



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

VIVIANE YUMI BABA

**EFEITO DA FERRUGEM NA MODULAÇÃO DE GENES  
RELACIONADOS À ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM  
*COFFEA ARABICA* L.**

---

Londrina  
2014

VIVIANE YUMI BABA

**EFEITO DA FERRUGEM NA MODULAÇÃO DE GENES  
RELACIONADOS À ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM  
*COFFEA ARABICA L.***

Trabalho de Dissertação apresentado ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles.

Coorientador: Dr. Douglas Silva Domingues.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B112e Baba, Viviane Yumi.  
Efeito da ferrugem na modulação de genes relacionados à assimilação  
de nitrogênio em *Coffea arabica* L./ Viviane Yumi Baba – Londrina,  
2014.  
80 f.: il.

Orientador: Luzia Doretto Paccola-Meirelles.  
Coorientador: Douglas Silva Domingues  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Café – Doenças e pragas – Teses. 2. Hemileia vastatrix – Teses. 3.  
Fungos-da-ferrugem – Teses. 4. Nitrogênio na agricultura – Teses. I.  
Paccola-Meirelles, Luzia Doretto. II. Domingues, Douglas Silva. III.  
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias.  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 633.73

VIVIANE YUMI BABA

**EFEITO DA FERRUGEM NA MODULAÇÃO DE GENES  
RELACIONADOS À ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *COFFEA*  
*ARABICA* L.**

Trabalho de Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora. Prof<sup>a</sup> Dra Luzia D. Paccola-  
Meirelles  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr. Douglas Silva Domingues  
Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR

---

Prof. Dr. Maria Isabel Balbi Peña  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Francismar Corrêa Marcelino-  
Guimarães  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
– Embrapa

Londrina, 20 de fevereiro de 2014.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à orientadora Prof<sup>a</sup> Luzia D. Paccola-Meirelles, não só pelo apoio, confiança, mas sobretudo pela amizade e dedicação de mãe.

Ao coorientador Dr. Douglas S. Domingues pela constante orientação neste trabalho, apoio e dedicação.

Ao Dr. Luiz Filipe P. Pereira, Dr. Eduardo Fermino Carlos, Dr. Juarez Pires Tomaz por toda colaboração no trabalho.

À todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia (LBI) do IAPAR por todo carinho e amizade, principalmente à equipe nutrioma café: Tiago e João. À Kenia por todos os ensinamentos. À Juliana Carbonieri pela colaboração no trabalho.

Às técnicas de laboratório: Suely, Lucinéia e Cícera e aos técnicos de campo: Sr. Arlindo e Pedro por todo auxílio.

Gostaria de agradecer também à Dra. Mirian P. Maluf, Dra. Lilian Padilha, Dr. Oliveiro Guerreiro Filho, e em especial à Masako T. Braghini que contribuíram para realização desse trabalho e a todos do Instituto Agrônomo de Campinas/ Centro de Café Alcides Carvalho que me receberam e me apoiaram.

Ao Laboratório de BioCafé/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, em especial à Dra. Eunize Zambolim, Dra. Eveline T. Caixeta e ao Dr. Alexandre Capucho.

À minha família querida: pais, irmãs, cunhado e principalmente meu filho Victor Hugo por todo amor, apoio, confiança e paciência.

Ao namorado Thiago de Oliveira pela paciência, carinho e dedicação.

À todos os amigos que me apoiaram durante minha caminhada, como Luciana Costa, Mayara Murata, Andrey Cordeiro, Wagner Igarashi, Amanda Miller e Luciana Shigueoka.

À Deus.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, todos os alunos, professores, coordenadores e à secretária Weda.

Ao Instituto Agronômico do Paraná pela estrutura física e ao LBI pela oportunidade de colaboração com o projeto, aprendizado, amizades realizadas e crescimento não só profissional como pessoal.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Ao Consórcio Pesquisa Café e Fundação Araucária pelo apoio financeiro neste projeto.

BABA, V.Y. **Efeito da ferrugem na modulação de genes relacionados à assimilação de nitrogênio em *Coffea arabica* L.** 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

A ocorrência de doenças no cafeeiro é um problema na maioria das regiões de cultivo, afetando desde a produtividade até a qualidade final da bebida. A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é considerada a principal doença em *Coffea arabica*. Sua severidade pode ser influenciado pela nutrição das plantas, no qual o nitrogênio (N) é o principal nutriente mineral. Entretanto, poucos estudos moleculares relacionam o estado nutricional de cafeeiro e a resposta de defesa a patógenos. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a resposta transcricional de genes relacionados na assimilação de N em função da restrição deste nutriente e da resposta à ferrugem do cafeeiro. Foram utilizadas plantas de *C. arabica* cv. IAPAR 59 (resistente) e Catuaí Vermelho IAC 99 (suscetível) cultivadas em condição de nutrição completa e deficiência de N, por um período de 42 dias. Folhas jovens foram inoculadas com esporos de *H. vastatrix* raça II e coletadas em 0, 12, 24 e 48 horas pós-inoculação. Os níveis de RNAm dos genes que codificam as enzimas glutamina sintetase citosólica ( $CaGS_1$ ), glutamina sintetase plastidial ( $CaGS_2$ ), nitrato redutase ( $CaNR$ ) e asparagina sintetase ( $CaAS$ ) foram estimados por qPCR. Fatores genotípicos e nutricionais influenciaram na modulação de genes relacionados ao metabolismo de N com o efeito da ferrugem, onde o gene  $CaNR$  apresentou maior nível transcricional em plantas em condições de suficiência e de supressão de N. A ferrugem influenciou a expressão de genes, especialmente em condições de supressão de N para o genótipo suscetível. No entanto, a expressão de genes no genótipo resistente foi superior em relação ao suscetível em ambas as condições nutricionais, exceto para o gene  $CaAS$  em supressão de N. Os níveis de RNAm dos genes  $CaGS_1$  e  $CaGS_2$  e a atividade *in vitro* de GS mostraram padrões semelhantes nos diferentes genótipos e regimes nutricionais. Porém, a atividade de GS diminuiu com a supressão de fontes de N, ao contrário dos níveis transcricionais desses genes, que apresentaram elevação. As concentrações de clorofila total, *a* e *b*, apresentaram redução com a deficiência de N e apresentaram diferenças na presença do patógeno. Este trabalho contribui para a compreensão de respostas fisiológicas e moleculares na interação nutrição mineral em resposta à ferrugem do cafeeiro em diferentes genótipos.

**Palavras-chave:** Deficiência de nitrogênio. Estresse biótico. *Hemileia vastatrix*. Nutrição mineral. qPCR. Resposta genotípica.

BABA, V.Y. **Effect of coffee leaf rust in the modulation of genes related to nitrogen assimilation in *Coffea arabica* L.** 2014. 80 p. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

The occurrence of coffee diseases is a problem in most cultivated regions, affecting from productivity to cup quality. Coffee leaf rust, caused by *Hemileia vastatrix*, is considered the main disease in *Coffea arabica*. The degree of infection can be influenced by plant nutrition, where the nitrogen (N) is the major nutrient. However, few molecular studies depict the relation between mineral nutrition and defense responses in coffee plants. The aim of this study was to evaluate the transcriptional profile of key genes in N assimilation, according to the restriction of N sources and in response to coffee leaf rust. *C. arabica* plants cv. IAPAR 59 (resistant) and Catuaí Vermelho IAC 99 (susceptible) were maintained with standard N supply and N suppression for 42 days. Young leaves were inoculated with *H. vastatrix* spores race II and collected at 0, 12, 24 and 48 hours post-inoculation. The transcript levels of cytosolic ( $CaGS_1$ ) and plastidial ( $CaGS_2$ ) glutamine synthetase, nitrate reductase ( $CaNR$ ) and asparagine synthetase ( $CaAS$ ) genes were evaluated by qPCR. The results suggest that genotype and nutritional status influenced the modulation of genes related to N metabolism according to the effect of coffee rust, where  $CaNR$  showed higher transcriptional levels in N supply and in N starvation. Rust influenced gene expression, specially in N starvation for the susceptible genotype. However, gene expression on the resistant genotype was higher in relation to susceptible in both nutritional conditions, except for  $CaAS$  in N starvation. The RNAm levels of  $CaGS_1$  and  $CaGS_2$  and *in vitro* activity of GS displayed similar patterns in each genotype and nutritional status. However, the GS activity decreased in N starvation, while the transcriptional levels of the genes increased. The concentration of total, *a* and *b* chlorophyll decreased with N deficiency and exhibited differences in the presence of the pathogen. This work contributes to improve knowledge for studies approaching physiological and molecular interaction on mineral nutrition and defense to coffee leaf rust in different genotypes.

**Key- words:** Biotic stress. Genotypic response. *Hemileia vastatrix*. Mineral nutrition. Nitrogen starvation. qPCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Evolução do alotetraplóide *Coffea arabica*. A- Origem de *C. arabica* pelos progenitores diplóides *C. canephora* e *C. eugenioides*. B- Origem genética de cultivares de *C. arabica*, como por exemplo, os genótipos Mundo Novo e Catuaí .....19
- Figura 2** – Índice de esporulação para a avaliação da resistência de cafeeiros a *Hemileia vastatrix*. Nota 1: ausência de sintomas; nota 2: lesões cloróticas pequenas; nota 3: lesões cloróticas grandes; nota 4: lesões cloróticas grandes com pequena esporulação, ocupando menos de 25% da área da lesão com uredosporos; nota 5: lesões com esporulação ocupando de 25 a 50% da área clorótica e nota 6: lesões com esporulação ocupando mais de 50% de sua área .....22
- Figura 3** – Uredósporos de *Hemileia vastatrix* com zona equinulada e outra lisa (A) e em forma de soro ou bouquet na superfície de um estômato (B) .....23
- Figura 4** – Ciclo da ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix* .....25
- Figura 5** – Representação esquemática da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitrato; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: amônio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; RN: redutase do nitrato; RNi: redutase do nitrito; GS: sintetase da glutamina; GOGAT: sintetase do glutamato; T: transportador .....28
- Figura 6** – Diagrama do número de plantas de cafeeiro utilizadas no experimento de acordo com o regime nutricional diferencial, a cultivar e a inoculação .....34
- Figura 7** – Representação esquemática do experimento ferrugem X nutrição .....36
- Figura 8** – Regimes nutricionais diferenciados para indução de deficiência de N em plantas de café dos genótipos Catuaí Vermelho IAC 99 (A) e IAPAR 59 (B). Etiquetas amarelas referem se as plantas com regime de supressão de fontes de N e etiquetas roxas referem se as plantas em condições de suficiência de fontes de N .....41

- Figura 9** – Confirmação da infecção de *Hemileia vastatrix* por inoculação em folhas do genótipo suscetível de cafeeiro (Catuaí Vermelho IAC 99) do experimento ferrugem X nutrição (A e B) .....42
- Figura 10** – Reação de hipersensibilidade com pequenas manchas cloróticas associadas com tumefações puntiformes nos locais de penetração em folhas do genótipo resistente de cafeeiro (IAPAR 59) na superfície adaxial (A) e abaxial (B) do experimento ferrugem X nutrição .....42
- Figura 11** – PCR em gel de agarose 2% dos genes *CaGAPDH*, *CaGS<sub>1</sub>*, *CaGS<sub>2</sub>*, *CaNR* e *CaAS* em tecidos de folhas de *Coffea arabica*. MM- marcador molecular; 1- *CaGAPDH*; 2- *CaGS<sub>1</sub>*; 3- *CaGS<sub>2</sub>*; 4-*CaNR*; 5- *CaAS*; 6- Controle negativo de *CaGAPDH*; 7- Controle negativo de *CaGS<sub>1</sub>*; 8- Controle negativo de *CaGS<sub>2</sub>*; 9- Controle negativo de *CaNR* e 10- Controle negativo de *CaAS* .....43
- Figura 12** – Expressão relativa dos genes glutamina sintetase citosólica (*CaGS<sub>1</sub>*) (A e B), plastidial (*CaGS<sub>2</sub>*) (C e D), nitrato redutase (*CaNR*) (E e F) e asparagina sintetase (*CaAS*) (G e H) nos genótipos resistente (IAPAR 59) (A, C, E e G) e suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (B, D, F e H) à ferrugem em condições de nutrição completa com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. O tempo 0h foi utilizado como calibrador. Médias seguidas da mesma letra maiúscula, comparam o mesmo genótipo no mesmo tempo, não diferem significativamente pelo teste de LSD ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas da mesma letra minúscula, comparam o genótipo em relação ao tempo 0h, não diferem significativamente pelo teste de LSD ( $p < 0,05$ ) .....47
- Figura 13** – Expressão relativa dos genes glutamina sintetase citosólica (*CaGS<sub>1</sub>*) (A e B), plastidial (*CaGS<sub>2</sub>*) (C e D), nitrato redutase (*CaNR*) (E e F) e asparagina sintetase (*CaAS*) (G e H) nos genótipos resistente (IAPAR 59) (A, C, E e G) e suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (B, D, F e H) à ferrugem em condições de deficiência de N com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. O tempo 0h foi utilizado como calibrador.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, comparam o mesmo genótipo no mesmo tempo, não diferem significativamente pelo teste de LSD ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas da mesma letra minúscula, comparam o genótipo em relação ao tempo 0h, não diferem significativamente pelo teste de LSD ( $p < 0,05$ ) .....51

**Figura 14** – Atividade *in vitro* de glutamina sintetase em folhas de cafeeiro dos genótipos suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) e resistente (IAPAR 59) à ferrugem em condições de nutrição completa (A e B) e deficiência de N (C e D) com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. As barras verticais indicam os valores apresentados pela média  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ) de glutamina sintetase para cada tempo pós-inoculação e genótipo. Os dados marcados com \* apresentam diferença estatística pelo teste de LSD com  $p < 0,05$  .....53

**Figura 15** – Concentração de clorofila total, *a* e *b* em folhas de cafeeiro dos genótipos suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (A, C e E) e resistente (IAPAR 59) (B, D, e F) à ferrugem em condições de nutrição completa com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. As barras verticais indicam os valores apresentados pela média  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ) de clorofila total, *a* e *b* para cada genótipo e tempo pós-inoculação. Os dados marcados com \* apresentam diferença estatística pelo teste de LSD com  $p < 0,05$  .....56

**Figura 16** – Concentração de clorofila total, *a* e *b* em folhas de cafeeiro dos genótipos suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (A, C e E) e resistente (IAPAR 59) (B, D, e F) à ferrugem em condições de nutrição completa com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. As barras verticais indicam os valores apresentados pela média  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ ) de clorofila total, *a* e *b* para cada genótipo e tempo pós-inoculação. Os dados marcados com \* apresentam diferença estatística pelo teste de LSD com  $p < 0,05$  .....58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Soluções nutritivas, adaptadas de Clark (1975) utilizadas no experimento em plantas de café .....	33
<b>Tabela 2</b> – Descrição de genes e sequência de primers desenhados para qPCR.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
AS	Aparagina sintetase
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Valor de expressão
cDNA	DNA complementar
CHS	Chalcona sintetase
CIFC	Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Cq	Do inglês, <i>Quantification cycles</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DEPC	Dietil policarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Enzima desoxirribonuclease
EST	Do inglês, <i>Express Sequence Tags</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintase
GOGAT-Fd	Glutamato sintase dependente da ferredoxina
GOGAT-NADH	Glutamato sintase dependente de NADH
GS	Glutamina sintetase
GS1	Glutamina sintetase citosólica
GS2	Glutamina sintetase plastidial
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico
HMC	Célula-mãe haustorial
HR	Reação de hipersensibilidade
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
LSD	Do inglês, <i>Least significant difference</i>
MIQE	Do inglês, <i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>

N	Nitrogênio
NCBI	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>NDR1</i>	Do inglês, <i>Non-race specific Disease Resistance 1</i>
$\text{NH}_4^+$	Amônio
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Nitrato de amônio
NO	Óxido nítrico
$\text{NO}_2^-$	Nitrito
$\text{NO}_3^-$	Nitrato
NR	Nitrato redutase
NRi	Nitrito redutase
<i>p</i>	P valor
PAL	Fenilalanina amônia liase
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PR-proteins	Do inglês, <i>Pathogenesis-related proteins</i>
qPCR	PCR quantitativo em Tempo Real
RE	Taxa de expressão relativa
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
Rubisco	Ribulose bisfosfato carboxilase
SAG	Do inglês, <i>Senescence Associated Gene</i>
SH <sub>1</sub> -SH <sub>9</sub>	Genes de resistência
v1-v9	Genes de virulência
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1	ASPECTOS ECONÔMICOS DO CAFÉ NO BRASIL .....	17
2.2	COFFEA ARABICA .....	18
2.2.1	<i>Coffea Arabica</i> cv. IAPAR 59- Origem e Características .....	19
2.2.2	<i>Coffea Arabica</i> cv. Catuaí Vermelho- Origem e Características .....	20
2.3	FERRUGEM DO CAFEIEIRO .....	20
2.3.1	Histórico da Doença .....	20
2.3.2	Sintomas da Ferrugem do Cafeeiro .....	21
2.3.3	<i>Hemileia Vastatrix</i> .....	22
2.3.4	Ciclo da Ferrugem do Cafeeiro .....	24
2.3.5	Controle da Ferrugem do Cafeeiro .....	25
2.4	ESTUDOS TRANSCRICIONAIS NA INTERAÇÃO FERRUGEM X CAFEIEIRO .....	26
2.5	ASSIMILAÇÃO DE N .....	27
2.6	ESTUDOS NA INTERAÇÃO NUTRIÇÃO X DOENÇAS .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	MATERIAL VEGETAL .....	33
3.2	INDUÇÃO DE PADRÃO NUTRICIONAL DIFERENCIAL .....	34
3.3	INOCULAÇÃO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO .....	35
3.4	IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE N .....	36
3.5	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA .....	37
3.6	DESENHO DE PRIMERS E EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO .....	37
3.7	qPCR E ANÁLISE DE DADOS .....	39
3.8	ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	39
3.8.1	Atividade <i>in Vitro</i> de Glutamina Sintetase .....	39
3.8.2	Concentração de Clorofila Total .....	40
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
4.1	INDUÇÃO DE PADRÃO NUTRICIONAL DIFERENCIAL .....	41

4.2	INOCULAÇÃO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO.....	41
4.3	EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E ESPECIFICIDADE DE AMPLIFICAÇÃO .....	43
4.4	ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NA ASSIMILAÇÃO DE N .....	43
4.4.1	Condições de Suficiência de Fontes de N .....	44
4.4.2	Condições de Supressão de Fontes de N .....	45
4.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	52
4.5.1	Atividade <i>in Vitro</i> de Glutamina Sintetase.....	52
4.5.2	Concentração de Clorofila Total .....	54
4.5.2.1	Condições de suficiência de fontes de N.....	54
4.5.2.2	Condições de supressão de fontes de N .....	57
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO A –MIQE (<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real- Time PCR Experiments</i>) .....</b>	<b>71</b>
	<b>ANEXO B –Dados de C<sub>q</sub> avaliados por qPCR de genes relacionados na assimilação de N com o efeito da ferrugem em dois genótipos com regimes nutricionais diferenciados.....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO C –Atividade <i>in vitro</i> de Glutamina Sintetase .....</b>	<b>78</b>
	<b>ANEXO D –Concentração de Clorofila Total em Condições de Suficiência de N.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO E –Concentração de Clorofila Total em Condições de Supressão de N.....</b>	<b>80</b>

## INTRODUÇÃO

O cultivo de cafeeiro no Brasil apresenta grande importância para economia nacional, já que o país é o maior produtor e exportador mundial de café. *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as duas espécies de interesse no agronegócio café, constituindo respectivamente 75,1% e 24,9% da produção total do país (CONAB, 2014). Na safra 2013, a produção total de café beneficiado no Brasil foi de 49,15 milhões de sacas, o que representa a maior safra de ciclo de baixa bialidade já produzida no país (CONAB, 2014).

Dentre os principais fatores responsáveis por interferir na eficiência do processo produtivo do cafeeiro estão a incidência de pragas e doenças, as deficiências nutricionais, o manejo inadequado das plantas (GARCIA et al., 2003), além de estresses ambientais, como o hídrico e térmico (CARVALHO et al., 2013).

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* (Berk. & Br. 1869), é considerada a principal doença em *C. arabica* e pode causar perdas devido à queda foliar prematura e à seca dos ramos plagiotrópicos, resultando em uma redução da eficiência fotossintética e perda de vigor das plantas (GUZZO et al., 2009). A ocorrência da ferrugem é influenciada por fatores relacionados ao genótipo do cafeeiro, às raças do patógeno e ao ambiente.

A nutrição mineral inadequada é um dos fatores que mais comprometem a produtividade, pois aumenta a debilidade do cafeeiro, favorecendo a ocorrência de doenças. Alguns trabalhos têm demonstrado que a severidade de infecção do cafeeiro causado pela ferrugem está relacionada com seu nível de produção e de nutrição (ZAMBOLIM et al., 1992; CARVALHO et al., 2001).

O nitrogênio (N) tem um papel essencial para as plantas, podendo ser um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Dois processos são de grande importância na aquisição de N: a absorção, que está relacionada diretamente com a captura do N disponível no solo; e a assimilação, que diz respeito a sua utilização fisiológica. O N absorvido é assimilado em aminoácidos e, no caso do cafeeiro, será utilizado durante a formação e enchimento de grãos. Na fase de assimilação de N, as enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) são consideradas enzimas-chave (WICKERT et al., 2007).

Até o momento, poucos estudos avaliaram a resposta de genes relacionados à assimilação de nutrientes minerais e a defesa frente a patógenos,

especialmente em culturas tropicais perenes. Em alguns patossistemas, já foi demonstrado que genes relacionados ao metabolismo de N têm sua atividade transcricional alterada, como no caso da interação antracnose X feijão (TAVERNIER et al., 2007), na interação carvão X milho (HORST et al., 2010) e pimenta X *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (HWANG et al., 2011). No caso de ataque de patógenos em fumo, além da avaliação de genes relacionados ao metabolismo de N, já foi observado que a fonte de N pode também influenciar na severidade de doenças (PAGEAU et al., 2006; GUPTA et al., 2013).

Estudos de respostas moleculares na interação ferrugem X cafeeiro usualmente estão voltados para análises de larga escala (FERNANDEZ et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2012) ou em busca de genes candidatos à fonte de resistência derivados desta análise. Muitos destes estudos consideram estágios iniciais de infecção do patógeno em reações compatíveis e incompatíveis (GANESH et al., 2006; RAMIRO et al., 2009; DIOLA et al., 2013).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar transcionalmente genes relacionados à assimilação de N em condições de suficiência e de supressão desse nutriente em folhas infectadas com *H. vastatrix* raça II de duas cultivares de cafeeiro com respostas distintas de resistência ao fungo. Foram avaliados respostas transcricionais dos genes glutamina sintetase citosólica (*CaGS<sub>1</sub>*), glutamina sintetase plastidial (*CaGS<sub>2</sub>*), nitrato redutase (*CaNR*) e asparagina sintetase (*CaAS*), além da quantificação *in vitro* de glutamina sintetase e a concentração de clorofila total. Em cafeeiro, este é o primeiro estudo que relaciona respostas moleculares de genes envolvidos na assimilação de N com o efeito da ferrugem, principal doença fúngica que acomete campos de produção.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS ECONÔMICOS DO CAFÉ NO BRASIL

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo consumidor global do produto, atrás apenas dos EUA. No período compreendido entre Novembro/2011 e Outubro/2012, o país consumiu 20,33 milhões de sacas, com aumento em relação ao período anterior correspondente. O consumo da bebida de café foi de aproximadamente 83 litros para cada brasileiro no ano (ABIC, 2012).

Segundo CONAB (2014), a primeira estimativa para a produção total da safra cafeeira em 2014 indica que o país deverá colher entre 46,53 e 50,15 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado. O resultado representa, desde uma redução de 5,4%, a um crescimento de 2,0%, quando comparado com a produção de 49,15 milhões de sacas obtidas no ciclo anterior. Para a nova safra que é de ciclo de alta bienalidade, estima-se que sejam colhidas entre 35,07 e 37,53 milhões sacas de *C. arabica*. Com este resultado, quebra-se a tendência de crescimento da produção que, desde a safra 2005, vinha se observando nos ciclos de alta bienalidade, inclusive ficando abaixo da última safra que foi de baixa. Isso se deve principalmente à redução da área em produção, aliado ao menor investimento nas lavouras (CONAB, 2014).

A área total plantada no país totaliza 2.282,62 mil hectares. Em Minas Gerais está concentrada a maior área cultivada, com 1.238,27 mil hectares. Nesta região, predomina o cultivo de *C. arabica*, que constitui 98,87% da produção (CONAB, 2014). Já o estado Espírito Santo é o maior produtor nacional de *C. canephora* cv. Conilon e apresenta a segunda maior área plantada da cultura, totalizando 489,80 mil hectares, sendo 310,42 mil hectares com a cultivar Conilon (CONAB, 2014).

No Paraná, quinto produtor nacional, a produção para a safra de 2013, apenas com *C. arabica*, foi de 1,65 milhão de sacas beneficiadas. A produção para 2014 que tinha um potencial para 1,54 milhão de sacas de 60 kg (CONAB, 2013), apresenta redução de 61%, se comparada à obtida na safra anterior, sendo a diminuição da área e as geadas os principais fatores (CONAB, 2014).

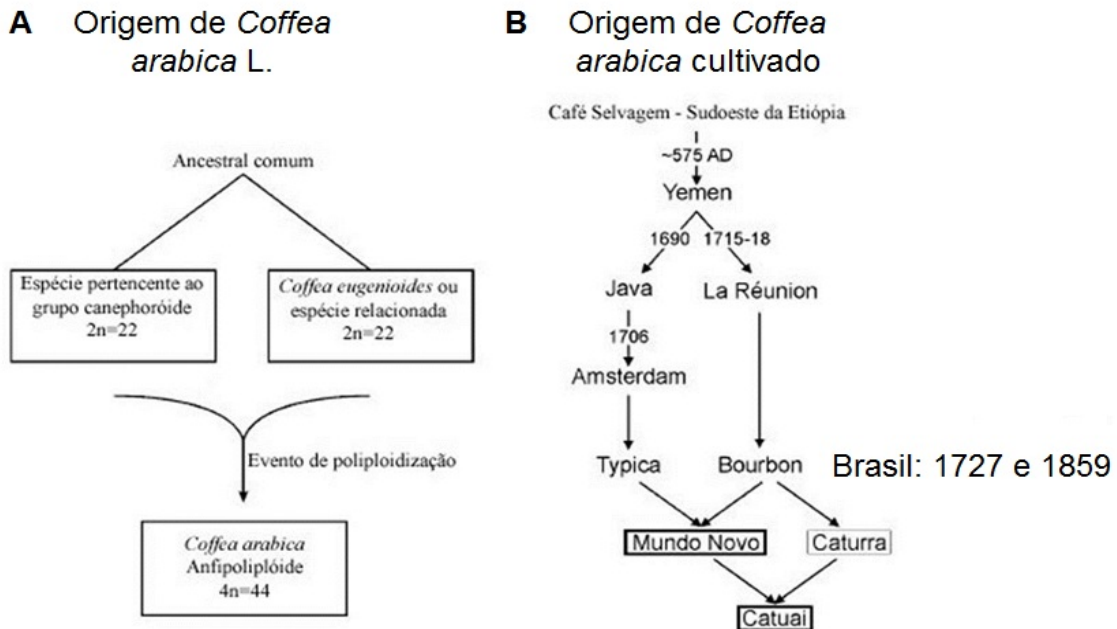
## 2.2 COFFEA ARABICA

O café arábica (*Coffea arabica* L.), família Rubiaceae, é nativo do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia. Nessas regiões, de elevadas altitudes, compõe a variabilidade natural como reservatório genético da espécie (CARVALHO, 2008).

*C. arabica* é um alotetraplóide com  $2n = 4x = 44$  cromossomos somáticos, originário da hibridização natural evolutivamente recente entre duas espécies ancestrais diplóides, no qual 22 cromossomos vieram de *C. eugenioides*, uma espécie silvestre de café, e os outros 22 provavelmente de *C. canephora* (CARVALHO, 2008) (Figura 1A). *C. arabica* é autocompatível, com 90% ou mais de seus grãos formados por autopolinização e o restante oriundos de polinização cruzada (CARVALHO, 2008).

Entre as cultivares de *C. arabica*, dois grupos podem ser identificados: linhagens não introgridas cultivadas, chamadas de “arábicas puros” (Typica e Tipos Bourbon), e as variedades introgridas com características de resistência a doenças e rusticidade, obtidas principalmente a partir de genótipos de Híbridos de Timor (LEROY et al., 2006). Como consequência dessa autogamia e história evolutiva, *C. arabica* apresenta uma estreita base genética. Os principais genótipos cultivados (Mundo Novo, Catuaí e Caturra) no mundo, foram selecionados a partir de apenas duas populações: Typica e Bourbon (Figura 1B).

**Figura 1** – Evolução do alotetraplóide *Coffea arabica*. A- Origem de *C. arabica* pelos progenitores diplóides *C. canephora* e *C. eugenioides*. B- Origem genética de cultivares de *C. arabica*, como por exemplo, os genótipos Mundo Novo e Catuai



**Fonte:** Retirado de VIDAL et al., 2010 e baseado em ANTHONY et al., 2002.

### 2.2.1 *Coffea Arabica* cv. IAPAR 59 - Origem e Características

A cultivar IAPAR 59 originou-se do cruzamento entre a cultivar Villa Sarchi CIFC 971/10 e o Híbrido de Timor CIFC 832/2 realizado no Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal (CARVALHO, 2008). Em ensaios conduzidos no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a progênie da geração F<sub>4</sub> deu origem a cultivar IAPAR 59 (CARVALHO, 2008). Apresenta porte baixo e frutos vermelhos com maturação medianamente precoce, boa qualidade da bebida e alta produtividade. Além disso, *C. arabica* cv. IAPAR 59 possui resistência duradoura à ferrugem do cafeeiro há mais de 30 anos (CARVALHO, 2008).

A resistência de plantas de café à ferrugem é condicionada por pelo menos nove fatores (genes) dominantes principais (SH<sub>1</sub>-SH<sub>9</sub>) isoladamente ou em associação, o que pode ser suplantado, no todo ou em parte, pelos genes de virulência do patógeno (v<sub>1</sub>-v<sub>9</sub>) (RODRIGUES et al., 1975; BETTENCOURT; RODRIGUES, 1988). No patossistema café X ferrugem, até o momento, cerca de 45 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram identificadas em diferentes países produtores de café (VÁRZEA; MARQUES, 2005), das quais 15 raças patogênicas de *H.*

*vastatrix* foram descritas no Brasil (DIOLA et al., 2011). Dentre essas, a raça II, que possui o gene de virulência v5, é a mais amplamente distribuída nos campos comerciais (ZAMBOLIM et al., 2005).

### 2.2.2 Coffea Arabica cv. Catuaí Vermelho – Origem e Características

A cultivar Catuaí Vermelho é o produto da recombinação de um cruzamento artificial entre cafeeiros selecionados pela produtividade, das cultivares de *C. arabica* Caturra Amarelo IAC 476-11 e Mundo Novo IAC 374-19, realizado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, SP (CARVALHO, 2008). Apresenta porte baixo e frutos vermelhos, possuem elevado vigor, boa qualidade da bebida e alta produtividade, porém é suscetível à ferrugem e aos nematóides (CARVALHO, 2008).

## 2.3 FERRUGEM DO CAFEIEIRO

A ferrugem do cafeeiro é considerada a principal doença desta cultura, ocasionando decréscimos de produção que podem variar de 30% a 50% dependendo da medida de controle tomada (ZAMBOLIM et al. 2002), causando prejuízos anuais em torno de US\$ 1 a 2 bilhões (KUSHALAPPA; ESKEES, 1989a). Essa variação é decorrente da suscetibilidade da cultivar, das raças do patógeno, da altitude, da temperatura, do regime de chuvas, do estado nutricional planta e da carga pendente de frutos do cafeeiro.

### 2.3.1 Histórico da Doença

A ferrugem do cafeeiro foi relatada pela primeira vez no Quênia em 1861 (RODRIGUES et al., 1975). Em 1869, já havia chegado ao Sri Lanka, e na década de 1920 foi amplamente encontrada em grande parte da África e Ásia. Nas últimas décadas do século XIX, a ferrugem do cafeeiro causou danos graves para os cafezais do Sul da Ásia, o que levou ao colapso da indústria do café. Na América do Sul, a doença foi constatada pela primeira vez no Brasil em 1970, no estado da Bahia (WALLER, 1985). No ano seguinte, foi constatada em São Paulo e no Paraná,

chegando rapidamente às demais lavouras de café do país, devido à disseminação a longa distância pelo vento (SILVA et al., 2002).

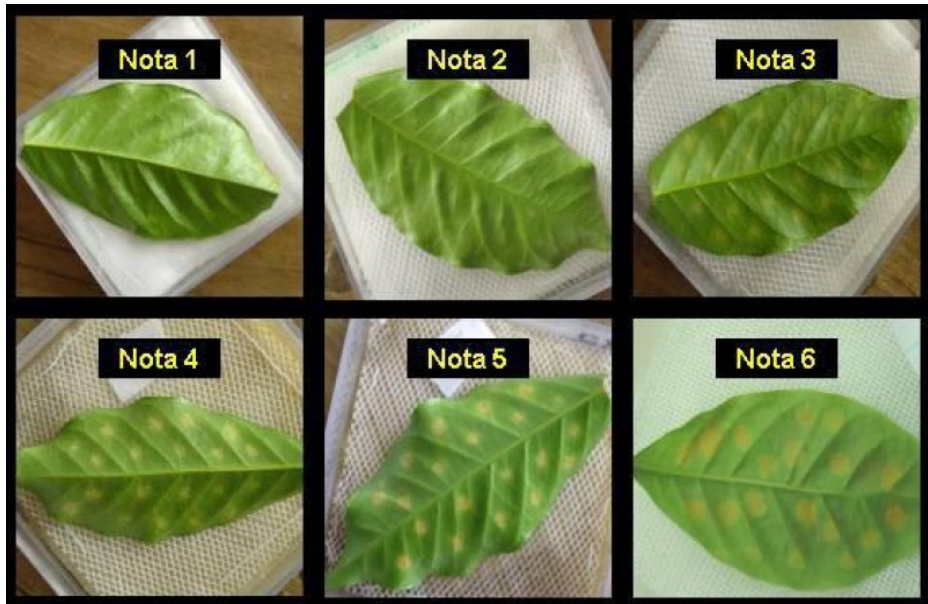
### 2.3.2 Sintomas da Ferrugem do Cafeeiro

A ferrugem do cafeeiro é uma doença foliar e os sintomas podem ser observados na face abaxial do limbo. Inicialmente causa manchas cloróticas translúcidas com 1-3 cm de diâmetro. Em poucos dias, as manchas se desenvolvem, atingindo 1 cm ou mais, onde percebem-se pústulas alaranjadas formadas por uredósporos. Na superfície adaxial das folhas infectadas, observa-se uma área que se torna clorótica e com o passar do tempo necrótica, formado pelos limites dos uredósporos na face abaxial (KUSHALAPPA;ESKES, 1989b).

Nos campos, o sintoma mais notável é a desfolha das plantas, o que prejudica o desenvolvimento das plantas jovens, causando definhamento, o que compromete a produção. A desfolha antes do florescimento interfere no desenvolvimento dos botões florais e na frutificação. Durante o desenvolvimento dos frutos, leva à formação de grãos anormais, defeituosos, e frutos com lojas vazias, afetando sensivelmente a produção (GODOY et al., 1997).

Os índices de esporulação são ilustrados pela escala de Tamayo (1988) (Figura 2). Nesta escala, as notas 1, 2 e 3 correspondem à reação de resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*, e as notas 4, 5 e 6, a reações de susceptibilidade.

**Figura 2** – Índice de esporulação para a avaliação da resistência de cafeeiros a *Hemileia vastatrix*. Nota 1: ausência de sintomas; nota 2: lesões cloróticas pequenas; nota 3: lesões cloróticas grandes; nota 4: lesões cloróticas grandes com pequena esporulação, ocupando menos de 25% da área da lesão com uredósporos; nota 5: lesões com esporulação ocupando de 25 a 50% da área clorótica e nota 6: lesões com esporulação ocupando mais de 50% de sua área



Fonte: TAMAYO (1988).

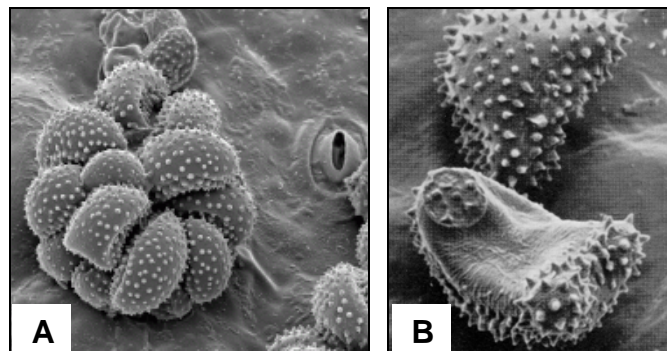
### 2.3.3 Hemileia Vastatrix

O fungo *H. vastatrix* é considerado um patógeno obrigatório por estabelecer uma interação biotrófica com o cafeeiro, ou seja, são parasitas que dependem dos tecidos vivos da planta hospedeira para o seu crescimento, reprodução e formação de estruturas especializadas (AZINHEIRA et al., 2010).

Em condições favoráveis ao patógeno, o processo de infecção envolve eventos específicos incluindo a formação de apressórios sobre estômatos e a penetração da cavidade subestomática por uma hifa de penetração que desenvolve dois ramos laterais semelhantes a uma âncora (DINIZ et al., 2012). Cada ramo lateral da âncora forma a célula-mãe haustorial (HMC), e as células subsidiárias são invadidas por haustórios, responsáveis pela absorção de nutrientes a partir de tecidos vivos do hospedeiro e pela troca de sinalizações entre o hospedeiro e o patógeno (VIEIRA et al., 2012). Estes autores relatam que os haustórios têm sido documentados como estruturas fundamentais no estabelecimento e manutenção da interação biotrófica. Esta fase ocorre

normalmente dois a três dias após a inoculação (RIJO; RODRIGUES, 1978). Além disso, a colonização inter e intracelular do mesófilo leva à formação de soros contendo uredósporos, em forma de bouquet, que são formados através dos estômatos, devido à grande densidade micelial junto à área de penetração em genótipos suscetíveis (Figura 3A) (RODRIGUES et al. 1975; SILVA et al. 1999). O patógeno produz uredósporos de morfologia característica, com um lado ventral liso e o lado dorsal convexo e provido de espinhos conhecido como zona equinulada (Figura 3B).

**Figura 3** – Uredósporos de *Hemileia vastatrix* com zona equinulada e outra lisa (A) e em forma de soro ou bouquet na superfície de um estômato (B)



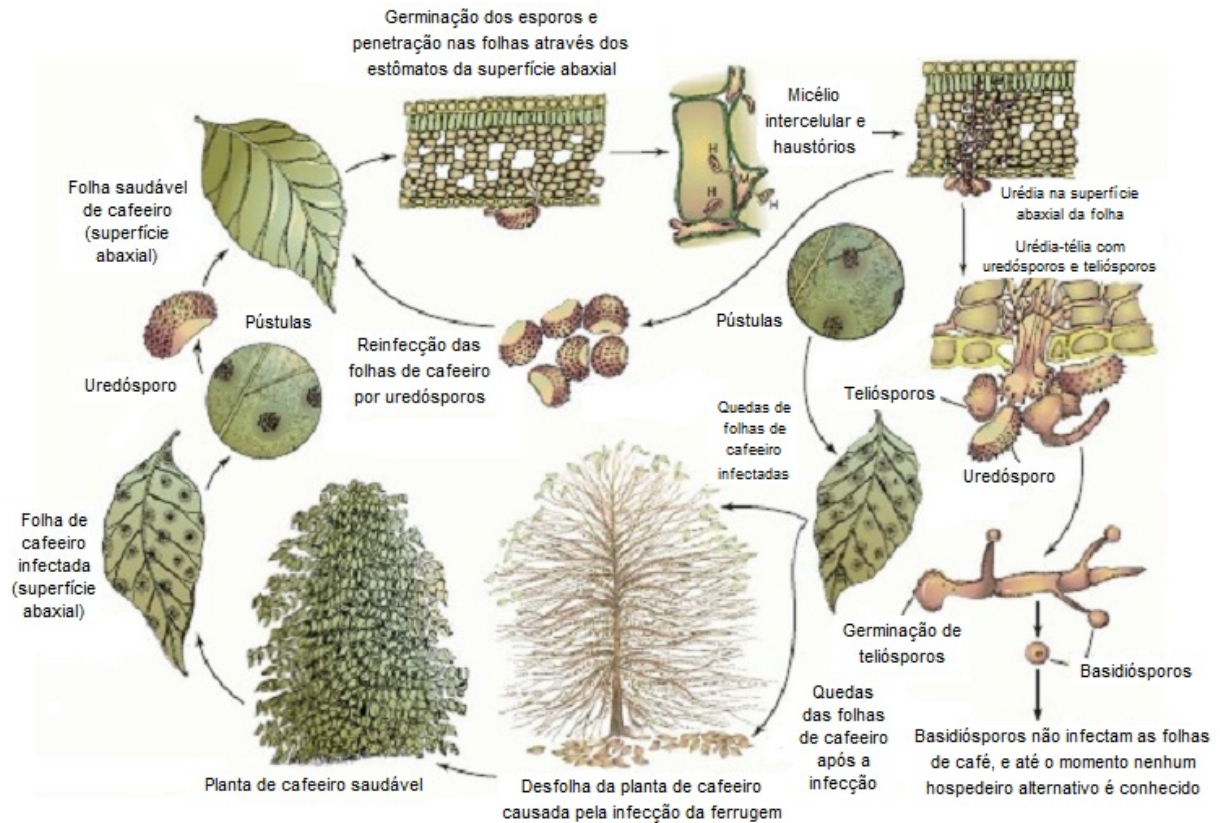
Fonte: RIJO et al., 1990.

Estudos celulares têm mostrado que, em genótipos de café com interações incompatíveis com *H. vastatrix*, ocorre uma rápida morte celular das células guardas e subsidiárias da planta onde o fungo penetrou, conhecida como reação de hipersensibilidade (HR), associada com a restrição da proliferação do agente patogênico a partir do local da infecção (DELLEDONNE et al., 2001). Segundo Silva et al. (2008), observações das células de folhas de cafeeiro nas quais a HR foi induzida, revelou ruptura de membranas, alteração no aspecto dos cloroplastos e do núcleo e coagulação do citoplasma. Em genótipos resistentes, o crescimento do fungo é reduzido, podendo cessar em diferentes fases de infecção, como por exemplo após a formação do primeiro haustório (SILVA et al., 2006) ou antes da formação do haustório (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2004; GANESH et al. 2006; SILVA et al. 2008), respostas estas ligadas à HR. Estes dados sugerem que a resposta específica que desencadeia a HR pode ser antecipada e ativada para bloquear a infecção fúngica.

#### 2.3.4 Ciclo da Ferrugem do Cafeeiro

Segundo Kushalappa e Eskes (1989a), o fungo da ferrugem do cafeeiro existe principalmente como micélio, pústulas e esporos nas folhas que podem ser infectadas continua e sucessivamente, conforme apresentado na Figura 4. O ciclo da ferrugem se inicia quando os uredósporos do fungo infectam as folhas jovens de café através dos estômatos da superfície abaxial. A germinação do fungo ocorre apenas em presença de água livre e penetram nas folhas em temperatura próxima de 24 °C (ZAMBOLIM et al., 1999). O crescimento do micélio é intercelular e ocorre a formação de estruturas específicas do fungo como a formação do apressório, hifa de penetração, âncora, células mãe do haustório e haustórios que são enviados para dentro das células e são responsáveis pela absorção de nutrientes a partir de tecidos vivos do hospedeiro. Folhas jovens geralmente são mais suscetíveis à infecção do que as mais maduras. As urédias podem aparecer na parte inferior da folha dentro de 10 a 25 dias a partir da infecção, dependendo das condições climáticas. O fungo produz ocasionalmente teliósporos, que na germinação formam basidiósporos, os quais não infectam as folhas de café, e nenhum hospedeiro alternativo até o momento foi encontrado. Os uredósporos são disseminados facilmente pelo vento, pela chuva, por insetos e a presença humana pode interferir no processo.

**Figura 4** – Ciclo da ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix*



Fonte: AGRIOS, 2005.

### 2.3.5 Controle da Ferrugem do Cafeeiro

O controle químico tem sido o meio mais utilizado para combater a ferrugem do cafeeiro. Dentre os diversos fungicidas, os cúpricos são os mais utilizados como controle preventivo (RODRIGUES; BETTENCOURT, 1975; HILLOCKS et al., 1999; VÁRZEA et al., 2002).

No entanto, a utilização de cultivares resistentes, quando disponíveis, constitui a medida mais importante e eficaz no controle da ferrugem (DINIZ et al., 2012). Algumas cultivares consideradas resistentes já foram colocadas à disposição dos produtores (SERA et al., 2010; DEL GROSSI et al., 2013).

Outra estratégia que pode influenciar a severidade da ferrugem é o estado nutricional das plantas de café. Alguns trabalhos têm demonstrado que a severidade da ferrugem do cafeeiro está diretamente relacionada com o nível de produção e nutrição das plantas (ZAMBOLIM et al., 1992; CARVALHO et al., 2001), e este, por sua vez, ao nível de nutrientes nas folhas.

Sabe-se que a severidade da ferrugem está relacionada à carga pendente do cafeeiro. Capucho et al. (2009) mostraram que o nível de produção em plantas com desbaste de frutos influenciou o desenvolvimento da ferrugem. Em plantas com maior quantidade de frutos, ocorreu um aumento significativo da doença, enquanto que nas sem frutos a doença não evoluiu. Estes dados sugerem que plantas com limitação de nutrientes são mais suscetíveis à infecção, embora isto claramente dependa da especificidade da interação patógeno-hospedeiro.

#### 2.4 ESTUDOS TRANSCRICIONAIS NA INTERAÇÃO FERRUGEM X CAFEIEIRO

Os primeiros estudos de análise transcricional de resposta do cafeeiro à ferrugem iniciaram-se com a construção de bibliotecas de cDNA subtrativas, em interações incompatíveis, associados à HR, permitindo a identificação de genes expressos em infecção inicial durante a interação ferrugem X cafeeiro (FERNANDEZ et al, 2004; PETITOT et al., 2008; GUZZO et al., 2009). Respostas moleculares de resistência associado às análises celulares envolvidas na colonização do fungo da ferrugem em interações compatíveis e incompatíveis também já foram avaliadas (GANESH et al., 2006; RAMIRO et al., 2009; VIEIRA et al., 2012; DINIZ et al., 2012; DIOLA et al., 2013). Estes estudos podem colaborar no entendimento das respostas de defesa em cafeeiro e a ligação com os estágios iniciais de desenvolvimento do fungo causador da ferrugem e assim, é possível conduzir estudos sobre a durabilidade dos genótipos doadores de resistência. Entre os principais genes envolvidos nos mecanismos de imunidade da planta a esse patógeno estão os fatores de transcrição WRKY, receptores quinases, glucosiltransferases, lipoxigenases, proteínas *NDR1* e proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteins) (FERNANDEZ et al 2004; GANESH et al., 2006; PETITOT et al, 2008; RAMIRO et al., 2009; DINIZ et al., 2012).

Estudos com sequenciamento de nova geração forneceram importante recurso genômico na interação *H. vastatrix* com cafeeiro, além de um abrangente banco de EST's de *C. arabica* (FERNANDEZ et al., 2012). Este estudo teve como objetivo a análise do transcriptoma de *H. vastatrix* durante a interação compatível com cafeeiro, obtendo um repertório de genes expressos durante infecção e a identificação de possíveis genes efetores.

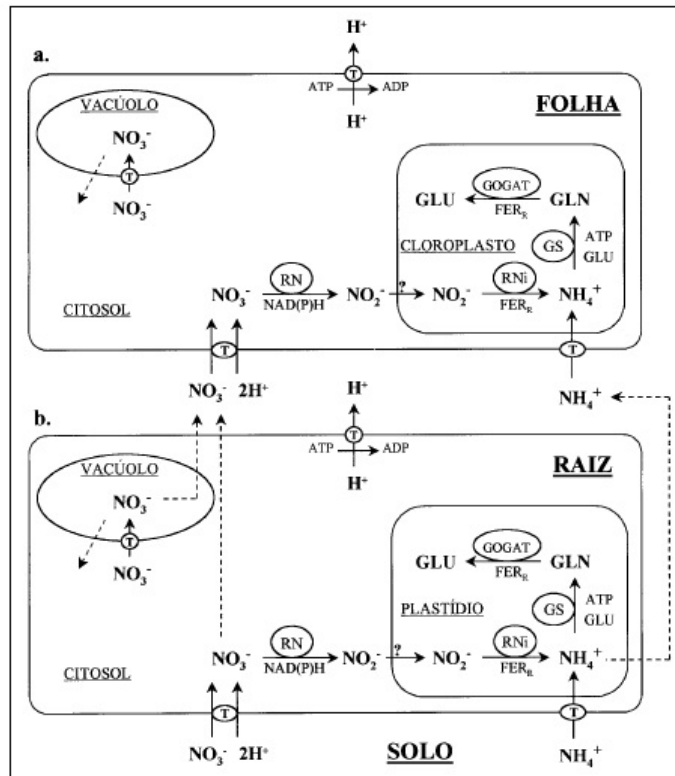
## 2.5 ASSIMILAÇÃO DE N

O uso de N pelas plantas envolve várias etapas, incluindo absorção, assimilação, translocação e, quando a planta encontra-se em envelhecimento, a reciclagem e a remobilização (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). A assimilação de N é um processo vital para a produção vegetal, diretamente responsável pela biomassa vegetal e produtividade de grãos (REIS et al., 2009). A taxa e a quantidade de N absorvido e assimilado pelas plantas durante o seu ciclo dependem de carregadores específicos na membrana plasmática, atividade das enzimas envolvidas no ciclo do N, da disponibilidade de energia necessária para os processos de assimilação e do estágio de desenvolvimento da planta (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

As principais formas de absorção de N pelas plantas no solo são através dos íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), e para as leguminosas, também através da fixação simbiótica de N (LEA; AZEVEDO, 2006). A forma mais abundante que está disponível para as raízes das plantas é  $\text{NO}_3^-$ , e a forma mais abundante em folhas é  $\text{NH}_4^+$  (LIGHTFOOT, 2013), devido a alta mobilidade de  $\text{NO}_3^-$  no solo (MAATHUIS; DIATLOFF, 2013) e devido à rápida oxidação biológica do íon  $\text{NH}_4^+$  pelo processo de nitrificação. Segundo esses mesmos autores, a redução de  $\text{NO}_3^-$  em  $\text{NH}_4^+$  é altamente endergônica e exige 15 equivalentes de ATP. Este custo energético elevado sugere  $\text{NH}_4^+$  seria a fonte preferível de N (MAATHUIS; DIATLOFF, 2013). No entanto,  $\text{NH}_4^+$  é muito mais tóxico e é rapidamente assimilado em glutamina nos cloroplastos e mitocôndrias (MAATHUIS; DIATLOFF, 2013). Já o  $\text{NO}_3^-$  pode ser armazenado de forma segura em níveis elevados em vacúolos.

Conforme a Figura 5, o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) pode ser reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), no citosol, através da enzima nitrato redutase (NR) no qual pode ocorrer em raízes e na parte aérea, e onde é translocado para o cloroplasto e convertido a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), pela segunda enzima da via, nitrito redutase (NRi) (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). O amônio é, então, incorporado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), formando glutamina (GLN) e glutamato (GLU) respectivamente, e outros aminoácidos e seus metabólitos como a asparagina e aspartato, que servem como substratos para transaminação e reações para a síntese de outros aminoácidos essenciais para a produção de proteína (WICKERT et al., 2007).

**Figura 5** – Representação esquemática da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas.  $\text{NO}_3^-$ : nitrato;  $\text{NO}_2^-$ : nitrito;  $\text{NH}_4^+$ : amônio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; RN: redutase do nitrato; RNi: redutase do nitrito; GS: sintetase da glutamina; GOGAT: sintetase do glutamato; T: transportador



Fonte: BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000.

A GS foi identificada e caracterizada a partir de plantas, nas quais foram observadas a alta afinidade por amônia e a consequente capacidade de incorporá-la a partir de formas inorgânicas. Esta enzima é amplamente distribuída nos mais diferentes tecidos e órgãos da planta e apresenta-se em duas isoformas com base na sua localização: citosólica ( $\text{GS}_1$ ) e plastidial ( $\text{GS}_2$ ) (MIFLIN; HABASH, 2002). A  $\text{GS}_1$  ocorre no citosol de raízes e de células da parte aérea da planta e a  $\text{GS}_2$  ocorre no plastídeos de tecidos fotossintéticos e não fotossintéticos (ISHIYAMA et al., 2004). Enquanto um único gene codifica a isoforma plastidial na maioria das plantas, a isoforma citosólica é codificada por uma família multigênica de 3 a 5 genes (BERNARD et al., 2008). Em arroz, três genes foram identificados, enquanto que em milho e *Arabidopsis thaliana* contem cinco genes que codificam  $\text{GS}_1$  (BERNARD; HABASH, 2009). A expressão e a síntese de isoformas de GS é um processo complexo que difere entre espécies e depende do estado metabólico de plantas e tecidos diferentes (MCNALLY et al., 1983, STITT et al., 2002).

A isoforma GS<sub>1</sub> é particularmente importante para assimilação de amônio a partir de diferentes fontes, tanto para assimilação primária de N e reciclagem de N (BERNARD; HABASH, 2009). No entanto, estes genes não são regulados de forma semelhante e são expressos em diferentes tecidos das plantas (ISHIYAMA et al., 2004), com isso nem todas as isoformas de GS<sub>1</sub> participam igualmente na remobilização. Já a isoforma GS<sub>2</sub> desempenha um papel na assimilação de amônio produzido, sobretudo pela fotorrespiração.

Da mesma forma, existem duas isoenzimas de síntese de glutamato (GOGAT), incluindo uma GOGAT dependente da ferredoxina (GOGAT-Fd) e uma GOGAT dependente de NADH (GOGAT-NADH). Embora ambas as formas sejam plastidiais, a enzima GOGAT-Fd é predominantemente encontrada em órgãos fotossintéticos, e a enzima GOGAT-NADH se encontra em tecidos não-fotossintéticos (YAMAYA et al., 2002). Embora a via metabólica GS/GOGAT seja a principal via de assimilação do N em plantas superiores, as plantas têm a capacidade de utilizar rotas alternativas para produzir glutamato através da enzima glutamato-desidrogenase (GDH) (LASA et al., 2002).

A asparagina é sintetizada pela enzima asparagina sintetase (AS), que é codificada por um número variável de genes AS, dependendo da espécie. A maioria das plantas em estudo contêm uma única cópia do gene AS, enquanto as espécies *A. thaliana* e *Helianthus annuus* possuem três cópias (LAM et al., 1996). A atividade do gene AS é regulada pela luz, concentração de carbono e disponibilidade N (HERRERA-RODRIGUEZ et al., 2004). O gene AS pode ser induzido durante a senescência e possui papel na remobilização de N (HERRERA-RODRIGUEZ et al., 2006). Nas raízes, a indução de AS pode facilitar a reciclagem de aminoácidos e armazenamento de asparagina neste órgão, essencial para a recuperação da planta. A mobilização de N promovida por infecção de patógenos tem como estratégia privar o patógeno de nutrientes através da exportação de nutrientes para longe do local de desenvolvimento da infecção, e, por outro lado, como uma estratégia para salvar nutrientes em órgãos saudáveis envolvidos na recuperação (HWANG et al., 2011). Em recente trabalho de Fernandez e colaboradores (2012), um dos genes com maior aumento de transcritos em resposta à infecção com *H. vastatrix* foi uma isoforma de asparagina sintetase.

## 2.6 ESTUDOS NA INTERAÇÃO NUTRIÇÃO X DOENÇAS

A nutrição mineral há muito tem sido reconhecida como um componente importante das práticas de controle de doenças (HUBER; WILHELM, 1988), embora ainda haja uma limitada compreensão dos mecanismos envolvidos nestes processos. Por isso, os progressos no manejo da nutrição de plantas para melhorar o controle das doenças são ainda incipientes.

Essa dependência se deve ao fato dos nutrientes minerais terem um efeito significativo no padrão de crescimento, morfologia e anatomia e também na composição química da planta. Assim, a síntese de compostos orgânicos e secundários envolvidos na resposta de defesa, tais como fitoalexinas, ligninas, terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos, é também dependente da disponibilidade de nutrientes minerais (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O conhecimento do metabolismo do N e da síntese de aminoácidos nas plantas hospedeiras durante a colonização por patógenos é muito limitado. Sabe-se que os aminoácidos fenilalanina e hidroxiprolina são importantes na defesa das plantas. Após a infecção, a fenilalanina é convertida pela fenilalanina amônia liase (PAL) em ácido trans-cinâmico, um importante precursor para a biossíntese de fenilpropanóides. Esses compostos incluem as fitoalexinas, assim como precursores de moléculas estruturais de defesa, tais como a lignina (DIXON; HARRISON, 1990).

Segundo Krugner (1978), a nutrição mineral da planta pode exercer um efeito sobre a sua suscetibilidade a diferentes patógenos, influenciando nas reservas de alimentos disponíveis ao patógeno e causando variações nos seus mecanismos bioquímicos de defesa. A aplicação de fertilizante nitrogenado acima do recomendado pode resultar em maior incidência de doenças e aumento de lesões. Isso tem sido verificado para patógenos biotróficos, como por exemplo, míldios (JENSEN; MUNK, 1997; HOFFLAND et al., 2000), ferrugem da folha causada por *Puccinia recondita* (MASCAGNI et al., 1997), e também para necrotróficos como a brusone do arroz (LONG et al., 2000; TALUKDER et al., 2005). Em uma situação de desequilíbrio nutricional, a planta pode ficar mais vulnerável à doença, evidenciando que os nutrientes minerais podem estar envolvidos nos mecanismos de aumento ou diminuição da suscetibilidade (HUBER; WATSON 1974; PRETTY, 1982).

Em *A. thaliana*, a baixa disponibilidade de N compromete gravemente a capacidade da planta para expressar a resistência induzida por

patógenos (DIETRICH et al., 2005). Neste trabalho, plantas com déficit de N apresentaram tanto um atraso na expressão de enzimas de defesa quanto uma diminuição nos níveis dessas enzimas.

A disponibilidade de N no solo pode influenciar o desenvolvimento do patógeno e pode modificar o crescimento, a absorção e a partição do N na planta. No entanto, os efeitos do N sobre as doenças não são totalmente conhecidos. Em um estudo sobre o efeito do N sobre resistência a doenças em tomateiro, Hoffland et al. (2000) verificaram que a influência de N depende do tipo de patógeno. Isto pode ser o resultado de diferentes necessidades de fontes de N para o crescimento do patógeno, ou das diferenças na sensibilidade do patógeno aos compostos relacionados com a resistência (HOFFLAND et al., 2000). Alguns desses resultados são contraditórios com as hipóteses sobre o efeito da disponibilidade de nutrientes nas defesas das plantas contra patógenos, que são baseadas na suposição de que as plantas com deficiência nutricional são mais resistentes (BRYANT et al., 1983; HERMS; MATTSON, 1992).

Alguns estudos relatam evidências sobre a influência do crescimento do patógeno na absorção e partição do N na planta. Pérez-Garcia et al. (1995) sugeriram que diferentes isoformas de GS podem estar envolvidas na reassimilação e transporte do N liberado para partes saudáveis da planta durante a degradação proteica nos tecidos infectados. No entanto, a análise de aminoácidos em folhas infectadas indicou a asparagina como principal precursor envolvido no transporte de N (PÉREZ-GARCIA et al., 1998). Os resultados de Pageau et al. (2006) sobre o ataque de patógenos em fumo indicam que os genes *GDH* e *GS1* são também componentes de resposta de defesa da planta ao ataque de patógenos. Estes resultados sugerem que *GDH* se comporta como um gene de estresse induzível e que a regulação de *GS1* é mais complexa e mais seletiva. Isto sugere que os papéis da *GS1* e *GDH*, no manejo de N em resposta ao estresse, são independentes. Segundo Tavernier et al., 2007 estes dois genes são considerados marcadores de senescência e podem estar envolvidos na reciclagem e mobilização de N na interação feijão X antracnose. Em milho X carvão, demonstrou-se que, genes relacionados ao metabolismo de N têm sua atividade transcricional alterada (HORST et al., 2010). Hwang et al. (2011), determinaram, em folhas de pimenta, que o gene *AS* (isoforma *AS<sub>1</sub>*) é essencial para respostas de defesa de plantas contra patógenos microbianos, além de necessário para a assimilação de N em plantas.

Além disso, estudos bioquímicos e enzimáticos em relação à patógenos X nutrição demonstraram que a forma de nutrição nitrogenada afeta a resistência contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em fumo, na qual a velocidade de morte celular foi mais rápida em plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  em comparação com  $\text{NH}_4^+$ , devido à síntese de óxido nítrico e ácido salicílico (GUPTA et al. 2013). Cruz et al. (2004) verificaram, em folhas de mandioca, que o aumento do fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  conduziu a um aumento da atividade de enzimas chave na assimilação de N e sugeriram que a redução de  $\text{NO}_3^-$  pode ser mais limitante em comparação à assimilação de  $\text{NH}_4^+$  para o crescimento dessas plantas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Duas cultivares de *C. arabica* foram utilizadas no presente trabalho: IAPAR 59 e Catuaí Vermelho IAC 99, consideradas resistente e suscetível à ferrugem do cafeeiro, respectivamente (SERA et al., 2010; DEL GROSSI et al., 2013).

Plantas com aproximadamente seis meses de idade foram obtidas no viveiro de mudas de cafeeiro do IAPAR, em Londrina-PR. Oitenta e quatro mudas foram transferidas para casa de vegetação, regulada a 25° C, para aclimação, onde foram distribuídas em vasos plásticos de 4,5 L contendo areia esterilizada. As plantas foram irrigadas semanalmente com água deionizada e solução nutritiva adaptada de Clark (1975), com pH 5,5 - 6,0, no volume de 300 ml por vaso. A Tabela 1 detalha os componentes da solução.

**Tabela 1** – Soluções nutritivas utilizadas no experimento em plantas de café

	<b>Componentes da solução</b>	<b>Concentração final (µM)</b>
I	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1068
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	332.5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	266
II	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	665
III	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5333
IV	Fe-EDTA	
	Na <sub>2</sub> -EDTA	200
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	
V	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	7.0
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3.0
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.5
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.1
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.7

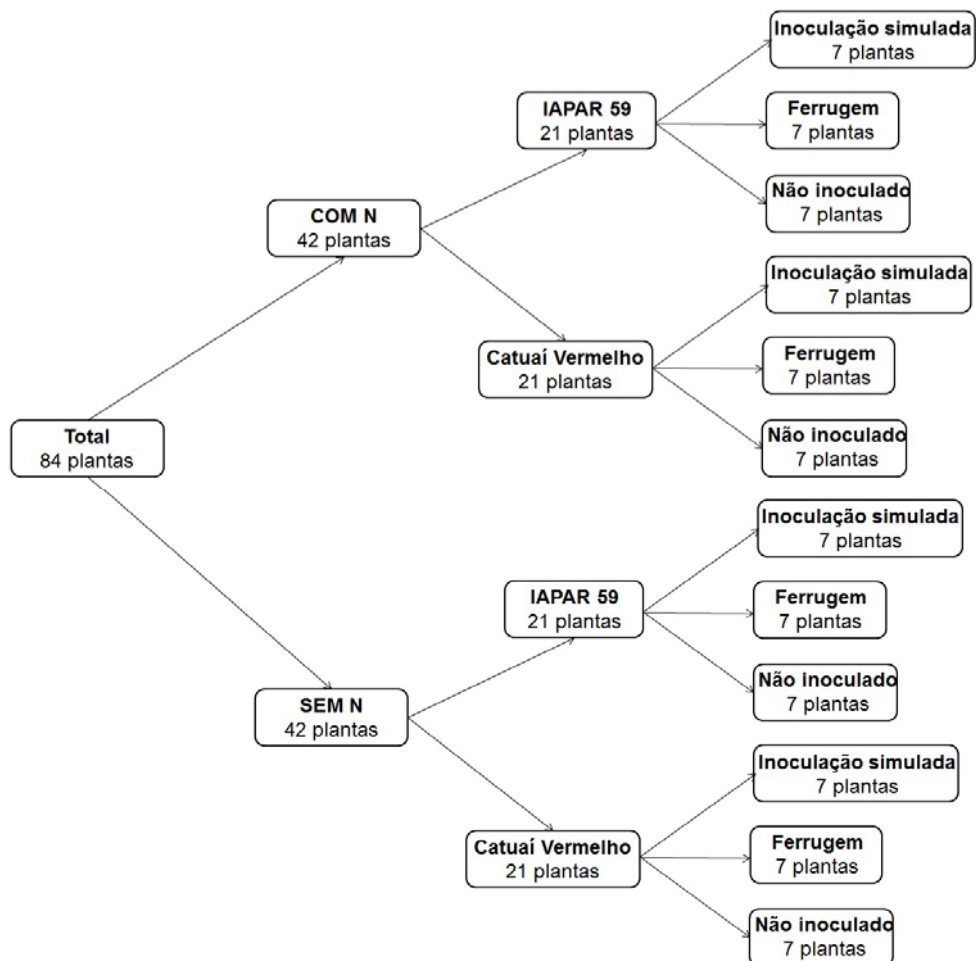
**Fonte:** Adaptada de Clark (1975).

### 3.2 INDUÇÃO DE PADRÃO NUTRICIONAL DIFERENCIAL

Regimes nutricionais diferenciados foram aplicados para indução de deficiência de N em plantas selecionadas por uniformidade de tamanho, com aproximadamente um ano de idade. Em um primeiro regime, 42 plantas (21 de cada cultivar) foram mantidas sem restrição de N, com irrigação semanal de solução nutritiva completa adaptada de Clark (1975), conforme a Tabela 1. Em um segundo regime, 42 plantas (21 de cada cultivar) foram tratadas com solução nutritiva sem fontes de N ( $0 \mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ - Solução III) (Tabela 1). O período do regime nutricional diferencial foi de 42 dias.

Para o controle do estado nutricional foi realizada análise foliar de N total pelo método de ácido sulfúrico (MIYAZAWA et al., 1992). A Figura 6 apresenta o diagrama com o número de plantas de cafeeiro utilizadas no experimento.

**Figura 6** – Diagrama do número de plantas de cafeeiro utilizadas no experimento de acordo com o regime nutricional diferencial, a cultivar e a inoculação



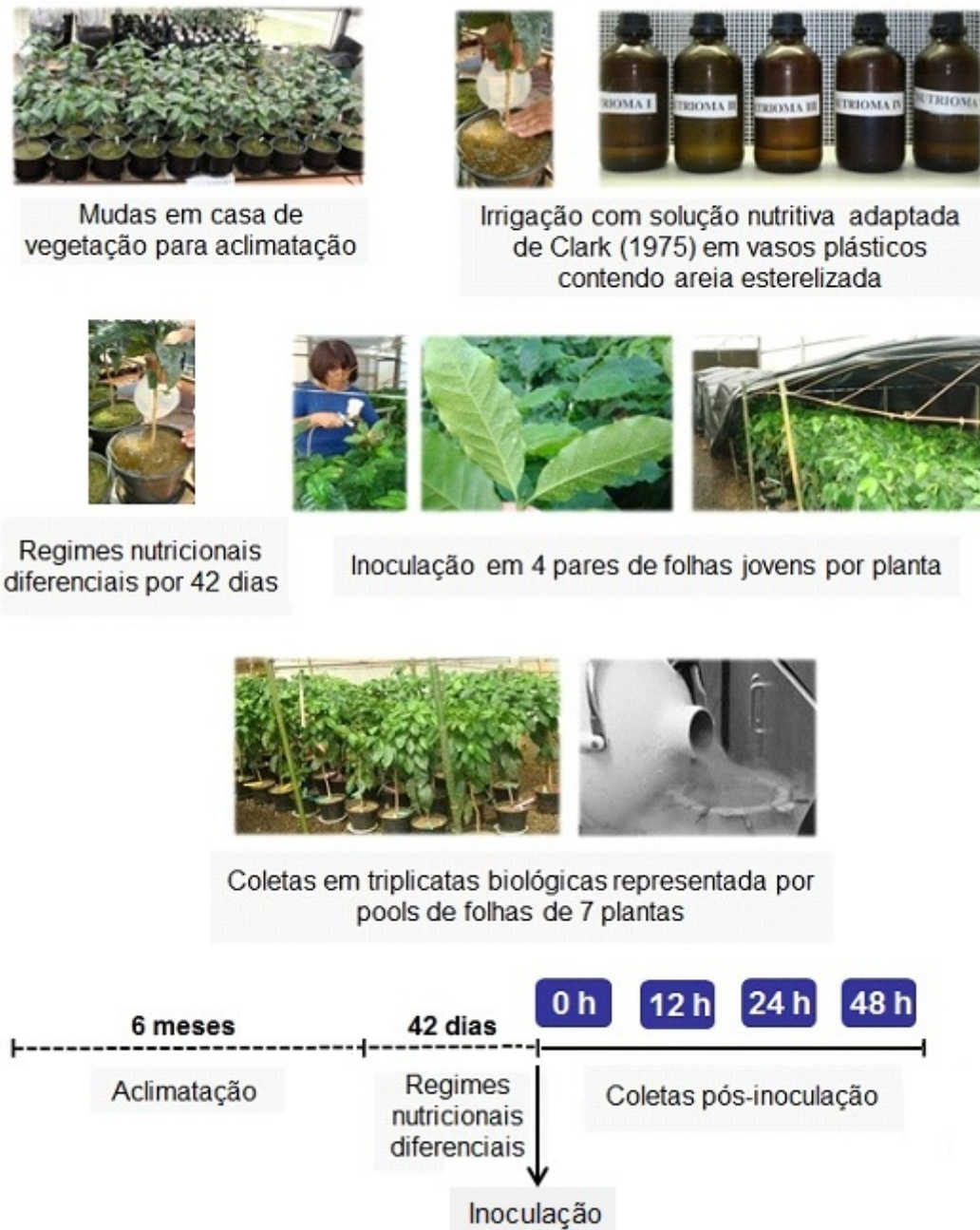
### 3.3 INOCULAÇÃO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO

Após a aplicação dos regimes nutricionais diferenciais, as plantas foram inoculadas com uredósporos do fungo de *H. vastatrix* raça II, no Centro de Café “Alcides Carvalho”, no IAC, seguindo o descrito em Barsalobres-Cavallari et al. (2009). Uma suspensão de uredósporos (em água) com concentração final de 1mg/mL foi inoculada, com ajuda de um compressor, em folhas jovens e totalmente expandidas. A inoculação foi realizada em 4 pares de folhas por planta (primeiro e segundo par), num total de 28 plantas. Folhas de plantas com inoculação simulada (meio inerte) e folhas não inoculadas foram utilizadas como controles.

Para favorecer a germinação dos uredósporos de *H. vastatrix*, as plantas de cafeeiro foram mantidas em câmara úmida, cobertas por um saco plástico preto e mantidas no escuro por 24h, com temperatura próxima a 22° C e alta umidade relativa, em casa de vegetação. Plantas inoculadas, dos genótipos resistentes e suscetíveis foram mantidas até o aparecimento de sintomas para confirmação da infecção.

Folhas das plantas com mesmo estágio de desenvolvimento sob regimes nutricionais diferenciais de N foram coletadas em quatro períodos pós-inoculação: 0, 12, 24 e 48h. A coleta foi realizada em triplicatas biológicas representadas por pools de folhas de sete plantas. Duas folhas por planta foram amostradas, no total de 14 folhas. Todo o material foi imerso imediatamente em N<sub>2</sub> líquido e armazenado em freezer -80° C. O desenho experimental adotado para as análises foi inteiramente casualizado, considerando-se os fatores: dois genótipos de cafeeiro; dois regimes nutricionais diferenciados de N; três diferentes inoculações; 4 tempos pós-inoculação. A representação do experimento descrito anteriormente encontra-se esquematizado na Figura 7.

**Figura 7 – Representação esquemática do experimento ferrugem X nutrição**



### 3.4 IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE N

A partir do banco de dados do Projeto Brasileiro Genoma Café (<http://bioinfo04.ibi.unicamp.br/coffee/>; VIEIRA et al., 2006; MONDEGO et al., 2011) foram realizadas buscas para os genes glutamina sintetase citosólica ( $CaGS_1$ ) e plastidial ( $CaGS_2$ ), nitrato redutase ( $CaNR$ ) e asparagina sintetase ( $CaAS$  – FERNANDEZ et al., 2012) com a utilização de sequências de *A. thaliana* disponíveis no banco de dados do genoma da espécie (<http://www.arabidopsis.org/>), cujos

acessos estão especificados na Tabela 2. As sequências proteicas foram submetidas a BLAST (versão TBLASTN) utilizando ESTs de *Coffea* spp. do banco de dados dbEST (NCBI) e CafEST (MONDEGO et al., 2011).

### 3.5 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

A extração de RNA total foi realizada seguindo o protocolo modificado de Chang et al. (1993) com a utilização de tampão CTAB associado a precipitação com cloreto de lítio. Todas as amostras foram tratadas com DNase I (RNase-free, Invitrogen) e a ausência de contaminação com DNA genômico foi verificada através de PCR utilizando primers do gene GAPDH. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria, utilizando-se o NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Foram utilizadas amostras que apresentaram razões  $A_{260/280 \text{ nm}}$  entre 1.8 e 2.2. A integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2,5 µg do RNA total utilizando-se o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante em um volume final de 13 µl.

### 3.6 DESENHO DE PRIMERS E EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO

Primers específicos para cada gene foram desenhados com a utilização do software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) a fim de se obter amplicons de 100-153 pb e temperatura de anelamento de  $60^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$  (Tabela 2).

A eficiência de amplificação de cada par de primer foi calculada com utilização do software LinReg (RAMAKERS et al., 2003) observado na Tabela 2. Foram analisados dados que obtiveram no mínimo 90% de eficiência de amplificação.

**Tabela 2** – Descrição de genes e sequência de primers desenhados para qPCR

Gene	Nomenclatura	Contig <i>C. arabica</i>	Acesso NCBI	Ortólogo Arabidopsis	Amplicon (pb)	Sequência de primers Forward e Reverse	Eficiência (%)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>CaGAPDH</i>	*	GW488886.1	AT1G13440	100	F- AGGCTGTTGGGAAAGTTCTTC R- ACTGTTGGAACCTCGGAATGC	94
Glutamina sintentase citosólica	<i>CaGS<sub>1</sub></i>	9226	GW485208.1	AT1G66200.3	147	F- GAGGATCACTGAGATTGCTGGG R- TCAATTGCCTTCTTGATGACTCC	94
Glutamina sintetase plastidial	<i>CaGS<sub>2</sub></i>	9035	GR998899.1	AT5G35630.3	143	F- ACTTCAAAGATGTGGAGCTCCC R- GTTACGTCCAGGTTTAGCAGCTGT	93
Nitrato redutase	<i>CaNR</i>	7146	GT687366.1	AT1G77760.1	153	F- TGTGCTACGGTTGATGAAAAGCTAT R- ATCCAAGTATTGTGACATAACCCCTC	93
Asparagina sintetase	<i>CaAS</i>	6506	GW450683.1	AT5G10240.2	101	F- GATTGATGACTGATGTGCCTTTTG R- GGCCTTTGTACCAGCCAAGTAA	93

\*Retirado de Cruz et al. (2009).

### 3.7 qPCR E ANÁLISE DE DADOS

O perfil transcricional dos genes relacionados à assimilação de N foi avaliado através de qPCR (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) utilizando-se o kit 2x SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific). O volume total das reações foi de 25  $\mu$ L, onde 12,5  $\mu$ L de SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 0,5  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 10,5  $\mu$ L de água milli-Q e 1  $\mu$ L de cDNA na concentração de 5 ng/  $\mu$ L.

As reações foram preparadas com triplicatas biológicas em triplicatas técnicas e os parâmetros de termociclagem utilizados foram: 10 min a 95° C, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95° C por 30 segundos e 60° C por 60 segundos. Curvas de dissociação foram analisadas para verificar especificidade de amplificação dos primers na reação.

Informações adicionais em relação às análises de qPCR podem ser observadas no documento do ANEXO A, Informações Mínimas para Publicação de Experimentos de PCR Quantitativo em Tempo Real (MIQE- *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), de acordo com as recomendações de Bustin et al. (2009).

A expressão relativa dos genes foi avaliada através do software GenEx Standard 5.4.3 (MultiD Analyses AB, Göteborg, Sweden). O gene *CaGAPDH* foi utilizado para normalização dos dados, devido à estabilidade desse gene como normalizador em *C. arabica* sob inoculação de ferrugem (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009). Para calibração dos dados de expressão, foi utilizado o tempo 0h.

### 3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

#### 3.8.1 Atividade *in Vitro* de Glutamina Sintetase

A atividade *in vitro* de glutamina sintetase (GS) foi avaliada segundo Cruz et al. (2004) utilizando duas repetições biológicas em triplicatas técnicas das folhas de cafeeiro considerando os genótipos, os regimes de N, as inoculações simulada e com ferrugem e o tempo de coleta pós-inoculação. Um grama do material vegetal macerado congelado foi homogeneizado em tampão HEPES com pH 7,5 e

centrifugado a 12.200 rpm durante 30 min a 4° C. A atividade da GS foi determinada utilizando hidroxilamina como substrato e a formação de  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato com cloreto férrico acidificado. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm.

### 3.8.2 Concentração de Clorofila Total

As concentrações de clorofila total, clorofila *a* e clorofila *b* foram determinadas por espectrofotometria através das seguintes equações conforme descrito por Arnon (1949):

$$\text{Clorofila total (ug / ml)} = 20,2 (A_{645}) + 8,02 (A_{663})$$

$$\text{Clorofila a (ug / ml)} = 12,7 (A_{663}) - 2,69 (A_{645})$$

$$\text{Clorofila b (ug / ml)} = 22,9 (A_{645}) - 4,68 (A_{663})$$

Para cada tempo de coleta foram utilizados 100 mg de tecido macerado congelado de folhas de cafeeiro contidas em um extrato de acetona de 100%, adaptada de Arnon (1949), com três repetições biológicas. A reação ocorreu no escuro por 30 min e centrifugado a 7500 rpm por 10 min. Os comprimentos de onda utilizados foram de 645 nm, 663 nm e 652 nm.

### 3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de qPCR e das análises bioquímicas foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Fisher (LSD) com nível de significância de  $p < 0,05$ , utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 INDUÇÃO DE PADRÃO NUTRICIONAL DIFERENCIAL

As plantas de cafeeiro submetidas aos dois regimes nutricionais diferenciais de N apresentaram diferenças visuais de coloração nas folhas (Figura 8). Os resultados da análise foliar de N total de plantas cultivadas na presença de fontes de N foram 33,43 g/ kg e 31,13 g/ kg para IAPAR 59 e Catuaí Vermelho IAC 99, respectivamente. Plantas cultivadas em ausência de fontes de N apresentaram 24,95 g/ kg e 26,74 g/ kg, respectivamente, para os mesmos genótipos. Pompelli et al. (2010), em plantas de Catuaí Vermelho IAC 44 submetidas a baixa (0 mM de N) e alta (23 mM de N) aplicação de N, em plena luz, apresentaram valores próximos aos obtidos nesse trabalho, de 20,0 g/ kg e 33,6 g/ kg, respectivamente.

**Figura 8** – Regimes nutricionais diferenciados para indução de deficiência de N em plantas de café dos genótipos Catuaí Vermelho IAC 99 (A) e IAPAR 59 (B). Etiquetas amarelas referem se as plantas com regime de supressão de fontes de N e etiquetas roxas referem se as plantas em condições de suficiência de fontes de N

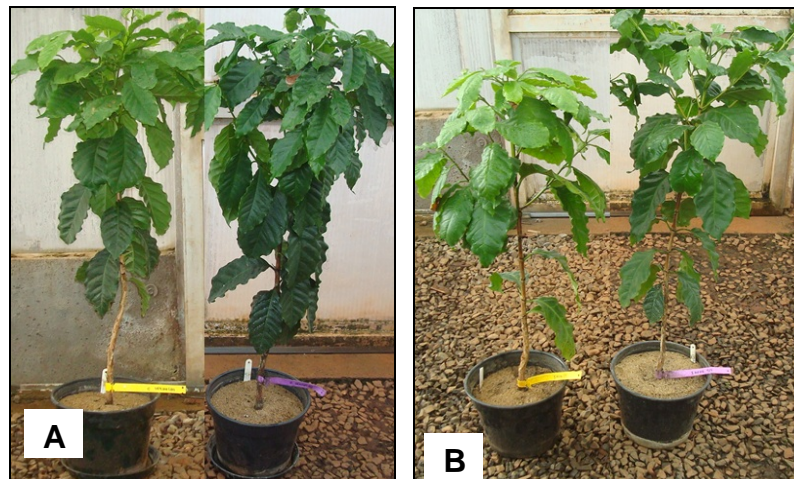


Foto: BABA, V.Y., 2012.

### 4.2 INOCULAÇÃO DA FERRUGEM DO CAFEEIRO

Aproximadamente 45 dias após a inoculação de *H. vastatrix*, plantas suscetíveis (Catuaí Vermelho IAC 99) utilizadas como controle para a confirmação da infecção do fungo, apresentaram os sintomas da ferrugem do cafeeiro (Figura 9). Essa interação planta-patógeno pode ser considerada como compatível (patógeno

virulento e hospedeiro suscetível), com o sistema de defesa da planta tardiamente ativado ou não ativado, condicionando a doença (RESENDE et al., 2003).

No genótipo IAPAR 59, considerado resistente, ocorre o desencadeamento de uma reação incompatível (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). A infecção por patógenos avirulentos induz uma série de respostas de defesa frequentemente resultando no colapso localizado de células vegetais conhecido como HR (STASKAWICZ et al., 1995). Nas folhas das plantas resistentes podem-se observar manchas cloróticas com ausência de esporulação do fungo, típicas de HR (Figura 10).

**Figura 9** – Confirmação da infecção de *Hemileia vastatrix* por inoculação em folhas do genótipo suscetível de café (Catuaí Vermelho IAC 99) em superfície adaxial (A) e abaxial (B)

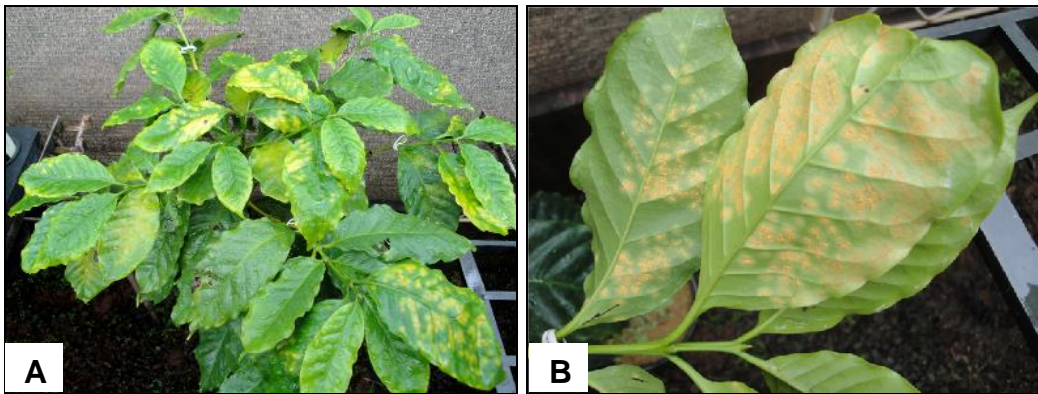


Foto: BRAGHINI, M.T., 2012.

**Figura 10** – Reação de hipersensibilidade com pequenas manchas cloróticas associadas com tumefações puntiformes nos locais de penetração em folhas do genótipo resistente de café (IAPAR 59) na superfície adaxial (A) e abaxial (B)

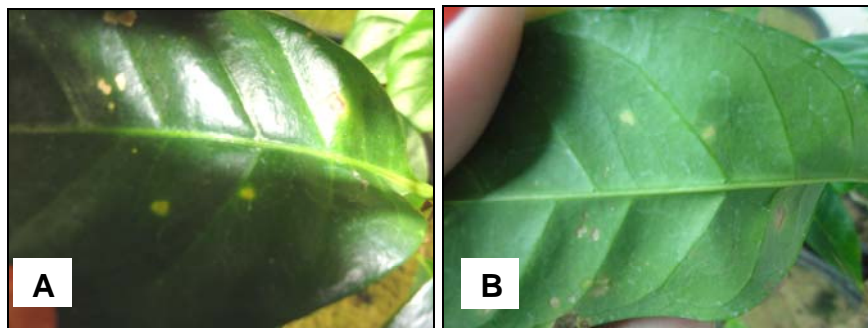
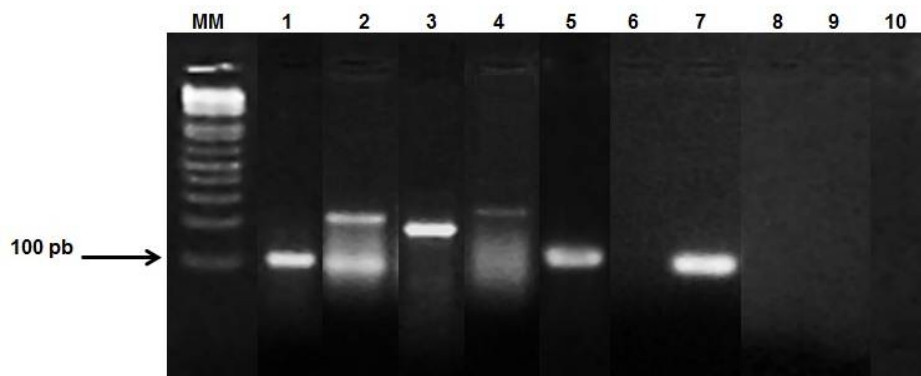


Foto: BABA, V.Y., 2012.

#### 4.3 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E ESPECIFICIDADE DE AMPLIFICAÇÃO

A extração de RNA de folhas e os cDNAs apresentaram qualidade adequada, sem evidências de degradação (ANEXO A). A especificidade de amplificação dos primers assim como o tamanho dos fragmentos foi verificada em gel de agarose a 2 % (Figura 12). Todos os primers apresentaram tamanho dos amplicons esperados, descritos na Tabela 2.

**Figura 11** – PCR em gel de agarose 2% dos genes *CaGAPDH*, *CaGS<sub>1</sub>*, *CaGS<sub>2</sub>*, *CaNR* e *CaAS* em tecidos de folhas de *Coffea arabica*. MM- marcador molecular; 1- *CaGAPDH*; 2- *CaGS<sub>1</sub>*; 3- *CaGS<sub>2</sub>*; 4-*CaNR*; 5- *CaAS*; 6- Controle negativo de *CaGAPDH*; 7- Controle negativo de *CaGS<sub>1</sub>*; 8- Controle negativo de *CaGS<sub>2</sub>*; 9- Controle negativo de *CaNR* e 10- Controle negativo de *CaAS*



#### 4.4 ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NA ASSIMILAÇÃO DE N

O perfil transcricional de todos os genes estudados em condições de suficiência de N foi reduzido comparado com o regime com deficiência de fontes de N, exceto para o gene *CaNR* (Figuras 13 e 14). Em condições de supressão de fontes de N o gene que apresentou maiores níveis de RNAm foi *CaAS*. Nos diferentes regimes de N foi possível verificar também variações de acordo com os genótipos e as inoculações nas plantas de cafeeiro. De acordo com Pageau et al. (2006) as hipóteses pela qual a remobilização de N orgânico é promovida pelo ataque de patógenos e indutores são: (1) que os patógenos conseguem enviar sinais para ativar os mecanismos de mobilização de N de modo a redirecionar os nutrientes das plantas e apoiar o seu crescimento; (2) que a planta mobiliza e exporta seus nutrientes para longe do local de infecção, em uma reação de proteção

metabólica. Segundo Horst et al. (2010), durante a infecção com fungos biotróficos, as mudanças de aminoácidos livres podem indicar aumento da assimilação de N necessária para iniciar as respostas de defesa, ou que corresponda à demanda de N orgânico pelo parasita.

#### 4.4.1 Condições de Suficiência de Fontes de N

A inoculação da ferrugem induziu respostas distintas nos dois genótipos para o gene *CaGS<sub>1</sub>*, onde o patógeno influenciou na expressão de IAPAR 59, o que pode estar relacionado com a resistência da planta. Em condições de suficiência de fontes de N, o genótipo IAPAR 59 (resistente) apresentou elevação de transcritos na presença do patógeno, em 12 e 48h pós-inoculação (Figura 12A). Já Catuaí Vermelho IAC 99 (suscetível) apresentou níveis transcricionais reduzidos 12h pós-inoculação com posterior elevação de transcritos do gene (Figura 12B). Embora ainda com menor expressão em relação ao genótipo resistente (Figuras 12A e B).

Esses dados são similares aos obtidos por Pageau et al. (2006), onde o gene *GS1* foi preferencialmente induzido por duas estirpes que promoveram reações incompatíveis entre *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e tomate, em comparação a estirpe que levou ao desenvolvimento da doença. Esses autores também sugerem que *GS1* pode funcionar como gene de defesa da planta em estágio precoce, no qual o gene foi detectado duas horas após a inoculação. Da mesma forma, Tavernier et al. (2007) demonstraram que assim como os genes *PAL3* e *CHS*, o gene *GS1 $\alpha$*  foi induzido pelo fungo patogênico *Colletotrichum lindemuthianum*, bem como pelo mutante não patogênico, sugerindo que as folhas de feijão responderam ao reconhecimento do patógeno com a indução da expressão de *GS1* e acúmulo de glutamina em tecidos foliares infectados.

Da mesma forma que o gene *CaGS<sub>1</sub>*, a expressão de *CaGS<sub>2</sub>* foi menor para o genótipo suscetível em relação ao resistente (Figuras 12C e D). No entanto, em ambos os genótipos, o patógeno não influenciou na expressão do gene. IAPAR 59 apresentou picos crescentes de expressão em 12, 24 e 48h pós-inoculação para a inoculação simulada (Figura 12C), da mesma forma Catuaí Vermelho IAC 99 elevou seus transcritos em 48h (Figura 12D).

Com relação ao perfil de expressão de *CaNR*, o maior nível transcricional observado, em todos os casos, foi em 12h pós-inoculação (Figuras

12E e F). Em Catuaí Vermelho IAC 99 a ferrugem influenciou na expressão em 12 e 24h pós-inoculação (Figura 12F). Diferentemente, o genótipo resistente (IAPAR 59) não foi influenciado pelo patógeno, no entanto, apresentou maior expressão de transcritos do gene em comparação com o genótipo suscetível (Figura 12E). Isso pode estar relacionado com a capacidade diferencial de assimilação de N do primeiro genótipo em condições de nutrição completa, proporcionando uma maior resistência à ferrugem. Além disso, *NR* apresentou a maior expressão de genes o que pode estar relacionado com a produção de aminoácidos envolvidos na defesa da planta.

Esses resultados podem estar relacionados com os mecanismos de defesa da planta resistente na interação com a ferrugem do cafeeiro, associado à formação de HR e óxido nítrico (NO). O NO tem sido proposto como uma molécula de sinalização, onde estaria envolvido na indução de HR em uma interação incompatível e desempenhando assim um importante papel na defesa da planta contra agentes patogênicos (HONG et al., 2007). Modolo et al. (2005) também observaram que *A. thaliana* pode produzir quantidades substanciais de NO para impedir a disseminação de *P. syringae* através de seus tecidos. Oliveira et al. (2010) demonstraram que plantas com interação compatível entre *P. syringae* e *A. thaliana* não desenvolveram HR e apresentaram crescimento bacteriano mais intenso nas suas folhas, além de resultar em uma deficiência da produção de NO associada com níveis mais baixos de nitritos e de L-arginina. Assim, os resultados mostram a importância de *NR* para respostas de defesa da planta na produção de substratos para a síntese de NO durante as interações fitopatogênicas (SALGADO et al., 2006). Ou seja, a redução do nitrito pela *NR*, pode ser uma importante fonte de NO em plantas (YAMASAKI; SAKIHAMA, 2000).

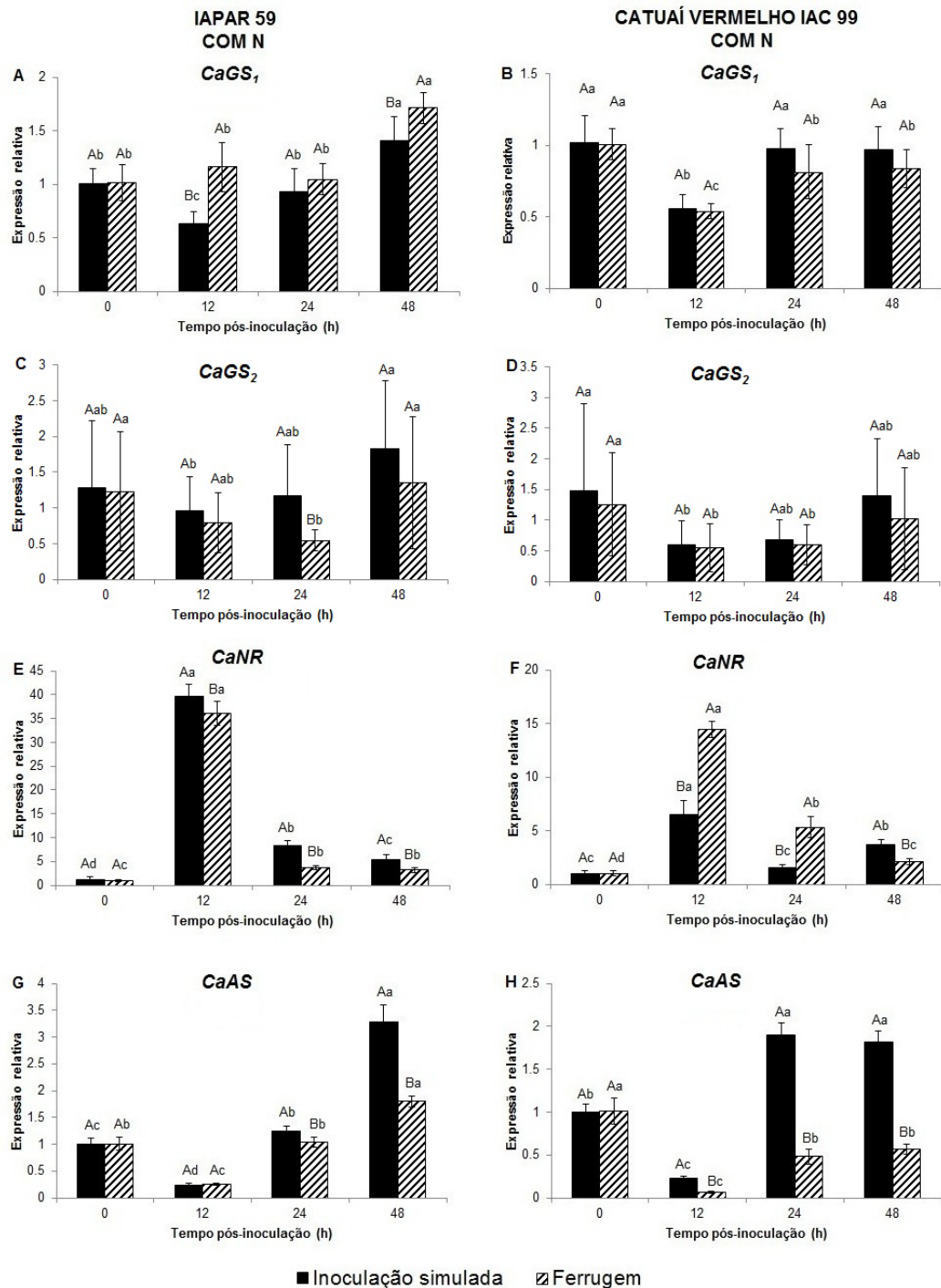
O aumento dos níveis transcricionais em 12h pode ser explicado pela influência da luz na transcrição de *NR*, uma vez que a coleta foi realizada no início da manhã (6h) (Figura 12E e F). Segundo Lillo (2008) o aumento dos níveis de RNAm de *NR*, no final do período de escuro observada na maioria das plantas pode ser causada pela diminuição da realimentação inibida neste momento do dia. Quando a luz foi abruptamente ligada na parte da manhã, um pico agudo nos níveis de RNAm de *NR* na primeira hora de iluminação foi observada, demonstrando o efeito imediato da luz. Estes resultados indicam que a luz é um dos principais fatores que regulam a atividade da *NR* (CHOW et al., 2007); que a luz é um elemento

essencial para a *NR* se tornar ativa (CHOW et al., 2004) e que a transcrição deste gene está limitada à fase de luz, evitando assim a toxicidade de nitrito (DUKE;DUKE, 1984).

Segundo Chow et al. (2004) o aumento da atividade de *NR*, após um pulso de luz durante a fase escura, pode ser um resposta de fotoativação de uma enzima de *NR* inativa pré- existente. Segundo esses mesmos autores, há indícios de que em *Gracilaria chilensis*, a *NR* é uma enzima rapidamente ativada pela luz (10 min), o que pode ser regulado por mecanismos pós-traducionais que envolvem desfosforilação e fosforilação.

Respostas transcricionais do gene *CaAS* apresentaram, em todos os casos, menor expressão de transcritos em 12h pós-inoculação (Figuras 12G E H). Isso pode estar relacionado com o fato do gene *AS* ser regulado negativamente pela luz (HWANG et al., 2011). Tanto no genótipo suscetível como no resistente, *H. vastatrix* não influenciou na expressão de genes (Figuras 12G e H). Catuaí Vermelho IAC 99 apresentou diferença estatística entre a inoculação simulada e com a ferrugem em 12, 24 e 48h pós-inoculação (Figura 12H) e IAPAR 59 em 24 e 48h pós-inoculação (Figura 12G). Isso pode estar relacionado com a condição de suficiência de N, no qual a realocação de nutrientes não foi necessária. No entanto, a maior expressão de *CaAS* do genótipo IAPAR 59 em relação ao genótipo suscetível, principalmente em 48h, pode estar envolvida nas respostas de defesa levando à resistência a doenças em plantas.

**Figura 12** – Expressão relativa dos genes glutamina sintetase citosólica ( $CaGS_1$ ) (A e B), plastidial ( $CaGS_2$ ) (C e D), nitrato redutase ( $CaNR$ ) (E e F) e asparagina sintetase ( $CaAS$ ) (G e H) nos genótipos resistente (IAPAR 59) (A, C, E e G) e suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (B, D, F e H) à ferrugem em condições de nutrição completa com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. O tempo 0h foi utilizado como calibrador. Médias seguidas da mesma letra maiúscula, comparam o mesmo genótipo no mesmo tempo, não diferem significativamente pelo teste de LSD ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas da mesma letra minúscula, comparam o genótipo em relação ao tempo 0h, não diferem significativamente pelo teste de LSD ( $p < 0,05$ )



#### 4.4.2 Condições de Supressão de Fontes de N

Em condições de supressão de fontes de N, *H. vastatrix* não influenciou na expressão do gene *CaGS<sub>1</sub>* em IAPAR 59, que apresentou um padrão crescente de expressão na inoculação simulada (Figura 13A). Para o genótipo Catuaí Vermelho IAC 99, o maior nível transcricional de *CaGS<sub>1</sub>* observado foi no final do experimento (48h) na presença do patógeno (Figura 13B). É possível sugerir que a elevação transcricional desse gene pode ser decorrente do progresso da infecção, conduzindo a remobilização de N no genótipo suscetível. Esses resultados são similares aos observados por Singh e Ghosh (2013), onde os níveis transcricionais de *OsGS1;1* foram mais expressos no final do experimento (12 dias) para o genótipo de arroz suscetível ao estresse hídrico. Tavernier et al. (2007) sugerem que *GS1* e *GDH* podem facilitar a exportação de N do tecido infectado diminuindo assim a disponibilidade de N para os patógenos. Além disso, nessas condições nutricionais, houve um aumento na expressão em ambos os genótipos em relação à condição de suficiência de N. Já tem sido relatado que *GS1* pode aumentar em folhas durante senescência natural e em resposta a estresses bióticos e abióticos (SINGH; GHOSH et al., 2013). Segundo os resultados de Pageau et al. (2006) *GS1* pode ser caracterizado como um dos primeiros genes associados à senescência (*SAG- Senescence Associated Gene*). Com isso, o aumento do perfil transcricional do gene *CaGS<sub>1</sub>*, na indução de deficiência de N também pode ser explicado devido sua relação com a senescência natural das folhas.

Os genes *CaGS<sub>1</sub>* e *CaGS<sub>2</sub>* apresentaram semelhança na expressão de transcritos em relação aos genótipos e a inoculação com ferrugem (Figuras 13A, B, C e D). Além disso, da mesma forma que o gene *CaGS<sub>1</sub>*, houve aumento da expressão de *CaGS<sub>2</sub>* em supressão de fontes de N, infectada com ferrugem (Figura 13C e D); não houve influência de *H. vastatrix* na expressão de *CaGS<sub>2</sub>* para IAPAR 59 (Figura 13C); e o genótipo Catuaí Vermelho IAC 99 foi influenciado pelo patógeno, com pico transcricional em 48h pós-inoculação (Figura 13D). Isso sugere que nessas condições de fontes de N, o gene *CaGS<sub>2</sub>* foi mais induzido pela infecção do fungo, o que pode estar relacionado com a interação compatível entre ferrugem-café e com a senescência.

Respostas transcricionais de *CaNR* para Catuaí Vermelho IAC 99, com inoculação simulada foram diferentes estatisticamente à quantidade de

transcritos quando inoculadas com a ferrugem em 12, 24 e 48h pós-inoculação, contudo, em 12h houve um pico de expressão, na presença do patógeno, no qual a modulação foi reduzida após 24h (Figura 13F). IAPAR 59 apresentou perfil decrescente a partir de 12h pós-inoculação na inoculação simulada, no qual obteve maior expressão de transcritos (Figura 13E). Isso pode estar relacionado com a diminuição de  $\text{NH}_4^+$  para o patógeno. Além disso, em condição nutricional deficiente e em tecidos infectados com a ferrugem, em um estágio inicial de infecção (12h), os transcritos de *CaNR* foram maiores para o genótipo suscetível (Figura 13F), já o genótipo IAPAR 59 manteve a expressão praticamente constante a partir de 12h (Figura 13E).

Comparando-se os fatores nutricionais, o gene *CaNR* apresentou redução na expressão de transcritos no regime com supressão de fontes de N para o genótipo IAPAR 59 (Figura 13E). Isso pode estar relacionado com a consequente redução da produção de NO e promoção da senescência das plantas pela influência da infecção da ferrugem e da supressão de fontes de N. Segundo Gupta et al. (2013) o desenvolvimento de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em fumo promove uma redução da produção de NO durante a HR e promove ativamente a senescência em plantas. Em paralelo, houve um aumento dos níveis de RNAm do gene *CaAS* no genótipo Catuaí Vermelho IAC 99 (Figura 13H), o que está de acordo com o observado por Fernandez et al. (2012), onde *AS* foi considerado um dos genes mais ativos em folhas de *C. arabica* infectadas com ferrugem. No entanto, em ambos os regimes de N, o gene *CaNR* foi o que apresentou maior expressão de genes.

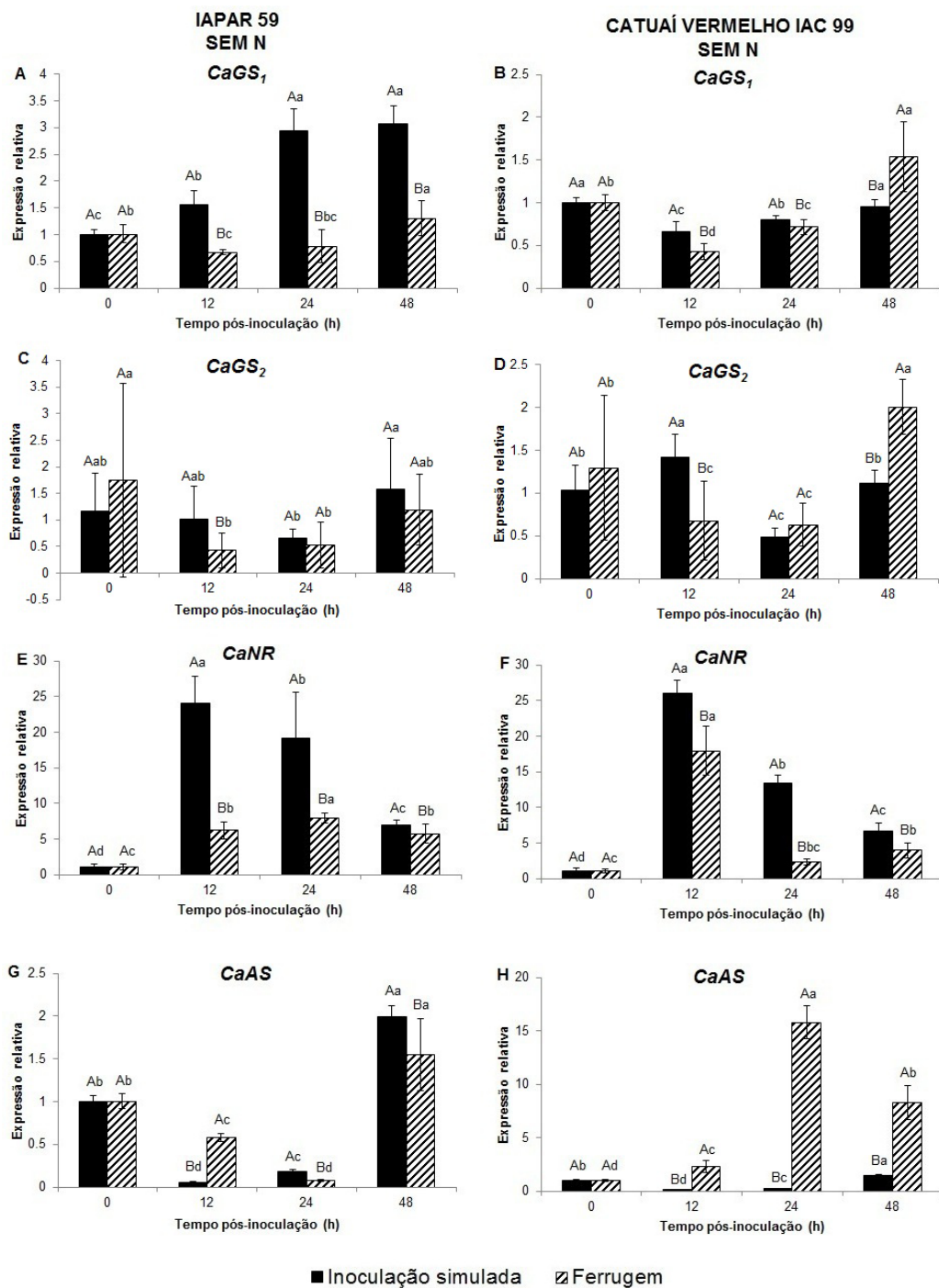
Em Catuaí Vermelho IAC 99 houve picos de expressão do gene *CaAS* a partir de 12h pós-inoculação na presença do patógeno, com elevação dos níveis de RNAm em 24h (Figura 13H). Isso pode estar relacionado com a realocação de nutrientes e com a resposta tardia do genótipo suscetível, em condições de deficiência de N para o gene *CaAS*. O genótipo IAPAR 59 foi influenciado pelo patógeno em 12h pós-inoculação. Em 24h houve uma redução transcricional e um pico de expressão em 48h (Figura 13G). Além disso, nessas condições de N, o genótipo suscetível elevou em 10 vezes seus níveis transcricionais, em relação ao genótipo resistente.

Olea et al. (2004) sugerem que a asparagina é o principal veículo para transporte de N em plantas e está envolvido em outros eventos de mobilização de N, tais como senescência natural, deficiência de açúcar, transições claro/ escuro

e pós-colheita. Além disso, a principal via de biossíntese de asparagina em plantas ocorre através de asparagina sintetase dependente da biossíntese de glutamina.

Os dados obtidos por qPCR dos genes *CaGS<sub>1</sub>*, *CaGS<sub>2</sub>*, *CaNR* e *CaAS* em folhas de Catuaí Vermelho IAC 99 e IAPAR 59, nos regimes nutricionais diferenciados com inoculação simulada, ferrugem e não inoculado podem ser observados no anexo B.

**Figura 13** – Expressão relativa dos genes glutamina sintetase citosólica ( $CaGS_1$ ) (A e B), plastidial ( $CaGS_2$ ) (C e D), nitrato redutase ( $CaNR$ ) (E e F) e asparagina sintetase ( $CaAS$ ) (G e H) nos genótipos resistente (IAPAR 59) (A, C, E e G) e suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (B, D, F e H) à ferrugem em condições de deficiência de N com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. O tempo 0h foi utilizado como calibrador. Médias seguidas da mesma letra maiúscula, comparam o mesmo genótipo no mesmo tempo, não diferem significativamente pelo teste de LSD ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas da mesma letra minúscula, comparam o genótipo em relação ao tempo 0h, não diferem significativamente pelo teste de LSD ( $p < 0,05$ )



## 4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 4.5.1 Atividade *in vitro* de Glutamina Sintetase

Os níveis de RNAm dos genes *CaGS<sub>1</sub>* e *CaGS<sub>2</sub>* e a atividade *in vitro* de GS mostraram perfis semelhantes nos diferentes regimes nutricionais. Porém, a atividade *in vitro* de GS apresentou redução em condições de supressão de N (Figuras 14C e D), diferente do observado para os níveis transcricionais, principalmente de *CaGS<sub>1</sub>* (Figura 13A e B) e de *CaGS<sub>2</sub>* (Figura 13C e D) nessas mesmas condições. Segundo Pérez-Tienda et al. (2014), existem evidências que a atividade da GS não é apenas regulada ao nível de expressão de genes, mas também por meio de modificações pós-traducionais.

Assim como no trabalho de Pageau et al. (2006), Tavernier et al. (2007), demonstraram que a atividade total da GS diminuiu com o progresso da doença na planta, sugerindo que assimilação primária de N através da via GS2/GOGAT foi afetada pela infecção do patógeno nos tecidos foliares de feijão, e que a remobilização de N certamente foi induzida. Da mesma forma nesse trabalho, nota-se, no geral, uma redução da atividade total de GS em 12h pós-inoculação para os genótipos avaliados (Figura 14) e principalmente em condições de deficiência de fontes de N (Figuras 14C e D). Segundo Pérez-Tienda et al. (2014) o ciclo GS/GOGAT desempenha um papel importante na assimilação de  $\text{NH}_4^+$  e independentemente do fornecimento de N, *OsGS1;2* e *OsGOGAT1* são as principais enzimas responsáveis pela assimilação primária de N em raízes de arroz.

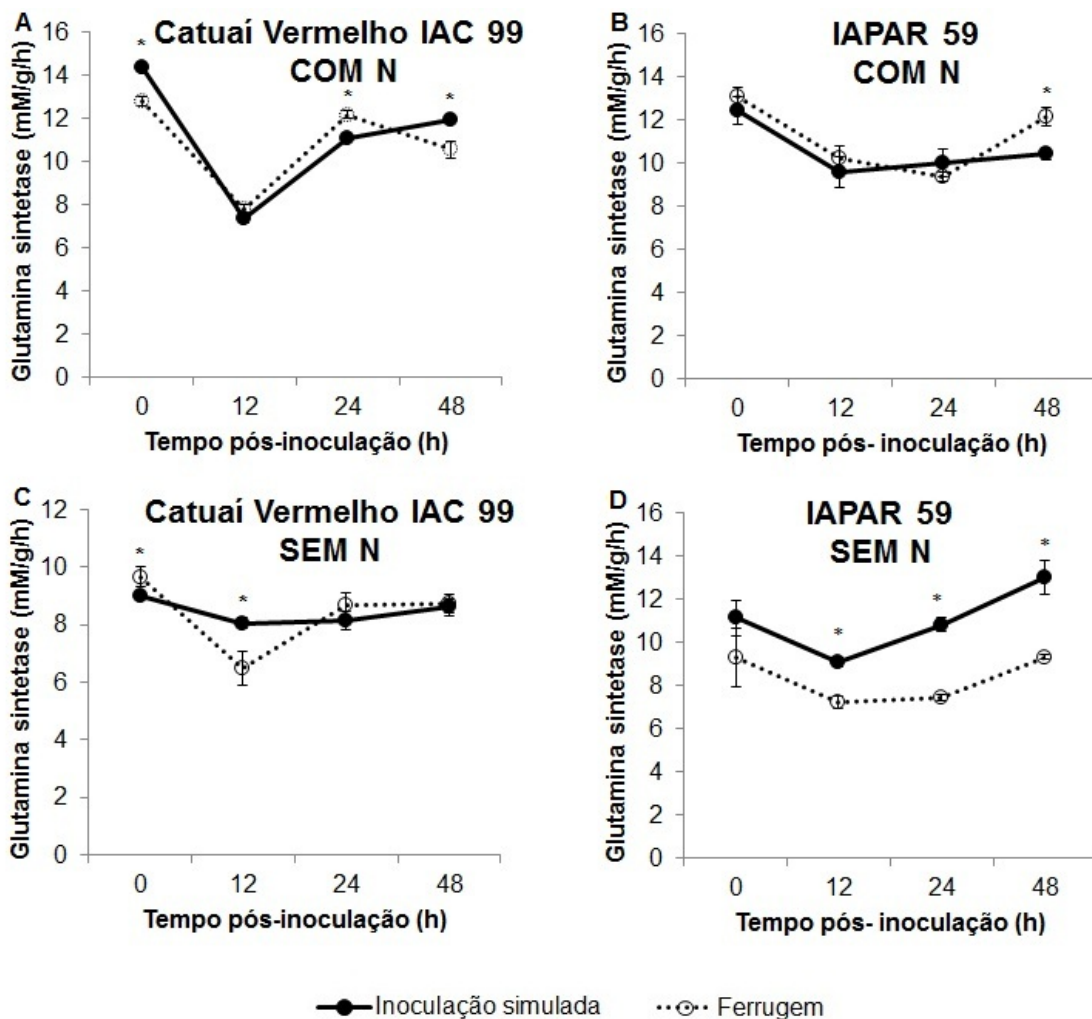
Foi observado variações nos regimes nutricionais diferenciais, entre os genótipos e as inoculações (Figura 14). Em condições de suficiência de fontes de N, o genótipo Catuaí Vermelho IAC 99 apresentou diferenças significativas entre a inoculação simulada e com o fungo em 0, 24 e 48h pós-inoculação (Figura 14A). Em 12h pós-inoculação ocorreu uma drástica redução da atividade em ambas as inoculações (Figura 14A). Já o genótipo IAPAR 59 apresentou diferença significativa 48h pós-inoculação (Figura 14B).

Em condições de supressão de fontes de N houve diferença significativa entre a inoculação simulada e com o patógeno para o genótipo suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) em 0 e 12 h após a inoculação (Figura 14C) e 12, 24 e 48h para o genótipo resistente (Figura 14D). De uma forma semelhante

como durante a senescência, a atividade de GS de tecidos foliares infectados diminuiu (Figura 14), principalmente para o genótipo suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) em supressão de fontes de N (Figura 14C).

Dados da atividade *in vitro* de glutamina sintetase com a inoculação simulada e o não inoculado em folhas de *C. arabica* cv Catuaí Vermelho IAC 99 e IAPAR 59 podem ser observadas no anexo C.

**Figura 14** – Atividade *in vitro* de glutamina sintetase em folhas de cafeeiro dos genótipos suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) e resistente (IAPAR 59) à ferrugem em condições de nutrição completa (A e B) e deficiência de N (C e D) com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. As barras verticais indicam os valores apresentados pela média  $\pm$  erro padrão (n=3) de glutamina sintetase para cada tempo pós-inoculação e genótipo. Os dados marcados com \* apresentam diferença estatística pelo teste de LSD com  $p < 0,05$



#### 4.5.2 Concentração de Clorofila Total

A concentração de clorofila total em tecidos foliares de cafeeiro foi influenciada pela supressão de fontes de N e pelo genótipo. As concentrações de clorofila total, *a* e *b*, diminuíram notavelmente com a deficiência de N (Figuras 15 e 16). Essa mudança no teor de clorofila total se relaciona com a diminuição da atividade fotossintética durante o desenvolvimento foliar (CABELLO et al., 2006), com a supressão de fontes de N e com a infecção da ferrugem nos tecidos foliares. A deficiência de N em plantas provoca uma diminuição fotossintética dos compostos estruturais, como a clorofila e ribulose bisfosfato carboxilase (rubisco), a qual conduz a uma redução na capacidade fotossintética e eficiência de carboxilação (WICKERT et al., 2007). Para ambos os regimes nutricionais, a concentração de clorofila *a* foi superior em comparação com a clorofila *b* (Figuras 15C, D, E e F ; 16C, D, E e F).

Dados da clorofila total, *a* e *b* em folhas com inoculação simulada e o não inoculado de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 99 e IAPAR 59 podem ser observados nos anexos D (com fontes de N) e E (com supressão de fontes de N).

##### 4.5.2.1 Condições de suficiência de fontes de N

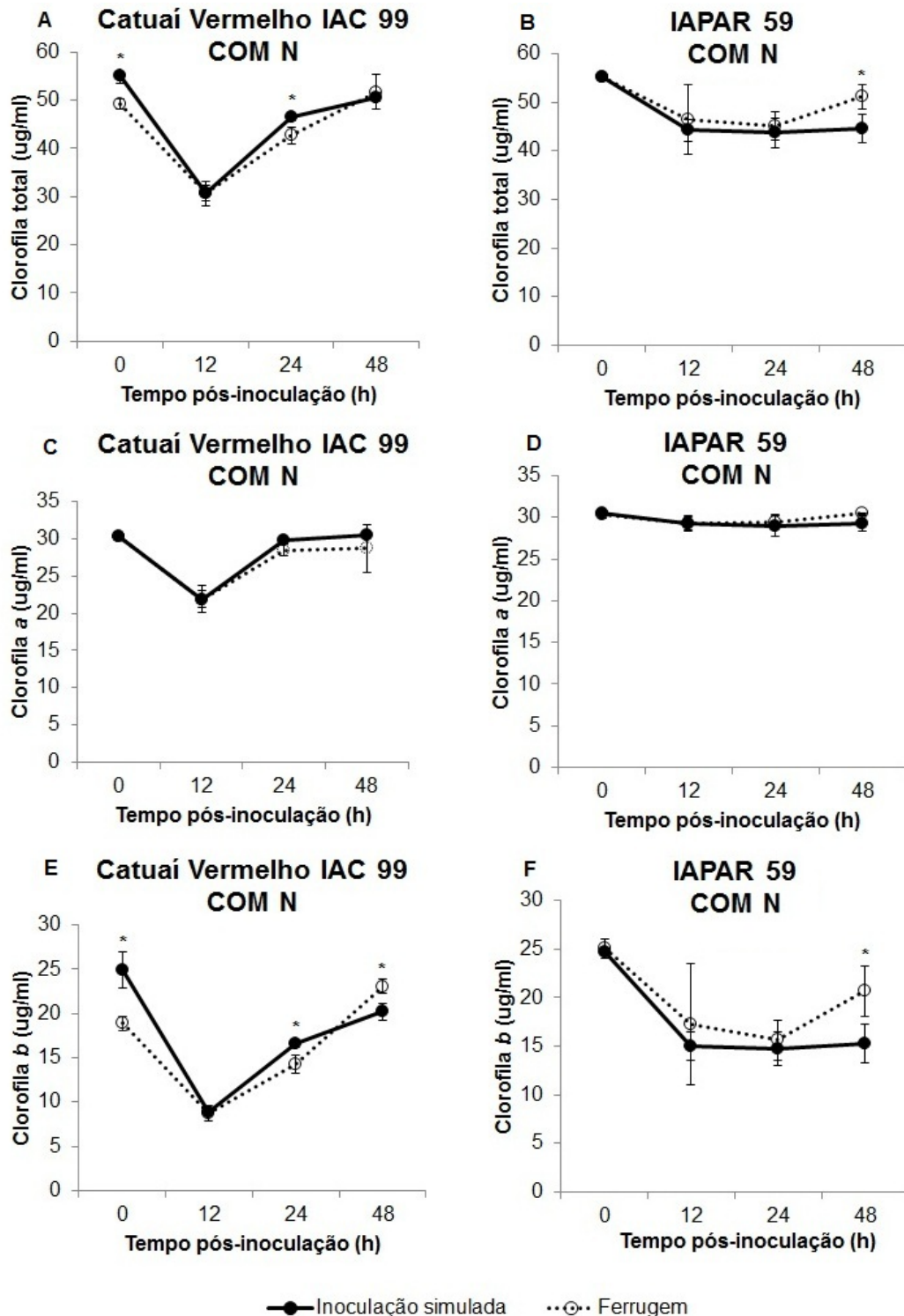
A concentração de clorofila total nas folhas de cafeeiro em condições de suficiência de fontes de N apresentaram diferenças entre os tempos pós-inoculação e entre a inoculação simulada e com ferrugem (Figura 15). Por outro lado, as concentrações de clorofila total, *a* e *b* foram similares em folhas de ambas as cultivares, onde se observaram 55, 30 e 25 ug/ ml, respectivamente, no início do tratamento para a inoculação simulada (Figura 15). No entanto, a concentração foi reduzida com 12h pós-inoculação para ambos os genótipos e inoculações (Figura 15). A perda rápida de clorofila pode ser considerada como um biomarcador utilizado para estabelecer o começo da senescência em plantas (CABELLO et al., 2006).

Entre os genótipos pode se observar uma variação maior nos tempos pós-inoculação no genótipo suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) em comparação ao genótipo IAPAR 59, no qual o primeiro apresentou uma redução da concentração de clorofila em 12h pós-inoculação e aumento em 24 e 48h para inoculação simulada e ferrugem (Figuras 15A, C e E). O genótipo resistente apresentou queda da concentração de clorofila em 12h pós-inoculação e constância

em 24 e 48h, em geral, para ambas as inoculações (Figuras 15B, D e F). MAAROUFI-DGUIMI et al. (2011) também observaram redução na concentração de clorofila total em 24h após estresse salino em folhas de *A. thaliana*.

O genótipo Catuaí Vermelho IAC 99 apresentou maior concentração de clorofila total e *b* para a inoculação simulada em 0 e 24h pós-inoculação (Figuras 15A e E) e em 48h na presença do patógeno para concentração de clorofila *b* (Figura 15E). Já o genótipo resistente apresentou maior concentração de clorofila total e *b* em 48h pós-inoculação em tecidos foliares infectados com a ferrugem (Figuras 15B e F).

**Figura 15** – Concentração de clorofila total, *a* e *b* em folhas de cafeeiro dos genótipos suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (A, C e E) e resistente (IAPAR 59) (B, D, e F) à ferrugem em condições de nutrição completa com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. As barras verticais indicam os valores apresentados pela média  $\pm$  erro padrão (n=3) de clorofila total, *a* e *b* para cada genótipo e tempo pós-inoculação. Os dados marcados com \* apresentam diferença estatística pelo teste de LSD com  $p < 0,05$



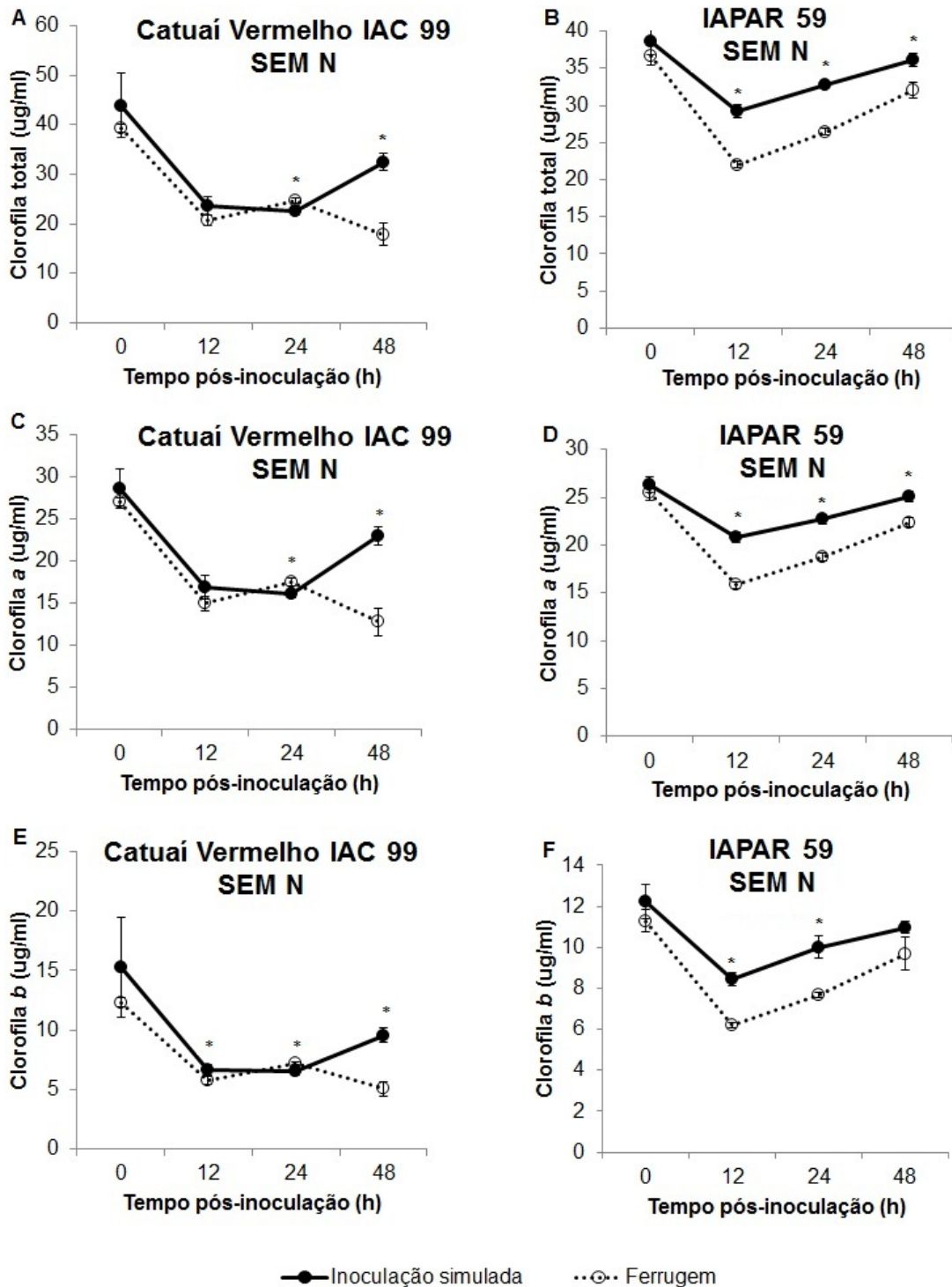
#### 4.5.2.2 Condições de supressão de fontes de N

A mesma avaliação de clorofila total foi realizada em condições de supressão de fontes de N, onde foi possível observar variações entre os genótipos, no qual o Catuaí Vermelho IAC 99 foi superior em comparação ao IAPAR 59 (Figura 16). Para ambos os genótipos houve uma redução da concentração de clorofila em 12h pós-inoculação tanto para a inoculação simulada como para ferrugem (Figura 16). Catuaí Vermelho IAC 99 apresentou constância em 24h, seguido de um aumento em 48h para a inoculação simulada (Figura 16A, C e E). Diferentemente, os teores de clorofila diminuíram em 48h com a inoculação de *H. vastatrix* (Figuras 16A, C e E). O genótipo resistente (IAPAR 59) apresentou diminuição da concentração de clorofila em 12h pós-inoculação seguidos de aumento em 24 e 48h, para inoculação simulada e com o patógeno (Figura 16B, D e F).

Houve diferenças significativas da concentração de clorofila total e *a* entre as inoculações em 24 e 48h pós-inoculação para Catuaí Vermelho IAC 99 (Figura 16A e C), além de 12h para clorofila *b* (Figura 16E). IAPAR 59 apresentou diferenças significativas entre as inoculações nos tempos de 12, 24 e 48h para as concentrações de clorofila total e *a* (Figura 16B e D) e em 12 e 24h para clorofila *b* (Figura 16F).

Como descrito anteriormente, as concentrações de clorofila nas folhas de cafeeiro diminuíram com a deficiência de fontes de N (Figuras 15 e 16), no qual o genótipo IAPAR 59 apresentou menor concentração de clorofila total, *a* e *b* em tecidos infectados pela ferrugem (Figuras 16B, D e F), sugerindo que a degradação de componentes celulares foi acelerada pela doença, diferentemente em condições de suficiência de fontes de N, para o mesmo genótipo.

**Figura 16** – Concentração de clorofila total, *a* e *b* em folhas de cafeeiro dos genótipos suscetível (Catuaí Vermelho IAC 99) (A, C e E) e resistente (IAPAR 59) (B, D, e F) à ferrugem em condições de deficiência de N com inoculação simulada e com *Hemileia vastatrix*. As barras verticais indicam os valores apresentados pela média  $\pm$  erro padrão (n=3) de clorofila total, *a* e *b* para cada genótipo e tempo pós-inoculação. Os dados marcados com \* apresentam diferença estatística pelo teste de LSD com  $p < 0,05$



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados de qPCR evidenciaram que os genes *CaGS<sub>1</sub>*, *CaGS<sub>2</sub>*, *CaNR* e *CaAS* sofreram regulações transcricionais distintas, sugerindo que a assimilação de N é influenciada tanto pelo genótipo como pelo regime nutricional do cafeeiro em condição de estresse biótico pela infecção da ferrugem.

O gene *CaNR* apresentou níveis transcricionais mais elevados em condições de suficiência e de supressão de fontes de N para ambos os genótipos. E o nível transcricional de *CaGS<sub>1</sub>* foi o mais baixo em ambos os regimes nutricionais.

A supressão de N resultou no aumento da expressão de *CaGS<sub>1</sub>*, e de *CaNR* e *CaAS* para Catuaí Vermelho IAC 99; diminuição do nível de RNAm de *CaGS<sub>2</sub>*, e de *CaNR* e *CaAS* para IAPAR 59; diminuição na atividade *in vitro* de GS total e diminuição das concentrações de clorofila total, *a* e *b*.

O efeito da ferrugem em folhas de cafeeiro influenciou na expressão dos genes *CaGS<sub>1</sub>* para IAPAR 59 (resistente) e do gene *CaNR* para Catuaí Vermelho IAC 99 (suscetível), em condições de suficiência de fontes de N. Já em condições de deficiência de N, o patógeno influenciou na expressão do gene *CaAS* para IAPAR 59, e dos genes *CaGS<sub>1</sub>*, *CaGS<sub>2</sub>* e *CaAS* para Catuaí Vermelho IAC 99. A expressão de genes no genótipo resistente foi superior em relação ao suscetível em condições de suficiência e supressão de N, exceto para o gene *CaAS* na ausência desse nutriente.

As duas isoformas de GS foram diferencialmente reguladas pelos genótipos de cafeeiro quanto a resistência à ferrugem e aos regimes nutricionais, no qual *CaGS<sub>2</sub>* foi superior em relação a *CaGS<sub>1</sub>*, principalmente em condições de suficiência de N.

Com base nesses resultados, abre-se, assim, a perspectiva de futuros estudos na compreensão de respostas fisiológicas e moleculares sobre a interação nutrição mineral e ferrugem do cafeeiro em diferentes genótipos. A compreensão do envolvimento de nutrientes minerais na resposta a estresses bióticos proporcionará maneiras de minimizar os danos causados por esses patógenos, definir estratégias de adubação mais balanceada e auxiliar na obtenção de plantas mais eficientes na absorção de N.

## REFERÊNCIAS

- ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). Indicadores da indústria de café no Brasil- 2012. **Desempenho da Produção e Consumo Interno**. Período de Novembro/ 2011 a Outubro/ 2012.
- AGRIOS, G.N. Plant diseases caused by fungi. In: **Plant pathology**. 5th ed. p 4 - 922, 2005.
- ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; ASTORGA, C.; BERTRAND, B.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 104, p. 894–900, 2002.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**. n.1, v. 24, 1949.
- AZINHEIRA, H.G.; SILVA, M.C.; TALHINHAS, P.; MEDEIRA, C.; MAIA, I.; PETIOT A-S.; FERNANDEZ, D. Non-host resistance responses of *Arabidopsis thaliana* to the coffee leaf rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Botany**. v. 88, p. 621–629, 2010.
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C.F.; SEVERINO, F.E.; MALUF, M.P.; MAIA, I.J. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**. v. 10, p. 1-11, 2009.
- BERNARD, S.M.; MOLLER, A.L.B.; DIONISIO, G.; KICHEY, T.; JAHN, T.P.; DUBOIS, F.; BAUDO, M.; LOPES, M.S.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; FOYER, C.H. PARRY, M.A.J.; FORDE, B.G.; ARAUS, J.L.; HIREL, B.; SCHJOERRING, J.K.; HABASH, D.Z. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Molecular Biology**. v. 67, p. 89–105, 2008.
- BERNARD, S.M.; HABASH, D.Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**. v. 182, p. 608–620, 2009.
- BETTENCOURT, A.J.; RODRIGUES JR., C.J. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Eds.), **Coffee Agronomy**. v. 4, p. 199–234, 1988.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
- BRYANT, J.P.; CHAPION, F.S.; KLEIN, D.R. Carbon/nutrient balance in boreal plants in relation to vertebrate herbivory. **Oikos**. v.4, p.357-368, 1983.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. v. 55, p. 611–622, 2009.

- CABELLO, P.; AGUERA, E.; DE LA HABA, P. Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. **Physiologia Plantarum**. v. 128, p. 175–185, 2006.
- 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. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. v. 44, n.3, p.276-282, 2009.
- CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M.; CASTRO, H.A.; CARVALHO V.D. Influência de diferentes níveis de produção sobre a evolução da ferrugem-do-cafeeiro e sobre teores foliares de compostos fenólicos. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 25, p. 49-54, 2001.
- CARVALHO, C.H.S. et al. Cultivares de Café Arábica de Porte Baixo. In: CARVALHO, C.H.S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília, DF: Embrapa Café, p.27- 334. 2008.
- CARVALHO, K.; BESPALHOK FILHO, J.C.; DOS SANTOS, T.B.; DE SOUZA, S.G.H.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; DOMINGUES, D.S. Nitrogen starvation, salt and heat stress in Coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and validation of new genes for qPCR normalization. **Molecular Biotechnology**. v. 53, p. 315–325, 2013.
- CHANG, S.; PURYERAR, J.; CAIRNEY, J. A single and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology**. v.11, p.113-116, 1993.
- CHOW, F.; DE OLIVEIRA, M.C.; PEDERSÉN, M. In vitro assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*, **Journal of Plant Physiology**. v. 161, n. 7, p. 769-776, 2004.
- CHOW, F.; CAPOCIAMA, F.V.; FARIA, R.; de OLIVEIRA, M.C. Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, racilariales). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 30, p. 123-129, 2007.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458–460, 1975.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira Café, Safra 2013**, Quarto levantamento, Dezembro/2013.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira Café, V. 1- Safra 2014**, N. 1 - Primeiro Levantamento, Janeiro/2014.
- CRUZ, J.L.; MOSQUIM, P.R.; PELACANI, C.R.; ARAÚJO, W.L.; DaMATTa, F.M. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. **Biologia plantarum**. n. 48, v.1, p. 67-72, 2004.
- CRUZ, F.; KALAOUN, S.; NOBILE, P.; COLOMBO, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L.M.G.; ROMANO, E.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; VASLIN, M.; ALVES-FERREIRA, M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**. n. 23, p. 607–616, 2009.

- DEBOUBA, M.; DGUIMI, H.M.; GHORBEL, M.; GOUIA, H.; SUZUKI, A. Expression pattern of genes encoding nitrate and ammonium assimilating enzymes in *Arabidopsis thaliana* exposed to short term NaCl stress. **Journal of Plant Physiology**. v. 170, p. 155–160, 2013.
- DEL GROSSI, L.; SERA, T.; SERA, G.H.; FONSECA, I.C.DE B.; ITO, D.S.; SHIGUEOKA, L.H.; ANDREAZI, E.; CARVALHO, F.G. Rust Resistance in arabic coffee cultivars in northern Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.56, n.1, p. 27-33, 2013.
- DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A.; LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 98, p. 13454-13459, 2001.
- DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. **Plant, Cell and Environment**. v. 28. p. 211–222, 2005.
- DINIZ, I.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.G.; VÁRZEA, V.; MEDEIRA, C.; MAIA, I. PETITOT, A.-S.; NICOLE, M.; FERNANDEZ, D.; SILVA, M.C. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. **Plant Pathology**. v. 133, p. 141–157, 2012.
- DIOLA, V.; de BRITO, G.G.; CAIXETA, E.T.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; SAKIYAMA, N.S.; LOUREIRO, M.E. High-density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. **Tree Genetics & Genomes**. v. 7, p. 1199–1208, 2011.
- DIOLA, V.; BRITO, G.G.; CAIXETA, E.T.; PEREIRA, L.F.P.; LOUREIRO, M.E. A new set of differentially expressed signaling genes is early expressed in coffee leaf rust race II incompatible interaction. **Functional & Integrative Genomics**. v. 13, p. 379–389, 2013.
- DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in Genetics**. v. 28. p. 166–234, 1990.
- DUKE S.H.; DUKE, S.O. Light control of extractable nitrate reductase activity in higher plants. **Physiologia Plantarum**. v. 62, p. 485–493, 1984.
- FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BOM, M-C.; PETITOT, A-S.; SILVA, M.D.C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**. v. 5, p. 527–36, 2004.
- FERNANDEZ, D.; TISSERANT, E.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.; VIEIRA, A.; PETITOT, A-S.; LOUREIRO, A.; POULAIN, J.; DA SILVA, C.; SILVA, M.D.C.; DUPLESSIS, S. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant–rust interaction. **Molecular Plant Pathology**. v. 13, p. 17–37, 2012.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. Ciência e Agrotecnologia (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

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**. v. 170, p. 1045–51, 2006.

GARCIA, D.J.; POZZA, E.A.; POZZA, A.A.A.; SOUZA, P.E.; CARVALHO, J.G.; BALIERO, A.C. Incidência e severidade da cercosporiose-do-cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**. v.28, n.3, p.286-291, 2003.

GODOY, C.V.; BERGAMIM FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In: **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Editora Ceres. v. 2, p. 184-2000, 1997.

GUERRA-GUIMARÃES, L. **Proteínas relacionadas com a patogenicidade na interação cafeeiro-ferrugem alaranjada**. Univ. Lisboa, Faculdade de Ciências, Portugal, p. 101, 2004.

GUPTA, K.J.; BROTMAN, Y.; SEGU, S.; ZEIER, T.; ZEIER, J.; PERSIJN, S.T.; CRISTESCU, S.M.; HARREN, F.J.M.; BAUWE, H.; FERNIE, A.R.; KAISER, W.M.; MUR, L.A.J. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco. **Journal of Experimental Botany**. v. 64, n. 2, p. 553–568, 2013.

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

HERMS, D.A.; MATTSON, W.J. The dilemma of plants: to grow or defend. **Quarterly Review of Biology**. n. 67, p. 283-335, 1992.

HERRERA-RODRIGUEZ, M.B.; MALDONADO, J.M.; PEREZ-VICENTE, R. Light and metabolic regulation of *HAS1*, *HAS1.1* and *HAS2*, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 42, p. 511–518, 2004.

HERRERA-RODRIGUEZ, M.B.; MALDONADO, J.M.; PEREZ-VICENTE, R. Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. **Journal of Plant Physiology**. v. 163, P. 1061–1070, 2006.

HILLOCKS, R.J.; PHIRI, N.A.; OVERFIELD, D. Coffee pest and disease management options for smallholders in Malawi. **Crop Protection**. v. 18, p. 199-206, 1999.

HOFFLAND, E.; JEGER, M.J.; VAN BEUSICHEM, M.L. Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. **Plant and Soil**. v. 218, p. 239–247, 2000.

- HONG, J.K.; YUN, B.W.; KANG, J.G.; RAJA, M.U.; KWON, E.; SORHAGEN, K.; CHU, C.; WANG, Y.; LOAKE, G.J. Nitric oxide function and signaling in plant disease resistance. **Journal of Experimental Botany**. v. 59, p. 147-154, 2007.
- HORST, R.J.; DOEHLEMANN, G.; WAHL, R.; HOFMANN, J.; SCHMIEDL, A.; KAHMANN, R.; KÄMPER, J.; SONNEWALD, U.; VOLL, L.M. *Ustilago maydis* infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. **Plant Physiology**. v. 152. p. 293–308, 2010.
- HUBER D.M.; WATSON, R.D. Nitrogen form and plant disease. **Annual Review of Phytopathology**. v. 12, p. 139-165, 1974.
- HUBER, D.M.; WILHELM, N.S. The role of manganese in resistance to plant diseases. In: GRAHAM, E.R.D.; HANNAN, R.J.; UREN, N.C. **Manganese in Soils and Plants**. p. 155–173, 1988.
- HWANG, I.S.; HYUN, S.; HWANG, B.K. Pepper *asparagine synthetase 1 (CaAS1)* is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. **The Plant Journal**. v. 67, p. 749–762, 2011.
- ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; WATANABE-TAKAHASHI, A.; OBARA, M.; YAMAYA, T.; TAKAHASHI, H. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 16598–16605, 2004.
- JENSEN, B.; MUNK, L. Nitrogen induced changes in colony density and spore production of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* on seedlings of six spring barley cultivars. **Plant Pathology**. v. 46, p. 191–202, 1997.
- KUSHALAPPA, A.C.; ESKES, A.B. Advances in coffee rust research. **Annual Review of Phytopathology**. v. 27, p. 503-531, 1989a.
- KUSHALAPPA, A.C.; ESKES, A.B. Introduction. In: KUSHALAPPA, A.C. **Coffee Rust: Epidemiology, Resistance, and Management**. Boca Raton, Florida. p. 1-12, 1989b.
- KRUGNER, T. L. Ação do ambiente sobre doenças de plantas. In: GALLI, F. (Coord.). **Manual de fitopatologia**. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 1, p. 215-225, 1978.
- LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Plant Physiology**. v. 47, p. 569–593, 1996.
- LASA, B.; FRECHILLA, S.; APARICIO-TEJO, P.M.; CARMEN-LAMSFUS, C. Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ammonium nutrition tolerance in roots. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 40, p. 969-976, 2002.
- LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**. v. 149, p. 243–247, 2006.

LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M.; MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 18, p. 229-242, 2006.

LIGHTFOOT, D.A. Nitrogen Fixation and Assimilation. In: KOLE, C. **Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops**. v. 2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 395-413, 2013.

LILLO, C. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. **Biochemical Journal**. v. 415, p. 11-19, 2008.

LONG, D.H.; LEE, F.N.; TE BEEST, D.O. Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. **Plant Disease**. v. 84. p. 403–409, 2000.

MAAROUFI-DGUIMI, H.; DEBOUBA, M.; GAUFICHON, L.; CLÉMENT, G.; GOUIA, H.; HAJJAJI, A.; SUZUKI, A. An Arabidopsis mutant disrupted in *ASN2* encoding asparagine synthetase 2 exhibits low salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 49, 623–628, 2011.

MAATHUIS, F.J.M.; DIATLOFF, E. Roles and Functions of Plant Mineral Nutrients. In: MAATHUIS, F.J.M. **Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols**. University of York, York, UK, p. 1-22, 2013.

MASCAGNI JR., H.J.; HARRISON, S.A.; RUSSIN, J.S.; DESTA, H.M.; COLYER, P.D.; HABETZ, R.J.; HALLMARK, W.B.; MOORE, S.H.; RABB, J.L.; HUTCHINSON, R.L.; BOQUET, D.J. Nitrogen and fungicide effects on winter wheat produced in the Louisiana Gulf Coast region. **Journal of Plant Nutrition**. v. 20, p. 1375–139, 1997.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**. v. 105 n. 7, p. 1141-1157, 2010.

MCNALLY, S.F.; HIREL, B.; STEWART, G.R. Nitrogen-metabolism in halophytes. 5. The occurrence of multiple forms of glutamine-synthetase in leaf tissue. **New Phytologist**. v. 94, p. 47–56, 1983.

MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 979-987, 2002.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F. **Análise química de tecido vegetal**. Londrina: IAPAR, 1992. p. 17 (IAPAR. Circular, 74).

MODOLO, L.V.; AUGUSTO, O.; ALMEIDA, I.M.G.; MAGALHAES, J.R.; SALGADO, I. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*, **FEBS Letters**, v. 579, n. 17, p. 3814-3820, 2005.

MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; TOKUDA, E.K.; PARIZZI, L.P.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; LUIZ GE VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**. p. 11-30, 2011.

OLEA, F.; PÉREZ-GARCÍA, A.; CANTÓN, F.R.; RIVERA, M.E.; CAÑAS, R.; ÁVILA, C.; CAZORLA, F.M.; CÁNOVAS, F.M.; DE VICENTE, A. Up-Regulation and localization of Asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant and Cell Physiology**. v. 45, n. 6, p. 770-780, 2004.

OLIVEIRA, H.C.; SAVIANI, E.E.; OLIVEIRA, J.F.P.; SALGADO, I. Nitrate reductase-dependent nitric oxide synthesis in the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. **Tropical Plant Pathology**. v. 35, n. 2, p. 104-107, 2010.

PAGEAU, K.; REISDORF-CREN, M.; MOROT-GAUDRY, J-F.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, n. 3, p. 547–557, 2006.

PÉREZ-GARCÍA, A.; CANOVAS, F.M.; GALLARDO, F.; HIREL, B.; de VICENTE, A. Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.8. p. 96–103, 1995.

PÉREZ-GARCÍA, A.; PEREIRA, S.; PISSARRA, J.; GARCÍA GUTIERREZ, A.; CAZORLA, F.M.; SALEMA, R.; de VICENTE, A.; CANOVAS, F.M. Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. **Planta**. p. 426–434, 1998.

PÉREZ-TIENDA, J.; CORRÊA, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Transcriptional regulation of host  $\text{NH}_4^+$  transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 75, p. 1–8, 2014.

PETITOT, A-S., LECOULS, A-C., FERNANDEZ, D. Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. **Tree Genetics and Genomes**. v. 4, p. 379–90, 2008.

POMPELLI, M.F.; MARTINS, S.C.V.; ANTUNES, W.C.; AGNALDO R.M.; CHAVES, A.R.M.; DaMATTI, F.M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal of Plant Physiology**. v. 167, p. 1052–1060, 2010.

PRETTY, K.M. O potássio e a qualidade da produção agrícola. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MUZILLI, O.; USHERWOOD, N.R. (Coords.). **O potássio na agricultura brasileira**. p. 177-199, 1982.

RAMAKERS, C.; RUIJTERA, J.M.; DEPREZA, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**. v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RAMIRO, D.; ESCOUTE, J.; PETITOT, A-S.; NICOLE, M.; MALUF, M.; FERNANDEZ, D. Biphasic haustorial differentiation of the orange rust *Hemileia vastatrix* race II associated with differential defense responses in resistant coffee cultivar. **Plant Pathology**. v. 58, p. 944–955, 2009.

REIS, A.R.; FAVARIN, J.L.; GALLO, L.A.; MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F.; LAVRES JR., J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in Coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 33, p. 315-324, 2009.

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

RIJO, L.; RODRIGUES JR., C. J. Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* Berk. ; Br. em cultivares susceptíveis e resistentes de *Coffea arabica* L. **Sep. Garcia da Orta**, Sér. Estação Agronômica, v. 5, p. 23-24, 1978.

RIJO, L.; SILVA, M.C.; VASCONCELOS, M.I. Alguns aspectos morfológicos e citológicos do uredósforo e tubo germinativo de *Hemileia vastatrix* e da reação de incompatibilidade da associação *Coffea* spp. – *H. vastatrix*. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 13, p. 169-178, 1990.

RODRIGUES JR, C. J.; BETTENCOURT, A.J.; RIJO, L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. **Annual Review of Phytopathology**. v. 13, p. 49–70, 1975.

SALGADO, I.; MODOLO, L.V.; AUGUSTO, O.; BRAGA, M.R.; OLIVEIRA, H.C. Mitochondrial nitric oxide synthesis during plant-pathogen interactions: Role of nitrate reductase in providing substrates. In: LAMATTINA, L.; POLACCO, J.C. (Eds.) **Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology**. Berlin. Springer Verlag. p. 239-254, 2006.

SERA, G.H.; SERA, T.; FONSECA, I.C. de B.; ITO, D.S. Resistência à ferrugem alaranjada em cultivares de café. **Coffee Science**. v. 5, n. 1, p. 59-66, 2010.

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

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. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 60, p. 169-183, 2002.

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

SILVA, M.C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; LOUREIRO, A.; NICOLE, M. Involvement of peroxidases in the hypersensitive reaction of coffee plants to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology.** v. 72, p. 29–38, 2008.

SINGH, K.K.; GHOSH, S. Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under water deficit conditions. **Plant Cell Reports.** v. 32, p. 183–193, 2013.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science.** v. 268, p. 661-67, 1995

STITT, M.; MULLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W-R.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany.** v. 53, p. 959–970, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos Secundários. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3ª Edição. Porto Alegre. p. 309-332, 2004.

TALUKDER, Z.I.; MCDONALD, A.J.S.; PRICE, A.H. Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL - environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. **New Phytologist.** v. 168, p. 455–464, 2005.

TAMAYO, P.J. **Resistência de Progênes de Catimor a Oito Raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.** Tese M.Sc. UFV, Viçosa, MG. p. 64, 1988.

TAVERNIER, V.; CADIOU, S.; PAGEAU, K.; LAUGE, R.; REISDORF-CREN, M.; LANGIN, T.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. **Journal of Experimental Botany.** v. 58, p. 3351–3360, 2007.

VÁRZEA, V.M.P.; RODRIGUES JR., C.J.; SILVA, M.C.; GOUVEIA, M.; MARQUES, D.V.; GUERRA- GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: ZAMBOLIM, L. **O estado da arte da tecnologia na produção de café.** Universidade Federal de Viçosa, Brasil. p. 270-320, 2002.

VÁRZEA, V.M.P.; MARQUES, D.V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M., VÁRZEA, V.M.P. **Durable Resistance to Coffee Leaf Rust.** Viçosa: UFV. p. 53-74. 2005.

VIDAL, R.O.; MONDEGO. J.M.C.; POT, D.; AMBRÓSIO, A.B.; ANDRADE, A.C.; PEREIRA, L.F.P.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E; Carazzolle, M.F.; PEREIRA, G.A.G. High-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in coffee species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology,** v. 154, p. 1053-1066, 2010.

VIEIRA, L.G.E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiology*. v.18, n.1, p. 95-108, 2006.

VIEIRA, A.; TALHINHAS, P.; LOUREIRO, A.; THÜRICH, J.; DUPLESSIS, S.; FERNANDEZ, D.; SILVA, M.C.; PAULO, O.S.; AZINHEIRA, H.G.. Expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. *European Journal of Plant Pathology*. v. 133, p. 261–277, 2012.

WALLER, J. M. Control of Coffee Diseases. In: CLIFFORD, M.N.; WILSON, K.C. (eds.), **Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**. p. 220-225, 1985.

WICKERT, E.; MARCONDES, J.; LEMOS, M.V.; LEMOS, E.G.M. Nitrogen assimilation in Citrus based on CitEST data mining. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 3, p. 810-818, 2007.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters*. v. 468, p. 89-92, 2000.

YAMAYA, T.; OBARA, M.; NAKAJIMA, H.; SASKI, S.; HAYAKAWA, T.; SATO, T. Genetic manipulation and quantitative trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *Journal of Experimental Botany*. v. 53, p. 917–925, 2002.

ZAMBOLIM, L.; ACUÑA, R.S.; VALE, F.X.R.; CHAVES, G.M. Influência da produção do cafeeiro sobre o desenvolvimento da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). *Fitopatologia Brasileira*. v. 17, p. 32-35, 1992.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.D.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção de café com qualidade**. Viçosa: UFV, p.134-215, 1999.

ZAMBOLIM, L.; DO VALE, F.X.R.; COSTA, H.; PEREIRA, A.A.; 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**. Viçosa- MG, Brasil. UFV, p. 369–450, 2002.

ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M.; VÁRZEA, V.M.P. **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa: UFV. Oeiras: CIFC. p. 450, 2005.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*)

<b>EXPERIMENTAL DESIGN</b>
Definition of experimental and control groups
Number within each group
<b>Assay carried out by core lab or investigator's lab?</b>
<b>Acknowledgement of authors' contributions</b>
<b>SAMPLE</b>
Description
Volume/mass of sample processed
<b>Microdissection or macrodissection</b>
Processing procedure
If frozen - how and how quickly?
If fixed - with what, how quickly?
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE samples)

*C. arabica* plants cv. IAPAR 59 (resistant) and Catuaí Vermelho IAC 99 (susceptible) were used in different regimes of N sources: with and without restriction for 42 days. After this period, young leaves were inoculated with *H. vastatrix* race II and collected at 0, 12, 24 and 48 hours post-inoculation. Mock-inoculated and uninoculated leaves were used as controls. Tissues, (14 leaves), were harvested in the greenhouse and immediately frozen in liquid nitrogen, and transported to the Plant Biotechnology Laboratory of Instituto Agronômico do Paraná. Tissues were then stored in -80°C freezer until RNA extraction would be performed. Generally, storage did not exceed six months. The experimental design adopted for the analyzes was randomized considering the factors: two coffee genotypes, two different regimes of N sources, three different inoculations and 4 times post-inoculation. Leaf harvesting was done in “Instituto Agronômico de Campinas” and qPCR assays were carried out by the main author in Plant Biotechnology Laboratory of Instituto Agronômico do Paraná.

<b>NUCLEIC ACID EXTRACTION</b>
Procedure and/or instrumentation
Name of kit and details of any modifications
<b>Source of additional reagents used</b>
Details of DNase or RNase treatment
Contamination assessment (DNA or RNA)
Nucleic acid quantification
Instrument and method
<b>Purity (A260/A280)</b>
<b>Yield</b>
RNA integrity method/instrument

RIN/RQI or Cq of 3' and 5' transcripts
<b>Electrophoresis traces</b>
Inhibition testing (Cq dilutions, spike or other)

Tissues were ground into a powder in liquid nitrogen and total RNA was extracted as described by Chang et al. (1993), with adaptations. They were treated with DNase I (RNase-free – Invitrogen, Cat#EN0521) following the manufacturer's instructions. For each tissue, three independent RNA extractions were performed. All RNA samples were analyzed by formaldehyde agarose gel electrophoresis to assess their integrity. To test for contamination by polyphenols, carbohydrates and proteins, samples were evaluated by spectrophotometry in NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Only RNA samples with OD 260/280 > 1.8 and OD 260/230 > 2.2 were used for further analysis. Exact values for each RNA can be provided upon request. The yield is about 8,58 µg of RNA per 1 g of frozen powder for Catuaí Vermelho IAC 99 (susceptible) and 9,50 µg for IAPAR 59 (resistant).

<b>REVERSE TRANSCRIPTION</b>
Complete reaction conditions
Amount of RNA and reaction volume
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration
Reverse transcriptase and concentration
Temperature and time
<b>Manufacturer of reagents and catalogue numbers</b>
<b>Cqs with and without RT</b>
<b>Storage conditions of cDNA</b>

SuperScript™ III Reverse Transcriptase from Invitrogen (Cat#18080-093; 200U/ µl) was used for the generation of first strand cDNA in a 13 µl reaction volume. 2,5 µg of RNA, 0,5 µL of oligo(dT)<sub>20</sub> (50 µM) and 0,5 µl of dNTP mix (10 mM) were mixed, incubated at 65°C for 5 min, and quickly chilled on ice for 1 min. 2 µL of 5x Buffer, 0,5 µL of DTT 0,1M, and 0,5 µL of RNase OUT™ Recombinat RNase Inhibitor (Cat. no. 10777-019, 40U/ ul) and 0,5 ul of SuperScript™ III RT were added. The reaction mix was incubated at 50°C for 60 min, then at 70°C for 15 min. 1 ul (2U) of RNase H was added and incubate at 37°C for 20 min. cDNA was stored in low adhesion tubes at -20°C.

<b>qPCR TARGET INFORMATION</b>
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.
Sequence accession number
<b>Location of amplicon</b>
Amplicon length
<i>In silico</i> specificity screen (BLAST, etc)
<b>Pseudogenes, retropseudogenes or other homologs?</b>
<b>Sequence alignment</b>
<b>Secondary structure analysis of amplicon</b>

Location of each primer by exon or intron (if applicable)
What splice variants are targeted?

Multiplex qPCR was not performed. Information about genes, primer sequences, NCBI accession numbers, Arabidopsis ortholog, amplicon lengths and primer efficiency are included in Table 2 in the Material and Methods section. Primers were designed close to the 3'end of the gene. No splice variants were targeted. Primers were designed using Primer Express software (version 3.0, Applied Biosystems) according to parameters established to obtain amplicons of 100 bp with a  $T_m$  of 60°C (Table 2). The efficiency of each primer pair was calculated by LinReg software.

<b>qPCR OLIGONUCLEOTIDES</b>
Primer sequences
<b>RTPrimerDB Identification Number</b>
<b>Probe sequences</b>
Location and identity of any modifications
<b>Manufacturer of oligonucleotides</b>
<b>Purification method</b>

Primer sequences are included in Table 2 in the Material and Methods section. No modifications were used. Primers were purchased from Invitrogen, except CaAS, purchased from Macrogen and are salt-free.

<b>qPCR PROTOCOL</b>
Complete reaction conditions
Reaction volume and amount of cDNA/DNA
Primer, (probe), Mg <sup>++</sup> and dNTP concentrations
Polymerase identity and concentration
Buffer/kit identity and manufacturer
<b>Exact chemical constitution of the buffer</b>
Additives (SYBR Green I, DMSO, etc.)
<b>Manufacturer of plates/tubes and catalog number</b>
Complete thermocycling parameters
<b>Reaction setup (manual/robotic)</b>
Manufacturer of qPCR instrument

The PCR reactions were performed using 7500 Fast Real-Time PCR System, (Applied Biosystems) and white 96 well-plates. 12,5 µl of 2x SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific; #K0221), 0,5 ul of each primer (10uM), 1µl of cDNA at 5 ng/µl and milli-Q water to a total volume of 25 ul were then added to each well. PCR parameters were as follow: 10 min. at 95°C, followed by 30 sec. at 95°C for 40 cycles and 60 sec. at 60°C. For the dissociation curves, fluorescence was recorded continuously during a ramp from 60°C to 95°C. Melting curves were analyzed to verify the presence of a single product including a negative control. All

reactions were performed in triplicate for each of the three biological replicates in all treatments studied.

<b>qPCR VALIDATION</b>
<b>Evidence of optimisation (from gradients)</b>
Specificity (gel, sequence, melt, or digest)
For SYBR Green I, Cq of the NTC
Standard curves with slope and y-intercept
PCR efficiency calculated from slope
r <sup>2</sup> of standard curve
Linear dynamic range
Cq variation at lower limit
Evidence for limit of detection
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.

The specificity of the amplification of some products have been confirmed by analyzing their melting curves, by size estimations on a 2% agarose gel, and finally by sequencing of the products. Without a template, no Cq could be determined since it never passed the threshold line. PCR efficiencies are included in Table 2 in the Material and Methods section.

<b>DATA ANALYSIS</b>
qPCR analysis program (source, version)
Cq method determination
Outlier identification and disposition
Results of NTCs
Justification of number and choice of reference genes
Description of normalisation method
<b>Number and concordance of biological replicates</b>
Number and stage (RT or qPCR) of technical replicates
Repeatability (intra-assay variation)
<b>Reproducibility (inter-assay variation, %CV)</b>
<b>Power analysis</b>
Statistical methods for result significance
Software (source, version)
<b>Cq or raw data submission using RDML</b>

qPCR analysis program (source, version): 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems

Cq's were determined by setting the threshold manually, based on amplification curve

No data have been exclude from the calculations

Results of NTCs: no amplification products present thus no Cqs

Justification of number and choice of reference genes: 1 gene have been selected based on literature

Description of normalisation method: endogenous reference gene

Number and concordance of biological replicates: 3

Number and stage (RT or qPCR) of technical replicates: 3 at qPCR level, 1 for RT (Mn samples)

Repeatability (intra-assay variation): was below one Cq

Statistical methods for result significance: analysis of variance and the treatment means were compared using Fisher test (LSD) with a significance level of  $p < 0.05$

Software: Sisvar 5.3, Build 75

## ANEXO B

Dados de C<sub>q</sub> avaliados por qPCR de genes relacionados na assimilação de N com o efeito da ferrugem em dois genótipos com regimes nutricionais diferenciados

Fatores	(A) Catuaí Vermelho IAC 99- Sem N														
	Inoculação simulada					Ferrugem					Não inoculado				
	genes					genes					genes				
	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GM[C <sub>q</sub> ]	23.00	27.34	23.78	28.30	30.45	24.26	27.92	24.26	29.68	29.55	23.08	28.44	23.51	29.28	30.16
AM[C <sub>q</sub> ]	23.01	27.35	23.78	28.37	30.49	24.27	27.92	24.28	29.75	29.60	23.09	28.48	23.54	29.33	30.21
Min[C <sub>q</sub> ]	21.97	26.46	23.39	26.29	28.71	23.17	27.68	23.09	26.46	27.27	22.73	27.41	22.13	27.54	28.80
Max[C <sub>q</sub> ]	23.68	28.50	24.25	31.75	33.08	25.40	28.34	25.82	31.90	31.97	23.63	31.16	25.61	32.21	33.92
SD[±C <sub>q</sub> ]	0.46	0.51	0.27	1.66	1.41	0.47	0.18	0.75	1.57	1.27	0.27	1.26	1.13	1.52	1.63
CV [%C <sub>q</sub> ]	1.99	1.88	1.14	5.86	4.61	1.94	0.63	3.08	5.28	4.31	1.16	4.42	4.81	5.17	5.39

Fatores	(B) IAPAR 59- Sem N														
	Inoculação simulada					Ferrugem					Não inoculado				
	genes					genes					genes				
	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GM[C <sub>q</sub> ]	23.58	28.11	24.75	27.72	29.57	23.64	27.94	25.46	28.75	27.84	23.66	27.67	22.70	28.19	29.44
AM[C <sub>q</sub> ]	23.58	28.11	24.76	27.79	29.63	23.66	27.96	25.50	28.81	27.90	23.66	27.68	22.71	28.21	29.47
Min[C <sub>q</sub> ]	22.79	27.29	23.48	25.48	27.53	22.15	26.72	23.60	26.62	26.24	23.11	27.13	22.04	26.46	28.31
Max[C <sub>q</sub> ]	24.15	29.12	25.88	31.04	32.35	24.88	29.87	27.46	32.39	30.93	24.51	28.46	23.54	29.68	31.58
SD[±C <sub>q</sub> ]	0.27	0.49	0.60	1.83	1.82	0.73	0.75	1.36	1.63	1.51	0.44	0.39	0.46	1.16	1.00
CV [%C <sub>q</sub> ]	1.14	1.74	2.44	6.57	6.13	3.08	2.69	5.31	5.66	5.40	1.86	1.39	2.04	4.11	3.41

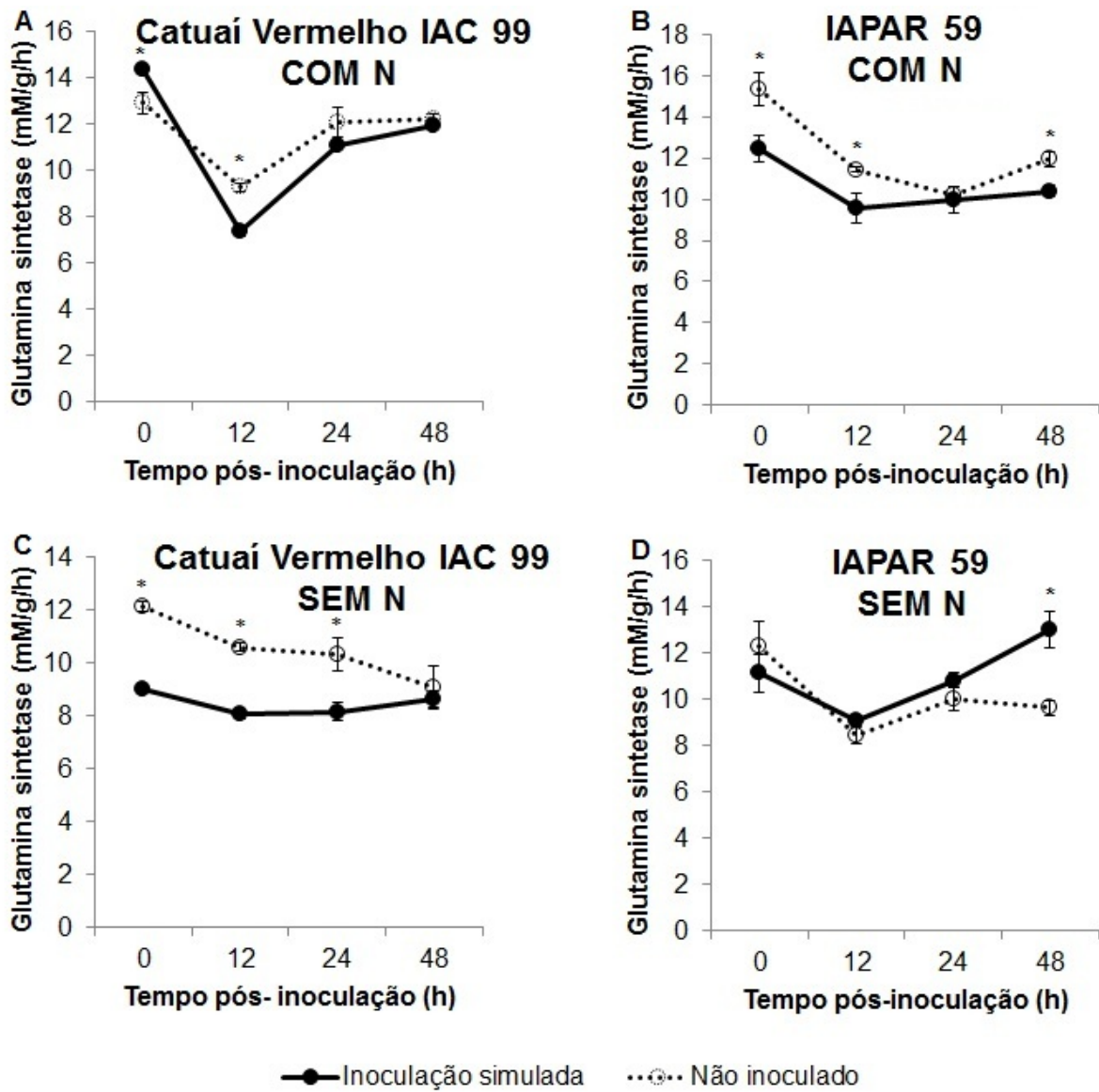
Continuação...

Fatores	(C) Catuaí Vermelho IAC 99- Com N														
	Inoculação simulada					Ferrugem					Não inoculado				
	genes					genes					genes				
	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GM[C <sub>q</sub> ]	23.43	28.01	24.37	28.38	27.16	23.99	28.26	25.25	28.48	28.58	24.03	28.64	24.24	28.85	28.06
AM[C <sub>q</sub> ]	23.44	28.01	24.40	28.43	27.17	24.00	28.26	25.27	28.55	28.60	24.03	28.65	24.25	28.92	28.10
Min[C <sub>q</sub> ]	22.35	27.42	22.71	25.63	26.27	23.05	27.76	23.61	25.44	27.37	23.27	28.00	23.02	25.93	26.32
Max[C <sub>q</sub> ]	24.08	28.40	25.61	30.45	28.31	24.59	28.55	26.29	31.32	30.65	24.68	29.35	25.07	31.45	30.71
SD[±C <sub>q</sub> ]	0.53	0.25	0.99	1.45	0.79	0.46	0.19	0.87	1.72	0.86	0.38	0.40	0.61	1.82	1.36
CV [%C <sub>q</sub> ]	2.25	0.90	4.07	5.10	2.89	1.90	0.68	3.44	6.03	3.00	1.58	1.41	2.50	6.28	4.82

Fatores	(D) IAPAR 59- Com N														
	Inoculação simulada					Ferrugem					Não inoculado				
	genes					genes					genes				
	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GS<sub>1</sub></i>	<i>GS<sub>2</sub></i>	<i>NR</i>	<i>AS</i>
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GM[C <sub>q</sub> ]	24.59	29.00	26.62	29.07	28.45	24.18	28.39	25.82	28.14	27.87	25.06	29.51	25.39	29.45	28.82
AM[C <sub>q</sub> ]	24.59	29.00	26.65	29.17	28.47	24.18	28.40	25.83	28.23	27.89	25.06	29.52	25.40	29.52	28.83
Min[C <sub>q</sub> ]	23.70	28.53	25.22	25.45	26.83	23.67	27.67	24.45	24.54	27.06	24.78	28.74	24.56	26.16	27.97
Max[C <sub>q</sub> ]	25.07	29.77	28.72	32.71	29.82	24.60	28.99	26.93	30.92	29.27	25.28	30.92	26.72	31.57	30.07
SD[±C <sub>q</sub> ]	0.44	0.30	1.00	1.82	0.77	0.31	0.31	0.66	1.83	0.66	0.14	0.67	0.60	1.61	0.70
CV [%C <sub>q</sub> ]	1.80	1.03	3.76	6.24	2.70	1.30	1.08	2.56	6.47	2.36	0.58	2.27	2.37	5.46	2.43

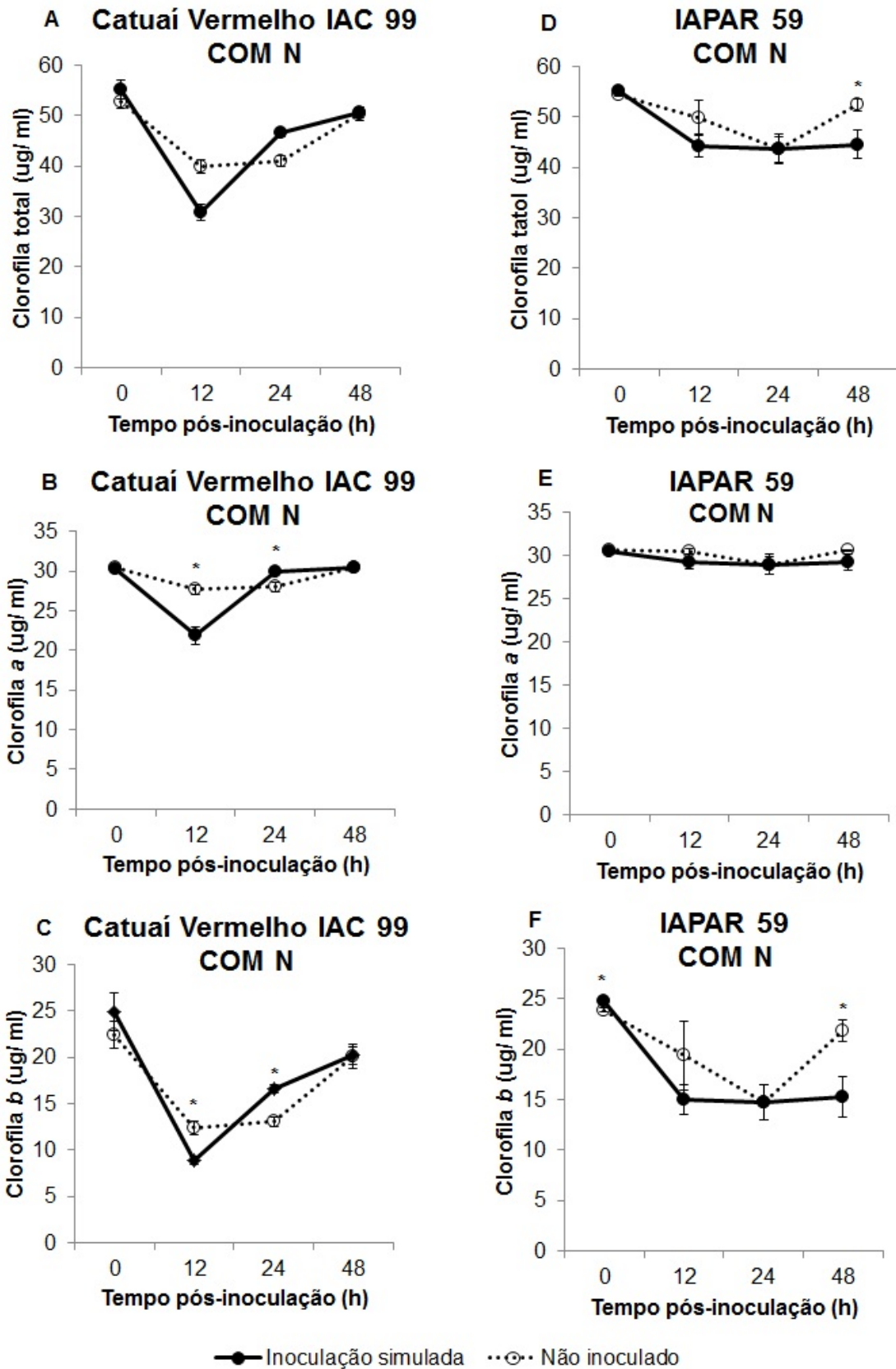
Nota: n, número de amostras de folhas de cafeeiro; GM[C<sub>q</sub>], média geométrica do valor de C<sub>q</sub>; AM[C<sub>q</sub>], média aritmética do valor de C<sub>q</sub>; Min[C<sub>q</sub>] e Max[C<sub>q</sub>], valores extremos de C<sub>q</sub>; SD[±C<sub>q</sub>], desvio padrão do valor de C<sub>q</sub>; CV[%C<sub>q</sub>], coeficiente de variação em percentagem do valor C<sub>q</sub>.

## ANEXO C

Atividade *in vitro* de Glutamina Sintetase

## ANEXO D

Concentração de Clorofila Total em Condições de Suficiência de N



## ANEXO E

Concentração de Clorofila Total em Condições de Supressão de N

