coffea Arabica</i> - PR5 - thaumatina-like	1.00e-52	91%
45	TGA/GAC	525	X03697.1	<i>Zea mays</i> – protein Heat shock 70	2.00e-108	97%
47	TGA/GTC	545	AJ421010.1	<i>Lupinus luteus</i> - metalofosfatase (ppd2 gene)	8.00e-53	87%
56	TGC/GGA	542	DQ222503.1	<i>Sollanum tuberosum</i> - S-adenosyl-L-metionina sintase	2.00e-44	82%
57	TGG/GAC	559	AJ535048.1	<i>Oryza sativa</i> - gene for PDR-like ABC transporter	6.00e-20	77%
60	CAA/ACC	540	NM_119288	<i>Arabidopsis thaliana</i> - ABC1 family protein	5.00e-45	92%
66	CAC/GGC	278	NM_125467	<i>Arabidopsis thaliana</i> – transportador ABC	2.00e-27	92%
72	CTA/ATA	480	AF320905.1	<i>Citrus unshiu</i> – protein metalotioneina-like (MT45)	3.00e-42	80%
83	CTG/ACT	598	Y10982.1	<i>Glycine max</i> - citocromo P450-like	1.00e-73	98%
84	CTG/ACT	704	AF236127.1	<i>Vitis vinifera</i> - catalase (GCat)	5.00e-28	86%
85	CTT/ATG	509	EF122403.1	<i>Citrus</i> sp- glutationa peroxidase	1.00e-32	95%
88	CCT/ATG	416	AJ237990.1	<i>Vitis vinifera</i> – protein metalotioneina-like	5.00e-88	82%
90	CCT/ATG	505	AY426756.1	<i>Nicotiana attenuata</i> - ACC oxidase ACO1 (Aco1)	2.00e-74	76%
91	CCT/ACG	470	Z36977.1	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> - catalase (cat3 gene)	1.00e-95	79%
93	CCC/ATA	292	AF343966.1	<i>Coffea arabica</i> – proteína heat shock	2.00E-33	75%
97	CGA/ACT	360	NM_130382	<i>Arabidopsis thaliana</i> – glutatina peroxidase 4	7.00e-31	88%
102	CGT/AGG	591	AY253326.1	<i>Nicotiana tabacum</i> – protein Heat shock 70 (Hsp70)	2.00e-65	96%
Sinalização						
2	TAA/GTA	303	DQ123967.1	<i>Oryza sativa</i> – homologo a gene de resistência(RGH1A)	8.00e-11	95%
3	CCA/CCG	542	AB189465.1	<i>Zostera marina</i> - zha2 gene para tipo P de H ⁺ -ATPase	8.00e-05	92%
4	CCA/CCG	410	AJ489197.1	<i>Beta nana</i> - Ty1-copia-like retrotransposon	8.00e-16	93%
10	TAG/GTC	408	NM_118863	<i>Arabidopsis thaliana</i> - locus S de proteína cinase	2.00e-42	82%
19	TTA/GTC	685	AB264547.1	<i>Nicotiana tabacum</i> - MEK 2	4.00e-97	84%
23	TTC/ GCG	330	DQ997698.1	<i>Populus trichocarpa</i> - proteína CBL interage c/ cinase 8	6.00e-50	75%
31	TCA/GTC	457	Z99770.1	<i>Solanum tuberosum</i> – proteína P	6.00e-09	93%
40	TCG/GAT	400	NM_116759	<i>Arabidopsis thaliana</i> – Proteína cinase	2.00e-52	94%
48	TGA/GTC	350	NM_104825	<i>Arabidopsis thaliana</i> – Receptor de protein cinase	1.00e-53	81%
53	TGC/GTT	610	AY280868.2	<i>Brassica napus</i> – receptor de beta-glucano (Bger1)	1.00e-101	84%
54	TGC/GCG	555	AY967408.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> - gene de resistência Pto-Like	3.00e-42	88%
58	TGG/GCG	575	AY261514.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> - MAPK 3	1.00e-37	100%
59	TGG/GCG	472	AK226953.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> - Proteína G	4.00e-51	89%
61	CAA/ACC	462	NM_123957	<i>Arabidopsis thaliana</i> - gene 12 associado a senescência	1.00e-90	83%
63	CAT/ATG	482	AK226953.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> - proteína G	2.00e-63	100%
74	CTA/ACG	800	AY781353.1	<i>Triticum aestivum</i> - elemento responsivo etileno 2	4.00e-13	90%
77	CTA/ACG	398	EF566742.1	<i>Coffea</i> spp. domínios NBS-LRR gene de resistência	5.00e-164	93%
81	CTC/ATT	367	NM_104825	<i>Arabidopsis thaliana</i> – MAPK2	2.00e-53	84%
82	CTC/ATG	631	AB075550.1	<i>Nicotiana tabacum</i> - gene pleiotrópico de resist. a seca	3.00e-105	82%
87	CCT/ATA	358	EF121305.1	<i>Nicotiana attenuata</i> – cinase 5 dependente de Ca	2.00e-36	90%
89	CCT/ATG	468	NM_127992	<i>Arabidopsis thaliana</i> – protein ligada a calmodulina	5.00e-57	81%
94	CCG/ATA	383	NM_179408	<i>Arabidopsis thaliana</i> - radical indutor de morte celular-1	3.00e-17	80%
99	CGA/AGG	390	DQ787036.1	<i>Glycine max</i> –fator de transcrição bZIP (bZIP56)	1.00e-21	79%

Continuação da Tabela 2.2

TDFs	cDNA-AFLP	bp	Acesso do GenBank	Descrição da função homóloga	E value	Max ident
Metabolismo						
8	TAC/GTT	463	AJ271468.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> - F1 ATP sintase subunidade beta	3.00e-87	100%
11	TAG/GTG	387	AF353103.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> - H ⁺ -ATPase de MP (LHA1)	5.00e-04	100%
15	TAA/GAA	519	NM_119571	<i>Arabidopsis thaliana</i> - proteína dedo de zinco	3.00e-87	80%
32	TCA/GGA	548	NM_129326	<i>Arabidopsis thaliana</i> - CER1 - esterol desaturase	2.00e-20	89%
33	TCA/GGA	376	AF147739.1	<i>Zea mays</i> - miosina XII (M12)	2.00e-07	97%
51	TGT/GCG	480	AM117807.1	<i>Coffea arabica</i> - gene coumarato-CoA ligase-like	7.00e-38	90%
62	CAT/ATG	584	DQ123974.1	<i>Coffea arabica x Coffea canephora</i> - acyl-CoA oxidase	4.00e-44	89%
70	CAG/ACG	239	AB039889.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> - glucose-1P-Adenililtransferase	5.00e-08	83%
75	CTA/ACG	573	NM_111176	<i>Arabidopsis thaliana</i> - ATPase	9.00e-22	94%
Expressão gênica						
35	TCC/GCT	680	NM0010845	<i>Arabidopsis thaliana</i> - Fator de alcalinização rápida 20	7.00e-10	95%
65	CAG/GGC	496	AY522505.1	<i>Coffea canephora</i> - fator de transcrição ERF-like	8.00e-78	79%
78	CTA/AGC	288	AF434192.1	<i>Zea mays</i> - transposon LH82 Ins2	3.00e-34	100%
92	CCT/AGG	377	AJ132212.2	<i>Gnetum gnemon</i> - domínio de fat. De transcrição MADS	1.00e-08	100%
Proteínas hipotéticas						
21	TTA/GCC	569	AM480817.2	<i>Vitis vinifera</i> - contig VV78X205698.91	8.00e-34	81%
28	TCA/GAA	371	NM0010611	<i>Oryza sativa</i> - mRNA	1.00e-16	100%
37	TCG/GAA	590	AM430398.2	<i>Vitis vinifera</i> - contig VV78X023217.49	3.00e-07	95%
38	TCG/GAA	407	AM488641.2	<i>Vitis vinifera</i> - contig VV78X229894.9	7.00e-08	85%
55	TGC/GCG	551	AB179840.1	<i>Oryza sativa x Indica</i> - Rf-1B pseudogene	1.00e-76	87%
64	CAT/ATG	308	AM424843.2	<i>Vitis vinifera</i> - contig VV78X027846.8	2.00 e-04	100%
95	CCG/ATG	453	EU976997.1	<i>Zea mays</i> - clone 995833	1.00e-42	72%
96	CGA/AAG	305	AM445268.2	<i>Vitis vinifera</i> - contig VV78X134120.12	6.00e-05	71%
98	CGA/AGG	337	EU379002.1	<i>Arabidopsis lyrata</i> - clone AP2_C11	3.00e-41	90%
100	CGT/ATA	329	NM0011373	<i>Zea mays</i> - LOC100191892 mRNA	4.00e-33	84%
101	CGT/AGG	404	AM488641.2	<i>Vitis vinifera</i> - contig VV78X229894.9	4.00e-33	100%
107	CGG/ATA	519	AP008212.1	<i>Oryza sativa</i> - DNA genômico, chromosome 6	2.00e-17	100%
108	CGG/ATG	361	AM481816.2	<i>Vitis vinifera</i> - contig VV78X047089.5	2.00e-12	100%
Não conhecido						
27	TGT/GTG	447	EF085647.1	<i>Picea sitchensis</i> - clone WS02742_B16	2.00e-11	100%
34	TCA/GGA	242	AK249940.1	<i>Hordeum vulgare</i> - cDNA clone: FLbaf51d06	5.00e-07	97%
50	TGT/GCG	850	EF147905.1	<i>Populus trichocarpa</i> - clone WS0125_N24	2.00e-50	83%
71	CAG/ACG	201	AM424901.2	<i>Vitis vinifera</i> - contig VV78X079816.3, gene tRNA	4.00e-17	92%
Crescimento						
12	TAG/GCC	485	AB029325.1	<i>Oryza sativa</i> - gene para aquapotina RWC3	1.00e-11	95%
13	TAG/GCC	539	AM944529.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> - transportador de hexoses	3.00e-37	94%
25	TTC/GAT	382	NM122116.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> - ciclina	7.00e-04	95%
42	TCG/GTA	358	EF044213.1	<i>Coffea arabica</i> - proteína ribossomal L14	1.00e-04	100%
67	CAG/ATC	497	EF044213.1	<i>Coffea Arabica</i> - protein ribossomal S12	4.00e-13	100%
68	CAG/ATC	216	EU029653.1	<i>Nicotiana tabacum</i> - protein ribossomal S26	1.00e-42	100%
69	CAG/ACG	250	EU650384.1	<i>Coffea arabica</i> - proteína ribossomal S26	5.00e-41	98%
79	CTT/ACT	298	EU650384.1	<i>Coffea arabica</i> - proteína ribossomal S26	7.00e-136	99%
80	CTC/ATT	382	NM122116.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> - ciclina	3.00 e-08	93%
103	CGC/ATA	504	NM0010647	<i>Oryza sativa</i> - Isoleucil-tRNA sintetase, classE Ia	4.00e-16	100%
Degradação de proteínas						
22	TTT/GCG	589	AF255338.1	<i>Glycine max</i> - proteassomo subunidade 20S	6.00e-80	100%
41	TCG/GAC	321	EU170471.1	<i>Eucommia ulmoides</i> - ubiquitina conjugase enzima E2	7.00e-22	94%
73	CTA/ATC	667	X77456.1	<i>N.tabacum</i> - Ubiquitina ligaseU4	2.00e-34	84%
86	CTT/ATG	599	L46681.1	<i>L. esculentum</i> - precursor de aspártico protease	1.00e-73	70%

Por meio da comparação de similaridade dos TDFs através dos algoritmos do programa BLASTn com os bancos de dados, foram identificadas 93 sequências similares com genes depositados nestes locais e 15 sequências sem similaridade. Os TDFs foram divididos em classes segundo a similaridade da sequência do gene com a sua função biológica (White e Kerlavage, 1996) (Tabela 2.2 e Figura 2.2).

Dos 93 TDFs similares às sequências dos bancos de dados; 42% estão relacionados diretamente com os processos de resistência na planta, envolvendo sinalização e respostas de defesa. Cerca de 31% não apresentaram similaridade significativa ($E\text{-value} < 10^{-5}$), são genes não conhecidos ou codificam para proteínas hipotéticas, dificultando a comparação com os transcritos de outras plantas. Outros 27% estão correlacionados aos processos fisiológicos de crescimento, metabolismo, degradação de proteínas e expressão de genes (Figura 2.2).

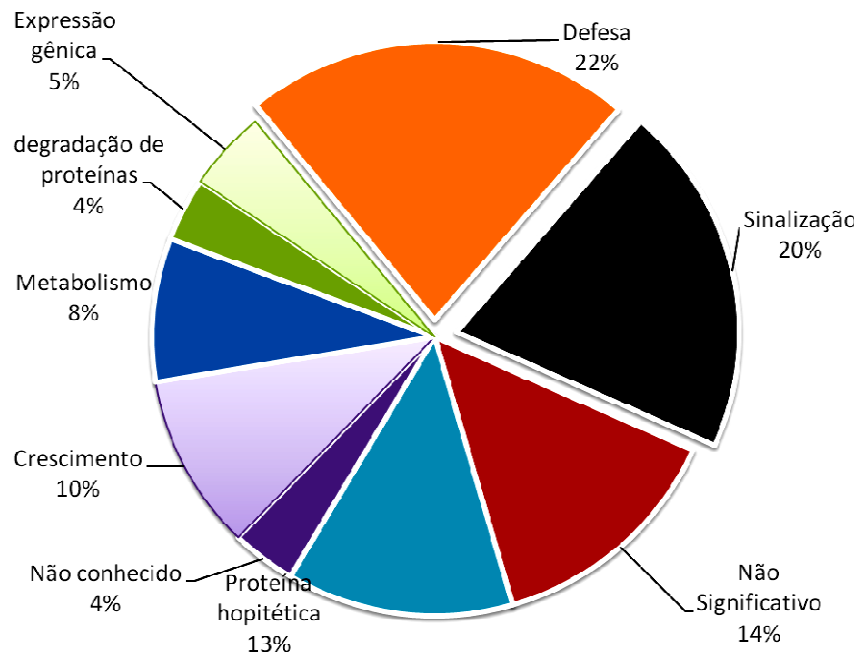


Figura 2.2 a) Esquema de classificação putativa comparativa de acordo com a função biológica segundo os genes expressos pelos TDFs com sequências depositadas nos bancos de dados, conforme recomendações de White and Kerlavage (1996), baseado na similaridade de sequências conhecidas detectadas pela pesquisa com o programa BLASTn.

Dentro dos 93 TDFs estudados, os mais altos *E-value* foram encontradas para TDFs do grupamento defesa, sinalização e crescimento (TDFs: 45, 53, 82 e 79 da Tabela 2.2). Aproximadamente 70% dos TDFs apresentaram um *E-value* entre $1.e-05$ a $1.e-60$, principalmente, os grupos de maior número de TDFs, aqueles relacionados com sinalização, defesa crescimento e proteínas hipotéticas. Das sequências, 21,5% apresentaram fragmentos com identidade máxima de 100%, ou seja, fragmentos com mesma ordem e sequência nucleotídica entre as espécies, e 36,5% entre 90 e 99% (Tabela 2.2). Estas regiões dos genes são altamente conservadas entre as espécies.

4.3 Avaliação quantitativa e temporal da expressão diferencial dos TDFs por qRT-PCR

Das sequências geradas dos TDFs com $E\text{-value} < 1.e^{-10}$, foram selecionadas 30 que estavam relacionados com sinalização ou respostas de defesa. Destes, 21 pares de *primers* (Tabela 2.3) foram validados pela curva de dissociação (dados não mostrados), pois os demais apresentavam mais de um pico da T_m de dissociação, indicando a presença de produtos inespecíficos.

Na validação, comparando os *primers* *Ca actin*, *Ca α -Tubulin* e *Ca Ubiquitin*, foi selecionado por meio do *software* geNorm o par de *primers* de *Ca Actin*, cuja a expressão se manteve mais estável e com a menor variação (Valor de estabilidade 0,1243) para os tratamentos e diferentes genótipos, conforme sugerem Vandesompele et al. (2002), Nicot et al. (2005) e Cruz et al. (2009).

A análise da expressão dos genes foi calculada dentro das amostras biológicas pela normalização pelo gene calibrador *Ca actin* e o tratamento de referência o tempo 0h das plantas resistentes de cada gene alvo. Foram aceitos dados com homogeneidade entre as réplicas técnicas de mesma réplica biológica. Após calcular o nível compartivo da expressão gênica de cada réplica biológica, foi obtida a média de expressão gênica acietando valores com diferenças não significativas pelo teste *t* entre as duas amostras biológicas. As demais análises seguiram-se pelos resultados comparativos do nível de expressão gênica da média das duas amostras biológicas.

Tabela 2.3 Relação dos primers desenhados para as seqüências selecionadas dos TDFs para o estudo quantitativo de da expressão temporal dos genes correlacionados a resistência a ferrugem em café.

Oligo	Seqüências Senso (5'→3')	Seqüência antisense (5'→3')
Ca TDF1 POX	CCTATTTGACTTGCAGAGCG	GAGAGGCTTATCTGGGCTTC
Ca TDF2 RGH1A	GATAAGCCGCTTATGACAC	CTGATTGGTATCTCTGACG
Ca TDF14 GR	AGGCATAAAAGTTTCGCACAG	CACAGCTTCCAAATTCAACC
Ca TDF19 NtMEK2	GATGTTACACGAGCCAATCC	TCTTGTATCAGATCCTCCGC
Ca TDF24 Cyp450	GCATGATAGTCTCCCTGGTG	TTCAAGCCTACATTTCTCTGC
Ca TDF41 UbiE2	ACAAGACCGATCGAAACAAG	TACAGCTGCTCTGCTAACCC
Ca TDF44 PR5	CAACAAGGGAAATGTGCAAG	GGTGGAGTTCTTCAATGCAC
Ca TDF48 RLK	CTCCTACGGTTACAGCTCCG	AGCATTTTGGGTGAACCTTGG
Ca TDF53 Begr1	AGAACGGTGATCAACCTGAA	GAGATGGGTAACAGACGGTG
Ca TDF54 Pto-Like	AAAACCCCTGGATCAGCATA	TGAAACAGGGTCACGTATTG
Ca TDF56 SAMsI	GCAGGTTTCTTATGCCATTG	TCAGAGCGAGAATATCCCTG
Ca TDF58 MAPK8	GATGTTACACGAGCCAATCC	TCTTGTATCAGATCCTCCGC
Ca TDF61 SAG12	TGGCGGTTAAGAGAATTGAG	ATTCTCATGGCCAGCTAAAG
Ca TDF72 ERB2	ACCAGTGCAAGACCAATTTTC	ATGGGTAATGAAAGAAGGGG
Ca TDF77 NBS-LRR	ATCAGTTGGTAAAACCTGCCG	CTAGCTGGCTCGAGAGAATG
Ca TDF81 MAPK2	GATCCGTTATCATCTCACC	TGAGGATGTGGAAGTTTGTG
Ca TDF87 CDPK	GGGTATGTTGGCACAGATAA	CAATTGGAAGAACCATCTTG
Ca TDF89 CBP	CCAATTCAACAATTTGTGCT	TCAGGTAAAGCTGTTGTTGG
Ca TDF90 Aco1	AAAACCTGGGGTTTCTTTGAG	ACTCCTTGAACCTTTGTTCC
Ca TDF97 GPX4	GCTCCCTCTTGTTCCTCAGAT	ATGAGCATCTTGACTTGTGC
Ca TDF99 bZIP56	ATTATCCCGTTAGAGCAAGC	ACGTATCCATATCCTCCCAC
Ca Actin	CTTGAAATACCCCATTGAGC	ACAGGATGTTCTTCTGGAGC

4.3.1 Análise quantitativa da expressão dos TDFs

A expressão gênica dos TDFs possuem igual intensidade entre o controle (resistente 0h), tratamento 12h das plantas resistentes e todos os tratamentos das plantas suscetíveis. Diferenças significativas foram detectadas nos tratamentos que sucederam o período de 12 h pós-inoculação no genótipo resistente (Figuras 2.4 e 2.5). Para todos estes TDFs similares a genes de sinalização, foi observado que a maior expressão ocorre em 24 h pós-inoculação (Figura 2.4), enquanto que para os TDFs relacionados com respostas de defesas em 72 h (Figura 2.5).

A maior intensidade de transcrição para os TDFs similares a genes de sinalização foi observada para o TDF77 Ca NBS-LRR 24 h pós-inoculação, ~14 vezes maior que o controle (Figura 2.3). Para os TDFs similares a genes que conferem resposta de defesa, foi observado que o TDF44 CaPR5 no genótipo resistente 72 h pós-inoculação apresentou expressão ~18 vezes maior em relação ao controle e genótipo resistente (Figura 2.3).

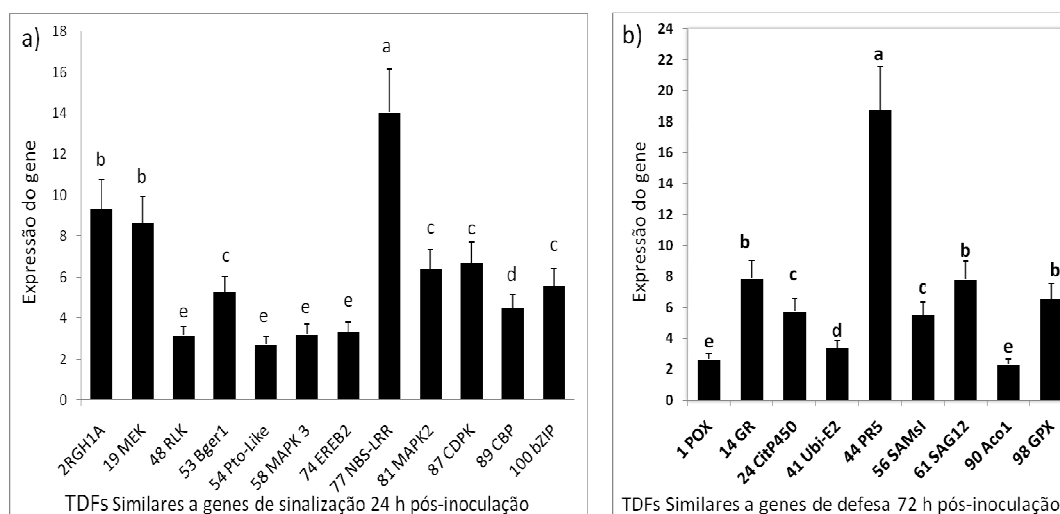


Figura 2.3 Análise qualitativa da expressão gênica dos transcritos de cDNA-AFLP ativados para a resposta de resistência do cafeeiro para a raça II de *H. vastatrix*. Não foi apresentada a análise da expressão dos TDFs do genótipo suscetível, pois não houve diferenças significativas entre genes. a) Transcritos expressos diferencialmente para a sinalização 24 h pós-inoculação em genótipo resistente, e b) para respostas de defesa da planta 72 h depois da inoculação em genótipo resistente.

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os nível de expressão dos transcritos. ANOVA simples com separação de médias pelo teste Scott-Knot a 5%.

4.3.2 Análise temporal da expressão dos TDFs

Para os TDFs similares a genes de sinalização em genótipos resistentes, foram detectadas diferenças significativas na expressão em períodos superiores a 12 h pós-inoculação. A maior expressão gênica foi detectada em todos os TDFs desta classe em 24 horas após da inoculação e em alguns os altos níveis permaneceram por até 48 h.

Os dois TDFs com maior intensidade de expressão: TDF 2 RGH1A (Figuras 2.3a e 2.4a) e TDF 77 NBS-LRR (Figura 2.4c) se apresentaram alta similaridade com genes de resistência (Tabela 2.2). A expressão deste grupo de genes apresentou o mesmo padrão de expressão ao longo do tempo, iniciando a transcrição 12 h após a inoculação, atingindo o máximo em 24 h e reduzindo a atividade exponencialmente a níveis quase basais em 72 h. TDFs similares a genes localizados na cascata de cinases tiveram a expressão levemente reduzida em 48 h de inoculação, mas caiu sensivelmente em 72 h (Figura 2.4b, 2.4d e 2.4e). Os demais TDFs, exceto TDF99 Ca bZIP (Figura 2.4f), apresentaram expressão 2,7<5,0 vezes de que o controle e do genótipo suscetível no tempo 24 h.

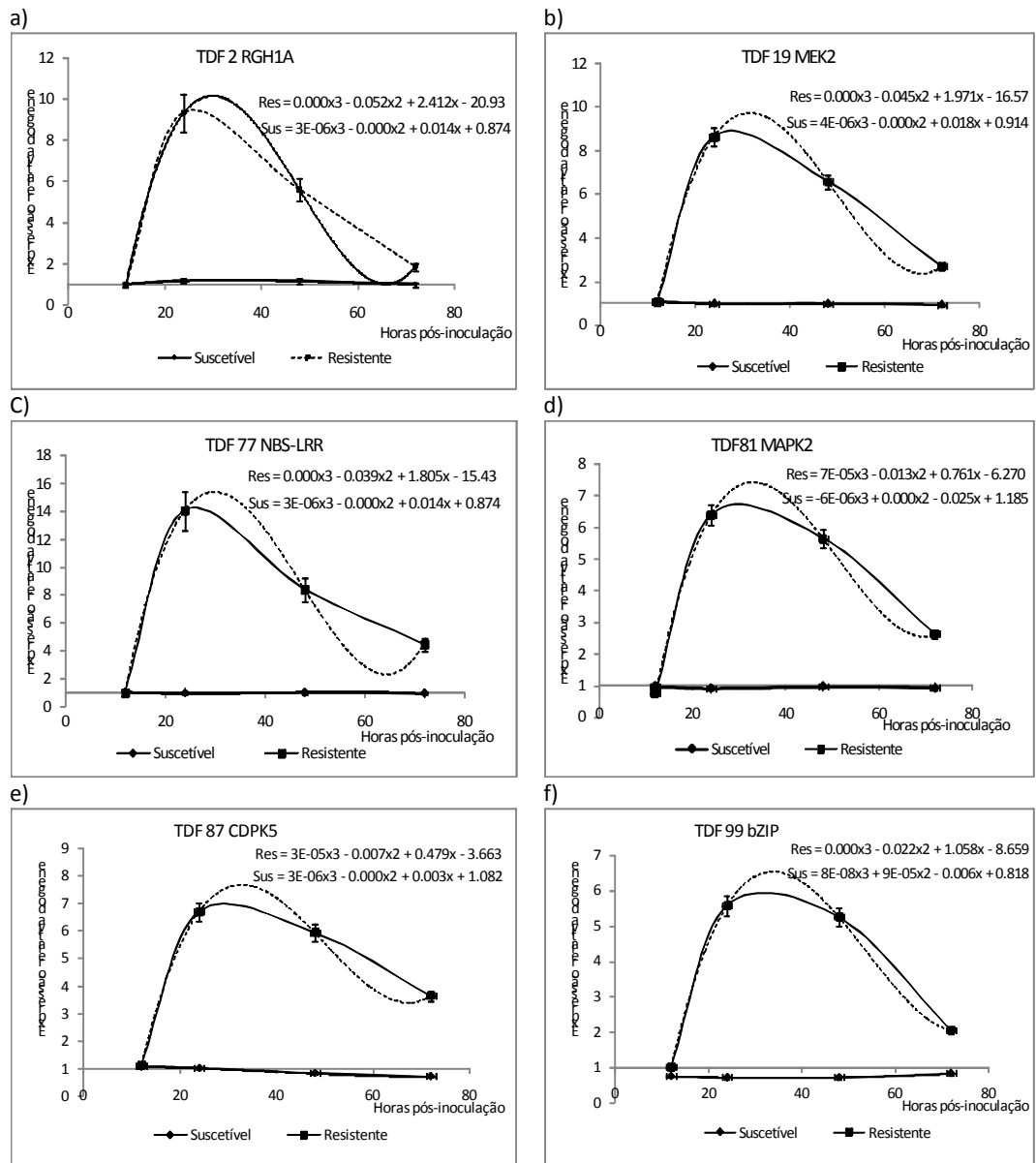


Figura 2.4 Nível transcricional ao longo do tempo de ativação dos seis TDFs similares aos seis genes de sinalização mais diferencialmente expressos durante a interação café/*H. vastatrix* patótipo da raça II. R^2 sempre 1. Barras: desvio padrão a 5% de probabilidade.

Para o estudo temporal e quantitativo dos transcritos similares a genes de resposta de defesa, houveram diferenças significativas de intensidade máxima entre TDFs e quanto ao período de expressão depois de 12h (Figura 2.4 e 2.5). Neste estudo está sendo representado graficamente apenas os TDFs com intensidade máxima de expressão maior de 5 vezes da maior intensidade do controle (resistente no tempo 0 h). O maior nível de expressão ocorreu em 72 h após a inoculação para todos os TDFs correlacionados a resposta de defesa.

Estes transcritos apresentaram contínuo aumento após 12 h de inoculação, estendendo-se até 72 h. Os TDFs 14GR (Figura 2.5a), 44PR5 (Figura 2.5c) e 97PRX (Figura 2.5f) apresentaram a expressão máxima em 72 h, estatisticamente igual a 48h e com tendência de redução de expressão depois deste período. Já os TDFs 24 CitP450 (Figura 3.5b), 56 SAMsI (Figura 3.5d) e 65 SAG12 (Figura 3.5e) apresentaram intensidades de transcrição crescente, atingindo o máximo em 72h, e podendo se estender por um período mais longo e com maior expressão (dados não apresentados, pois o estudo abrangeu até 72 h).

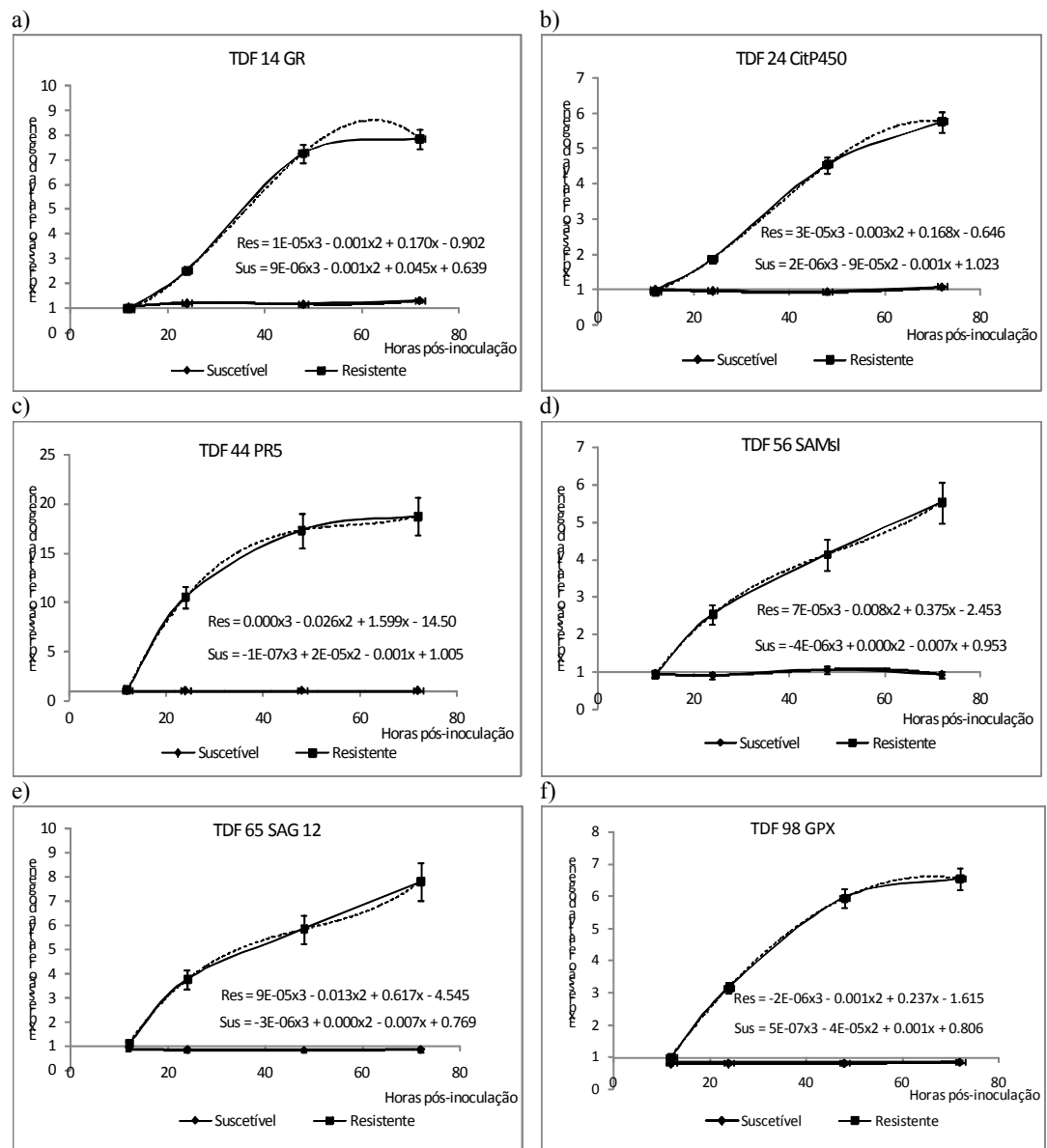


Figura 2.5 Nível transcricional ao longo do tempo de ativação dos seis TDFs similares a genes de resposta de defesa mais diferencialmente expressos durante a interação café/*H. vastatrix* patótipo da raça II. R^2 sempre 1. Barras: desvio padrão a 5% de probabilidade.

4.3.3 Agrupamento dos TDFs segundo o padrão de expressão

O método preditivo da análise de agrupamento reúne os genes e genótipos em grupos pelo critério de dissimilaridade da expressão gênica, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre os grupos, identificando os efeitos divergentes e com maior probabilidade de sucesso da interpretação dos dados. Esta análise possibilitou classificar e organizar informações sobre variáveis de expressão ao longo do tempo entre cafeeiros e formar grupos homogêneos.

Foi detectada a presença de dois grupos distintos, separando inicialmente genótipo resistente do suscetível. No genótipo suscetível, todos os TDFs não apresentaram alterações significativas da expressão dos seus genes correlacionados. No genótipo resistente foi identificado que os genes diferencialmente expressos encontram-se em grupos distintos, como é o caso dentre eles o mais evidente, codificado pelo TDF44, similar a uma PR5 e TDF77 NBS-LRR, que apresentam a maior dissimilaridade entre si e os demais TDFs (Figura 2.6).

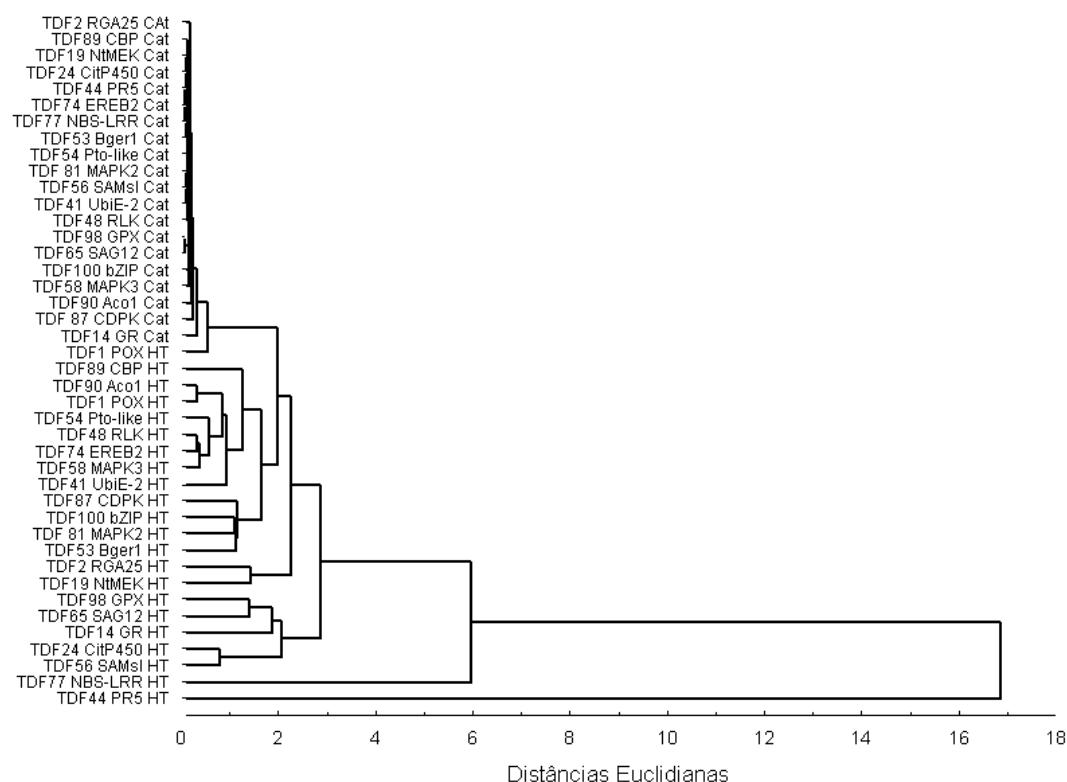


Figura 2.6 Classificação e organização das variáveis de expressão gênica ao longo do tempo entre genótipos, formando grupos homogêneos pelo grau de dissimilaridade do comportamento quanto ao nível de expressão dos genes de resposta a infecção do patótipo da raça II de *H. vastatrix*.

MANOVA: método de agrupamento hierárquico em cluster por simples ligações divisivas, encadeamento médio em distâncias euclidianas não padronizadas

4.3.4 Coexpressão entre TDFs

O padrão do nível de expressão gênica foi avaliado durante o período de infecção e resposta de defesa da interação fungo biotrófico/cafeeiro. No entanto, houve correlação negativa para quase todos os genes em genótipo suscetível, tanto dentro do genótipo, quanto aos genes do genótipo resistente (dados não mostrados). Mostra que a coexpressão dos genes analisados em genótipo suscetível não foi dependente da presença e infecção do patógeno por não estarem correlacionados entre si.

A análise pela comparação do nível de redundância de coexpressão dos genes em genótipo resistente, mostrou que os valores foram sempre positivos (Tabela 3.4), indicando que existe um padrão de coexpressão gênica entre os genes ao longo do período de infecção. Foi evidenciado que 55% das correlações encontravam-se com valores entre 20 e 90% de redundância, e 45% com valores entre 90 e 100%. Nesta classe, 24% apresentou redundância entre 90 a 95%; 50,5% com 95 a 99%; e 25,5% acima de 99% de redundância do padrão de coexpressão gênica para o tempo entre 0 e 72 horas após a inoculação do patógeno. Os resultados obtidos indicaram que os TDFs estudados similares aos genes com funções de respostas para a resistência em genótipo resistente, podem ter sua atividade intimamente ligada e dependentes entre si.

Os genes com maior padrão de coexpressão com os demais, foram TDF 58 MPK3 (similar a uma proteína mitógena ativada por cinase 3 de *S. lycopersicon*) e o TDF 87 CDPK5 (similar a cinase 5 dependente de cálcio de *N. attenuata*). Estes dois transcritos podem estar envolvidos na sinalização em resposta de resistência (Tabela 2.2). Foi identificado um alto nível de coexpressão do gene codificado pelo TDF 87 com genes codificadores de produtos dependentes de cinases (TDFs: 89 CBP, 48 RLK, 81 MAPK2 e 58 MAPK3), receptores de elicitores (TDFs 48 RLK e 51 Bgr1) e fatores de transcrição (TDF 74 EREB2). O TDF 58 MAPK3 correlacionou-se significativamente (>99%) com genes relacionados a cinases (TDFs: 87 CDPK5, 81 MAPK2 e 19 NtMEK), genes de resistência (TDF 54 Pto-Like), e fatores de transcrição (TDF 99 bZip) (Tabela 2.4). Estes resultados indicaram que estes TDFs podem estar envolvidos nas vias de sinalização, mediando a cascata de cinases.

Tabela 2.4 Matriz de coeficientes de correlação de Spearman dos TDFs no genótipo compatível quanto ao padrão temporal e quantitativo de coexpressão gênica durante o processo de infecção que compreende o período de 0 a 72 horas após a inoculação do patótipo da raça II de *H. vastatrix*.

	TDF 2 RGA 25	TDF 89 CBP	TDF 90 Aco1	TDF 87 CDPK	TDF 99 Bzip	TDF 97 GPX4	TDF 54 Pto-Like	TDF 48 RLK	TDF 81 MAPK2	TDF 1 POX	14 GR HT	TDF 19 NtMEK	TDF 24 CiytP450	TDF 41 UBI-E2	TDF 44 PR5	TDF 53 Bger1	TDF 56 SAMsI	TDF 58 MAPK3	TDF 65 SAG 12	TDF 74 EREB	TDF 77 NBS-LRR
TDF 2 RGA 25	1																				
TDF 89 CBP	0.940	1																			
TDF 90 Aco1	0.723	0.913	1																		
TDF 87 CDPK	0.920	0.996	0.921	1																	
TDF 99 Bzip	0.946	0.967	0.817	0.975	1																
TDF 97 GPX4	0.274	0.586	0.849	0.626	0.490	1															
TDF 54 Pto-Like	0.913	0.970	0.858	0.983	0.994	0.576	1														
TDF 48 RLK	0.901	0.993	0.935	0.999	0.968	0.660	0.981	1													
TDF 81 MAPK2	0.950	0.987	0.862	0.990	0.994	0.534	0.990	0.985	1												
TDF 1 POX	0.593	0.824	0.982	0.833	0.695	0.903	0.750	0.852	0.752	1											
TDF 14 GR	0.141	0.468	0.759	0.517	0.388	0.988	0.480	0.556	0.425	0.824	1										
TDF 19 NtMEK	0.983	0.978	0.810	0.972	0.987	0.426	0.971	0.961	0.990	0.690	0.306	1									
TDF 24 CiytP450	0.077	0.413	0.736	0.456	0.303	0.979	0.397	0.495	0.351	0.822	0.991	0.234	1								
TDF 41 UBI-E2	0.180	0.500	0.809	0.526	0.351	0.969	0.436	0.560	0.415	0.896	0.952	0.315	0.976	1							
TDF 44 PR5	0.395	0.685	0.912	0.718	0.587	0.991	0.664	0.748	0.632	0.948	0.959	0.535	0.946	0.957	1						
TDF 53 Bger1	0.898	0.990	0.931	0.998	0.971	0.662	0.984	1.000	0.986	0.846	0.559	0.960	0.496	0.556	0.748	1					
TDF 56 SAMsI	0.203	0.523	0.822	0.554	0.391	0.986	0.478	0.589	0.449	0.900	0.972	0.345	0.986	0.997	0.973	0.587	1				
TDF 58 MAPK3	0.948	0.987	0.861	0.991	0.996	0.536	0.993	0.986	0.999	0.751	0.427	0.990	0.353	0.414	0.633	0.987	0.449	1			
TDF 65 SAG 12	0.256	0.569	0.852	0.598	0.436	0.987	0.521	0.631	0.493	0.923	0.964	0.394	0.976	0.994	0.982	0.629	0.998	0.494	1		
TDF 74 EREB	0.883	0.989	0.948	0.996	0.957	0.691	0.974	0.999	0.977	0.873	0.589	0.948	0.531	0.595	0.776	0.999	0.624	0.978	0.664	1	
TDF 77 NBS-LRR	0.987	0.975	0.818	0.956	0.946	0.401	0.927	0.942	0.964	0.711	0.266	0.985	0.215	0.328	0.517	0.937	0.345	0.962	0.396	0.931	1

 coexpressão entre 90 e 95%
 coexpressão entre 95 e 99%
 coexpressão acima de 99%
 Associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

3.5 DISCUSSÃO

Os resultados de identificação de TDFs obtidos das técnicas de cDNA-AFLP mostram que quando aplicada estrategicamente combinada com outras técnicas como a montagem experimental com grupamentos contrastantes, torna-se uma poderosa ferramenta para a seleção de genes específicos diferencialmente expressos. Apesar do polimorfismo detectado em grupamentos fechados, foi confirmado um quarto dos TDFs identificados devido a ausência de amplificação de um a quatro genótipos do grupo resistente o que inferia em falsa interpretação (Tabela 3.1). Esta técnica foi inicialmente aplicada para a seleção de marcadores genéticos (Michelmore et al., 1991), como no estudo do capítulo anterior com AFLP, os grupamentos distintos de genótipos suscetíveis e resistentes facilitaram a detecção de genes correlacionados com a infecção de *H. vastatrix* em folhas de genótipos de cafeeiros resistentes. Diferente do AFLP, que faz um *screening* do genoma, o cDNA-AFLP avalia apenas regiões gênicas, que conforme resultados do estudo de genes de resistência em soja por Barros et al. (2000), aumenta a probabilidade de encontrar genes que controlam características específicas.

O uso de genótipos contrastantes em grupamentos distintos como estratégia de trabalho, facilitou a seleção de genes alvos porque aumentou a especificidade destas sequências estarem correlacionadas ao caractere estudado. As sequências selecionadas apresentaram alta similaridade com genes que codificam para proteínas relacionadas com o processo de resistência a doenças em plantas (Tabela 2.3), como por exemplo, proteínas cinases, *PR* proteínas, genes *R* e proteínas ligadas ao processo de HR. Os processos biológicos com os quais essas sequências estão envolvidas incluíram metabolismo, crescimento, ativação gênica, sinalização, respostas de defesa.

Foi observado neste estudo que a ativação dos genes ocorreu por volta de 12 h pós-inoculação. Este fenômeno também foi observado para a interação incompatível para cafeeiro/*H. vastatrix* por Silva et al. (2006) e Ganesch et al. (2006), que demonstraram que o reconhecimento do patógeno acontece momentos depois penetração do fungo na câmara de substomática, por volta de 12 a 16 h depois da inoculação. Verificou-se que a maior expressão dos TDFs envolvidos na sinalização aconteceu entre 24 e 48 h pós-inoculação, enquanto os TDFs similares a genes de respostas de defesa apresentaram aumento significativo a partir de 12 h, com maior intensidade em 72 h pós-inoculação. Em várias interações planta-ferrugem, a

resistência hospedeiro raça específica as respostas são tipicamente expressas simultaneamente com o formação do primeiro haustório (Heath, 1997; Mould et al., 2003). *H. vastatrix*, pode alcançar a fase de haustório entre 24 e 48 h pós-inoculação (Martins e Moraes 1996; Silva et al., 1999, 2002), momento de maior intensidade de resposta de resistência e aumento da atividade de defesa. Observações citológicas de folhas de café resistentes revelaram que em muitos locais de infecção (estômatos) o fungo teve seu crescimento paralisado na fase pré-haustorial (HMC) (Silva et al., 2002), sugerindo que em resposta de resistência é expressa precocemente no hospedeiro. A ativação de genes pode ocorrer entre 12 e 18 h pós-inoculação e podem fazer parte das respostas de resistência de café e atuar como efetores na interação incompatível de cafeeiro/ferrugem (Silva et al., 2006).

O gene de maior expressão relativa identificado, foi o gene codificado pelo TDF similar a proteína relacionada a patogênese- PR5 taumatina (Figura 2.5c e 2.6). As PRs são as proteínas mais importantes de defesa, especificamente as PR5 taumatina-like estão localizadas no espaço intercelular e atuam na defesa da planta contra microrganismos patogênicos (Wan et al., 2008). Elas atuam por meio de hidrólise enzimática de polímeros de 1-3 betaglucanos da parede do fungo provocando o colapso celular e morte do fungo (Guzzo et al., 2009). São muito estáveis em pHs baixos (ao redor 3.0), relativamente resistente à enzimas proteolíticas endógenas; geralmente são monômeros de baixo peso molecular. Normalmente não são encontradas em plantas saudáveis, mas sob tratamentos químicos indutivos específicos elas podem responder por 10% do conteúdo protéico solúvel da folha (Stintzi et al., 1993).

Outros genes importantes nas rotas de degradação controlada de proteínas (homologo a UbiE2 ligase), síntese de etileno (SAMsI), oxidação de lipídios (LOX), peroxidação (POX), senescência (SAG12) e redução de compostos celulares (GR) foram identificados. Conforme Paparu et al. (2007), um conjunto de genes semelhantes a estes, sob condições de indução pela presença de *Fusarium oxysporum* permitiram uma completa supressão da continuidade de infecção do patógeno.

Foi identificado que uma série de genes que codificam motivos envolvidos na sinalização de reconhecimento e ativação de respostas de defesa tem intensidade de transcrição igual, variando de 2,7 a 7 vezes a intensidade de genótipos suscetíveis ou de tratamentos controles (Resistente em 0 h pós-inoculação). Estes níveis de expressão são

coerentes com valores citados por Corné et al. (2001) e são suficientes para desencadear as respostas de resistência diferencial entre genótipos (Jalali et al, 2005; Zhao e Qi, 2008), como observado no presente trabalho.

Dentre os TDFs analisados similares a genes com função de sinalização, destaca-se o gene de reconhecimento contendo os domínios NBS-LRR (Figura 2.4c). Este gene apresentou expressão ~14 vezes maior no genótipo suscetível e a expressão atingiu o nível máximo depois de 24 h pós-inoculação caindo acentuadamente depois deste período. Estudos recentes mostram que em níveis semelhantes, por si só, a expressão diferencial de somente um gene desta classe, foi responsável por desencadear o processo de ativação da respostas de resistência em cevada (Rostoks et al., 2004), em cana de açúcar (You-Xiong et al., 2008) e em álamo (Zang et al., 2008). O gene codificado pelo TDF77 NBS-LRR é um candidato do reconhecimento do patógeno e da ativação da resposta de resistência vertical do café para raça II de *H. vastatrix*.

A resposta de resistência específica é dependente do reconhecimento do elicitor do patógeno e da ativação das vias de sinalização (Wang et al., 2009), geralmente a cascata de cinases é responsável por reproduzir ou transmitir a informação do local de reconhecimento ao núcleo da célula (Zhang et al., 2006), chamado processo de sinalização de resposta de resistência (You-Xiong et al., 2008). Depois que a informação é decodificada no núcleo, ativando a resposta de defesa que é o processo de ativação de genes que vão desencadear o processo da síntese de produtos que atuarão diretamente ou indiretamente contra a infecção do patógeno (Wan et al., 2008). Durante estes processos, grupos de genes sofrem ativação simultaneamente e dependentemente entre si, co-expressam com similaridade quantitativa e temporalmente em plantas resistentes (Jia et al., 2000; Trinchieri, 2003). Os resultados deste trabalho mostraram que os TDFs avaliados não se correlacionam significativamente quanto ao modo de comportamento de expressão durante o processo de infecção em genótipo suscetível. Portanto, estes genes sob estas condições comportam-se de maneira independente. No entanto, o padrão de expressão temporal e quantitativo dos TDFs em genótipo resistente apresenta coexpressão durante o período de infecção (Tabela 2.4), indicando que podem estar envolvidos em uma via de sinalização de resposta de defesa, especialmente aqueles envolvidos na cascata de cinases. Os genes que foram identificados podem participar de um conjunto complexo de vias metabólicas que atua de forma diversa na expressão das respostas de defesa das plantas de café na interação incompatível. Estas informações somadas a outras poderão auxiliar na elaboração de

estratégias para que as novas tecnologias atuem sobre especificamente em genes alvos, permitindo determinar os mecanismos deste processo biológico.

Trabalhos futuros poderão determinar quais destes genes possuem maior importância na resposta de resistência e em que mecanismo específico estes transcritos estão envolvidos. Será possível piramidar ou superexpressar estes genes podendo produzir desde respostas basais a completa resistência em hospedeiro a ferrugem e, possivelmente também a outros patógenos em café.

6 CONCLUSÕES

A técnica de cDNA-AFLP é uma ferramenta robusta em detectar TDFs, adequando-se perfeitamente ao estudo da expressão gênica da interação incompatível cafeeiro-*H.vastatrix* raça II. Combinada com o uso de grupamentos segregantes distintos aumentaram a eficiência de detecção de genes envolvidos na resistência.

O aumento da atividade de transcrição para a resposta de resistência foi observada apenas 12h depois da inoculação de *H. vastatrix* sobre os discos foliares de genótipo resistente de *C. arabica*.

Os TDFs similares a genes de sinalização da resistência apresentaram maior expressão 24 h pós-inoculação seguido de diminuição acentuada para os demais períodos, enquanto que os TDFs relacionados com genes de resposta de defesa tiveram expressão aumentada até 72 h de inoculação.

Os TDFs 77 NBS-LRR e o 44 PR5 apresentaram elevada dissimilaridade do nível de expressão quantitativo e espacial entre si e entre os demais TDFs. O primeiro é um gene candidato de reconhecimento do patógeno, que pode desencadear os processos de sinalização de resposta de resistência a raça-específica. O segundo, pode codificar para uma das principais proteínas relacionadas a patogenese e ser responsável pela defesa em cafeeiro contra a infecção do patótipo da raça II de *H. vastatrix*.

Durante o processo de infecção, os genótipos apresentaram padrão quantitativo e temporal de expressão gênica distinto entre si. Apenas o genótipo resistente apresenta coexpressão significativamente similar entre os genes avaliados, podendo estes, estarem dependentemente envolvidos nas vias de sinalização e defesa da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, A.A.; Fishbein, M. Plant defense syndromes. *Ecology*, Supplement, 2006. **87(7)**:132–S149

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular in Biology*, 1990. **215**:403–410

Ali-Benali, M.A.; Alary, R.; Joudrier, P.; Gautier, M.F. Comparative expression of five *Lea* genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR, *Biochem. Biophys. Acta (BBA) Gene Structure Experiment*, 2005. **1730**:56–65.

Bachem, C.W.B.; Van der Hoeven, R.S.; Bruijin, S.M.; Vreugdenhil, D.; Zabeau, M.; Visser, R.G.F. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during tuber development. *Plant Journal*, 1996. **9**:745-753.

Barros, E.G.; Tingey, S.; Rafalski, J. Sequence characterization of hypervariable regions in the soybean genome: leucine-rich repeats and simple sequence repeats. *Genetics and Molecular Biology*, 2000. vol23, **2**:411-415

Chuanzao, M.; Keke, Y.; Ling, Y.; Bingsong, Z.; Yunrong, W.; Feiyan, L.; Ping, W. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *Journal of Experimental Botany*, 2004. Vol. 55, **394**:137-143.

Corné, M.J.; Pieterse, T.; Jurriaan T.; Van Loon L.C. Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden? *Biotech Net*, 2001. Vol 3 pp. 1-8.

Cruz, F.; Kalaoun, S.; Nobile, P.; Colombo, C.; Almeida, J.; Barros, L.M.G.; Romano, E.; Grossi-de-Sá, MF.; Vaslin, M.; Ferreira, M.A. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR *Molecular Breeding*, vol **23**, nº 4, 2009. p. 607-616

D'Alessio, J.M.; Gerard, G.F. Second-strand cDNA synthesis with *E. coli* DNA polymerase I and RNase H: the fate of information at the mRNA 5' terminus and the effect of *E. coli* DNA ligase. *Nucleic Acids Research*, 1988. **16(5)**: 1999–2014.

Dellagi, A.; Birch, P.R.J.; Heilbronn, J.; Lyon, G.D.; Toth, I.K. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microbiology*, 2000. **146**:165–171.

Fernandez, D.; Santos, P.; Agostini, C.; Bom, C.; Petiot, A.; Silva, M.C.; Guerra-Guimarães, L.; Ribeiro, A.; Argout, X.; Nicolo, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology*, 2004. vol 5, **6**:527-536(10).

Ganesh, D.; Petitot, A.S.; Silva, M.C.; Alary, R.; Lecouls, A.C.; Fernandez, D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Science*, 2006. **170**:1045–1051.

Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens, *Annual Review of Phytopathology*, 2005. **43**: 205-227

Guzzo SD. 2004. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese de doutorado, Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 236pp.

Guzzo, S.D.; Harakava, R.; Tsai, S.M. Identification of coffee gene expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. *Journal Phytopathology*, 2009. **1**:1-14

Heath, M.C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Annual Botanic*, 1997. **80**:713-720.

Heath, M.C. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 2000. **44**:321-334.

Jalali, B.L.; Bhargava, S.; Kamble, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. *Journal of Phytopathology*, 2006. Vol. 154 **2**:65-74.

Jia, Y.; McAdams, S.A.; Bryan, G.T.; Hershey, H.P.; Valent, B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The Embol Journal*. 2000. **19(15)**: 4004–4014.

Liang, P.; Pardee, A.B. *Differential Display* of eukaryotic messenger RNA by means of the Polymerization Chain Reaction. *Science*, 1992. **257**: 967-971.

Lin, F.; Ding, H.; Wang, J.; Zhang, H.; Zhang, A.; Zhang, Y.; Tan, M.; Dong, W.; Jiang, M. Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. *Journal of Experimental Botany*, 2009. p. 1-18

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta CT)$ method, *Methods in Molecular Biology*, 2001. **25**:402–408.

Martins, E.M.F.; Moraes, W.B.C. Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. *Journal Phytopathology*, 1996. **144**:519-526.

Mendgen, K.; Voegelé, R.T. Biology of rusts and mechanisms of infection. pp.233-248. In: Zambolim L, Zambolim E, Várzea VMP (eds), Durable Resistance to Coffee Leave Rust, Viçosa. 2005.243p.

Michelmore, R.W.; Paran, I.; Kesseli, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in

specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991. **88**: 9828-9832

Mould, M.J.; Xu, T.; Barbara, M.; Iscove, N.N.; Heath, M.C. cDNAs generated from individual epidermal cells reveal that differential gene expression predicting subsequent resistance or susceptibility to rust fungal infection occurs prior to the fungus entering the cell lumen. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2003. **16**:835-45.

Nicot, N.; Hausman, J.; Hoffmann, L.; Evers, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 2005.vol. 56, **421**:2907–2914.

Paparu, P.; Dubois, T.; Coyne, D.; Viljoen, A. Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2007.vol 71, **4-6**: 149-157

Rostoks, N.; Steffenson, B.J.; Kleinhofs, A. Structure and expression of the barley stem rust resistance gene *Rpg1* messenger RNA. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004. vol 64. **2**:91-101.

Silva, M.C.; Nicole, M.; Guerra-Guimarães, L.; Rodrigues Jr. C.J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiology Molecular in Plant Pathology*, 2002. **60**:169-183.

Silva, M.C.; Nicole, M.; Rijo, L.; Geiger, J.P.; Rodrigues Jr. C.J. Cytochemistry of plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)- *Hemileia vastatrix* (race III). *Journal Plant Scienc*, 1999. **160**:79-91

Silva, M.C.; Várzea, V.; Guimarães, L.G.; Azinheira, H.G.; Fernandez, D.; Petitot, A.S.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Nicole, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease Braz. *Journal Plant Physiology*, 2006. **18(1)**:119-147

Seo, S.; Seto, H.; Koshino, H.; Yoshida, S.; Ohashi, Y. A diterpene as an endogenous signal for the activation defense response to infection with tobacco mosaic virus and wounding in tobacco. *Plant Cell*, 2003. **15**:863-873.

Statsoft. STATISTICA 8.0 Software Version Trail. <https://www.statsoft.com/secure/statistica8trial.html>. Acessado em jun 2009.

Stintzi, A.; Heitz, T.; Prasad, V.; Wiedemannmerdinoglu, S.; Kauffmann, S.; Geoffroy, P.; Legrand, M.; Fritig, B. Plant “pathogenesis related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimistry*, 1993. **75**: 687-706.

Takken, F.L.W.; Albrecht, M.; Tameling, W.I.L. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 2006, **9**:383–390

Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2003. **3**, 133-146

- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. vol **3**, 2002. p 1-12
- Varzea, V.M.P.; Rodrigues Jr., C.J.; Silva, M.C.; Gouveia, M.; Marques, D.V.; Guerra-Guimarães, L.; Ribeiro, A. Resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. In: Zambolim L (ed.), *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*, 2002. pp.297-320.
- Van Loon, L.C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Datta, S.K.; Muthukrishnan, S. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, 1999. pp.1-19.
- Voegelé, R.T.; Mendgen, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, 2003.**159**:93-100.
- White, O.; Kerlavage, A.R. TDB: New databases for biological discovery. *Methods Enzymology*, 1996. **266**:27-40.
- Wilson, K.; Walker, K. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. 5a edição. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.784 p.
- Wan, J.; Zhang, X.; Neece, D.; Ramonell, K.M.; Clough, S.; Kim, S.; Stacey, S.G.; Stacey, G. A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2008. **20**: 471–481.
- Wang, G.; Ellendorff, U.; Kemp, B.; Mansfield, J.W.; Forsyth, A.; Mitchell, K.; Bastas, K.; Liu, C.M.; Woods-Tor, W.; Zipfel, C., et al. A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2008. **147**:503-517
- Wang, S.; Rao, P.; Ye, X.. Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. *Applied Microbiology for Biotechnology*, 2009. **82**:79–86
- Yamaguchi, T.; Ito, Y.; Shibuya, N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. *Trends Glycoside Glycotechnology*, 2000. 12:113-120.
- Zhang, A.; Jiang, M.; Zhang, J.; Tan, M.; Hu, X. Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Abscisic Acid-Induced Antioxidant Defense and Acts Downstream of Reactive Oxygen Species Production in Leaves of Maize Plants. *Plant Physiology*, 2006, **141**: 475–487.
- You-Xiong, Q.; Jian-Wei, L.; Ji-Sen, Z.; Miao-Hong, R.; Li-Ping, X.; Mu-Qing, Z. Molecular cloning and characterisation of a non-TIR-NBS-LRR type disease resistance gene analogue from sugarcane. *Sugar Techenology*. 2008. vol 10. **1**:71-73
- Zhang, Q.; Zhang, Z.; Lin, S.Z.; Zheng, H.Q.; Lin, H.Y.; An, X.M.; Li, Y.; Li, H.X. Characterization of resistance gene analogs with a nucleotide binding site isolated from a triploid white poplar. *Plant Biology*, 2008. vol 10. **3**:310-322
- Zhao, S.; Qi, X. Signaling in Plant Disease Resistance and Symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008. **50 (7)**: 799–807

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização fenotípica por meio de métodos mais sensíveis como inoculação em discos foliares e aumento do número de repetições para que fossem suficientemente representativas, permitiram melhorar a eficiência da detecção de genótipos segregantes para a resistência a *H. vastatrix*. A possibilidade de comparação entre a fenotipagem e a genotipagem foi um fator que aumentou a segurança em determinar a resistência ou suscetibilidade dos genótipos da população de mapeamento. A população na geração F_2 foi prontamente eficiente em identificar a herança genética monogênica para a resistência à variante da raça II de *H. vastatrix*. A segregação de 3 genótipos resistentes para cada genótipo suscetível e a ancoragem dos marcadores no mesmo grupo de ligação comprovaram a hipótese de que apenas um gene controla o reconhecimento do fungo durante o processo de infecção. O uso de técnicas como BSAs para a seleção de marcadores na população aumentou a probabilidade da ligação destes ao gene de resistência. O mapa genético saturado com 25 marcadores AFLP foi altamente específico e objetivo em orientar a escolha dos marcadores a serem transformados em marcadores secundários. Por sua vez, os marcadores SCARs atingiram as metas estimadas, reduzindo significativamente as distâncias genéticas dos marcadores AFLP correspondentes. Isto deve-se principalmente pela alteração das sequências nos sítios de restrição enzimática nos genótipos segregantes.

Os marcadores SCAR seguiram rigorosamente o ordenamento inicial dos marcadores AFLP e foram eficientes na detecção dos clones BACs nesta mesma ordem. Isto somente foi possível porque os clones com dois marcadores permitiram a ligação em série, formado o *contig* dos clones BAC. Em consequência, o ordenamento dos clones BAC de <120 Kb com 4 marcadores cobrindo uma distancia genética de aproximadamente 4,7 cM e aproximadamente 360 kb, o que corresponde aproximadamente 0,14% do genoma de *C. arabica*.

Os resultados do presente estudo é o primeiro relato de marcadores de DNA associados com resistência completa para ferrugem do café que possuem dados complementares de isolamento de clones BAC. A identificação de clones contendo duplos marcadores que flanqueiam o gene é a fase inicial da etapa da clonagem do gene de resistência. O estudo também apresenta potencial aplicação por ser referência para a formulação de estratégias para resistência sistemática da doença e em programas de melhoramento podendo ser usados para seleção assistida por marcadores.

Apesar da análise de microsintenia apresentar alta similaridade entre *C. arabica* e *V. vinifera*, a macrosintenia não mostrou os mesmos resultados, pois o mesmo grupo de ligação em café encontra-se disperso entre vários cromossomos de vitis. O longo período de divergência genética depois da separação dos dois clados, complementado pelos nossos dados encontrados, demonstram que o gene se encontra em um loco com alta taxa de recombinação, o que pode ter influenciado na quebra de sintenia entre as duas espécies.

No estudo de expressão gênica pela comparação de genótipos compatíveis e incompatíveis durante o processo de infecção da variante da raça II de *H. vastatrix*, a técnica de cDNA-AFLP mostrou-se uma ferramenta robusta e eficiente em detectar TDFs diferencialmente expressos. A técnica tornou-se mais eficiente mediante o uso da estratégia de seleção dos TDFs específicos usando grupos de genótipos contrastantes. Isto aumentou a probabilidade de que os TDFs estivessem correlacionados com genes envolvidos nas respostas de resistência da planta. Por isso dois quintos dos TDFs encontrados, mostram alta homologia com genes relacionados a respostas de defesa ou sinalização. Outra terça parte, esteve indiretamente correlacionadas com respostas de resistência, sendo pela degradação de proteínas, indução de crescimento, ativação de metabolismos ou transcrição de genes.

Todos os genes que foram estudados quanto ao padrão de expressão apresentaram diferença significativa para o genótipo resistente e não significativa para o suscetível. Os TDFs similares a PR5 e NBS-LRR são os genes que mais se destacam e podem estar envolvidos diretamente na resistência a infecção de *H. vastatrix* em cafeeiros. A análise quantitativa e temporal mostrou que os genes de sinalização se expressaram com maior intensidade 24 h pós-inoculação, período apontado por autores que estudaram os processos de infecção, correspondente ao momento da penetração da hifa na cavidade substomática. Os genes de resposta de defesa aumentaram a expressão

em escala exponencial a partir de 12 h pós-inoculação e atingindo o maior nível de expressão em 72 h. O TDF77 Ca NBS-LRR é um potencial candidato gene de reconhecimento de patógenos, responsável por desencadear os processos de sinalização de resposta de resistência a raça específica, e o TDF44 Ca PR5 pode codificar para uma das principais proteínas relacionadas à patogênese e ser um dos principais responsáveis pela defesa do cafeeiro contra a infecção da variante da raça II de *H. vastatrix*.

A compreensão do sistema de resistência da planta tem sido obtida por aproximações genéticas bem estruturadas, mas até o momento isto não tem revelado a base dos mecanismos fisiológicos da ação destas proteínas. Este é o primeiro estudo que envolve a análise da expressão gênica da interação compatível entre cafeeiro-*H. vastatrix*. Poderá compor a base de informação para futuras pesquisas bioquímicas focalizadas na compreensão da interação do efetor e adaptador nos complexos processos de reconhecimento e sinalização.

O conhecimento da dinâmica das populações do patógeno e os fatores que determinam resistência ou suscetibilidade no hospedeiro facilitam o planejamento estratégico para o monitoramento e piramidação de genes. A resistência durável é o meio mais efetivo de controle de doenças, no entanto, é preciso identificar as fontes de resistência, caracterizar e transferi-los para cultivares elites. As informações geradas neste trabalho possuem relevante impacto na elaboração de estratégias que visam alcançar a resistência durável à ferrugem do cafeeiro usando a seleção assistida por marcadores moleculares. Também é base inicial para os estudos relacionados a identificação, estrutura e função dos genes que codificam para a resistência ao patógeno.