



JOSÉ DIOGO COSTA SOUZA

**METABOLISMO DE COMPOSTOS CONSTITUTIVOS E A
RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM DIFERENTES
CULTIVARES DE CAFEIEIRO**

LAVRAS-MG

2018

JOSÉ DIOGO COSTA SOUZA

**METABOLISMO DE COMPOSTOS CONSTITUTIVOS E A RESISTÊNCIA À
FERRUGEM EM DIFERENTES CULTIVARES DE CAFEIEIRO**

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

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS-MG
2018**

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

Souza, José Diogo Costa.

Metabolismo de compostos constitutivos e a resistência à
ferrugem em diferentes cultivares de cafeeiro / José Diogo Costa
Souza. - 2018.

45 p. : il.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Coffea spp. 2. Hemileia vastatrix. 3. Mecanismos de defesa
vegetal pré-formados. I. Resende, Mário Lúcio Vilela de. . II.

Título.

JOSÉ DIOGO COSTA SOUZA

**METABOLISMO DE COMPOSTOS CONSTITUTIVOS E A RESISTÊNCIA À
FERRUGEM EM DIFERENTES CULTIVARES DE CAFEIEIRO**

**METABOLISM OF CONSTITUTIVE COMPOUNDS AND RESISTANCE TO RUST
IN DIFFERENT COFFEE CULTIVARS**

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

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2018

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende (UFLA)

Dr. Luciano Vilela Paiva (UFLA)

Dr(a). Milene Alves de Figueiredo Carvalho

Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS-MG
2018**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar à frente de tudo, sempre me protegendo e abençoando, para que eu conseguisse concluir mais essa etapa.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

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

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende, pela oportunidade, orientação e disposição para solucionar os problemas eventuais durante o mestrado.

A toda minha família pelo apoio e amor que sempre demonstraram, e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis.

A todos os membros atuais e que já não fazem mais parte do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo (LFP), especialmente a Ana Cristina, Deila, Tharyn e Joyce pelo companheirismo, amizade, disposição pra ajudar durante as diversas etapas deste trabalho e por dividirem comigo seus conhecimentos, todos vocês me ajudaram a concluir este trabalho.

Aos queridos Regina, Sérgio, Pâmela e Catarina por terem me acolhido com carinho como membro de sua família.

A minha companheira de vida Kellen Kauanne, por compartilhar comigo os melhores e piores momentos dessa jornada, com muita paciência, amor e carinho, muito obrigado por tudo.

À todos que de alguma maneira contribuíram para realização desse trabalho...

Muito obrigado!

RESUMO

Uma das doenças mais importantes do cafeeiro é a ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. A utilização de cultivares resistentes ao patógeno é uma forma do produtor evitar os prejuízos causados pela doença sem a utilização de fungicidas. Contudo, ainda há muitas dúvidas quanto aos mecanismos pelos quais as plantas são resistentes. A partir disto o presente trabalho teve como objetivo analisar a relação entre o metabolismo constitutivo de compostos fenólicos e alcaloides e a resistência à ferrugem em cultivares de café resistentes e suscetíveis. As cultivares utilizadas no experimento foram: Aranês RV, IAPAR 59, Clone 224, Clone 312, Conilon 213 (resistentes à ferrugem) e Mundo Novo 376/4 (suscetível à ferrugem). As plantas do experimento estavam em seu primeiro ano produtivo e a coleta do material vegetal foi realizada entre outubro e novembro, após as primeiras chuvas. Neste período ainda não havia presença do patógeno no campo. O objetivo da coleta neste período foi coletar folhas maduras, estáveis e uniformes entre as diferentes cultivares para se avaliar a diferença de expressão gênica constitutiva, bem como quantificar alguns compostos fenólicos, nas seis cultivares de café com diferentes níveis de resistência à ferrugem. Para isto foram realizadas análises de expressão gênica relativa dos genes PAL, CAD e POX referentes às enzimas fenilalanina amônia liase, cinamil álcool desidrogenase e peroxidase respectivamente, presentes na rota dos fenilpropanóides. Também foram realizadas quantificações de lignina, fenóis solúveis totais, sólidos solúveis totais, ácido clorogênico, cafeína e trigonelina nas folhas de café. Em todas as análises realizadas, de maneira geral não houve diferenças entre as cultivares resistentes e a suscetível, talvez porque as plantas de café resistentes à ferrugem não produzem, de maneira constitutiva, maior quantidade de compostos relacionados à defesa vegetal do que as suscetíveis como forma de economia de energia e melhor uso dos recursos que possui para o seu desenvolvimento naquele momento. A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que não há relação entre a expressão relativa constitutiva dos genes PAL, CAD e POX, concentração constitutiva de lignina, fenóis solúveis totais, sólidos solúveis totais, ácido clorogênico, cafeína e trigonelina nas folhas, e a resistência à ferrugem do cafeeiro nas cultivares testadas neste experimento.

Palavras-chave: *Coffea* spp. *Hemileia vastatrix*. Mecanismos de defesa vegetal pré-formados. Fenóis.

ABSTRACT

One of the most important diseases of coffee is rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix*. The use of pathogen resistant cultivars is a way for the producer to avoid the damage caused by the disease without the use of fungicides. However, there are still many questions about the mechanisms by which plants are resistant. From this, the present work aimed to analyze the relationship between the constitutive metabolism of phenolic compounds and alkaloids and resistance to rust in resistant and susceptible coffee cultivars. The cultivars used in the experiment were: Aranãs RV, IAPAR 59, Clone 224, Clone 312, Conilon 213 (resistant to rust) and Mundo Novo 376/4 (susceptible to rust). The plants of the experiment were in their first productive year and the collection of the vegetal material was carried out between October and November, after the first rains. At this time there was still no pathogen present in the field. The objective of the collection in this period was to collect mature, stable and uniform leaves between the different cultivars to evaluate the difference in constitutive gene expression, as well as to quantify some phenolic compounds in the six coffee cultivars with different resistance levels to rust. For this, relative gene expression analyzes of the PAL, CAD and POX genes for the phenylalanine ammonia lyase, cinnamyl alcohol dehydrogenase and peroxidase enzymes, respectively, present in the phenylpropanoid route were performed. Quantifications of lignin, total soluble phenols, total soluble solids, chlorogenic acid, caffeine and trigonellin in coffee leaves were also performed. In all analyzes, there were generally no differences between resistant and susceptible cultivars, perhaps because rust-resistant coffee plants did not constitutively produce more compounds related to plant defense than susceptible ones as a form energy saving and better use of the resources it has for its development at that time. From the results obtained in the present work, it was concluded that there is no relation between the constitutive relative expression of the PAL, CAD and POX genes, constitutive concentration of lignin, total soluble solids, total soluble solids, chlorogenic acid, caffeine and trigonellin in leaves, and resistance to coffee rust in the cultivars tested in this experiment.

Keywords: *Coffea* spp. *Hemileia vastatrix*. Preformed plant defense mechanisms. Phenols.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	O cafeeiro	11
2.2	<i>Hemileia vastatrix</i>	11
2.3	Resistência de plantas à doenças.....	12
2.3.1	Compostos fenólicos	13
2.3.2	Enzimas associadas aos mecanismos de defesa da planta.....	14
2.4	Alcaloides	15
2.5	Melhoramento genético do cafeeiro e características de cultivares utilizadas.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Material vegetal	19
3.2	Obtenção do material vegetal.....	19
3.3	Avaliação de ferrugem em campo.....	20
3.4	Análise de expressão gênica por RT-qPCR	20
3.4.1	Extração de RNA e tratamento com DNase.....	21
3.4.2	Síntese de cDNA	21
3.4.3	Primers	21
3.4.4	RT-qPCR	22
3.5	Análise de teores de fenóis solúveis totais e lignina.....	22
3.6	Determinação do perfil de ácido clorogênico, cafeína e trigonelina por HPLC	24
3.6.1	Reagentes e padrões	24
3.6.2	Preparação dos padrões e amostras.....	24
3.6.3	Equipamento e Condições HPLC	24
3.7	Sólidos solúveis	25
3.8	Análise estatística	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Incidência e severidade de ferrugem	26
4.2	Expressão gênica	27
4.3	Lignina e fenóis solúveis totais	32
4.4	Sólidos solúveis	35
4.5	Análise cromatográfica.....	36
5	CONCLUSÕES	40
6	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos agrícolas mais importantes para o Brasil, que é o maior produtor e exportador mundial dessa *commodity* e sua bebida é a segunda mais consumida no país além de ser um dos mais valiosos produtos primários produzidos no mundo. O cafeeiro (*Coffea* spp.) pertence à família Rubiaceae a qual possui cerca de 100 espécies, porém somente duas têm importância econômica: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora*. A produção da safra de 2018 está estimada entre 54,44 e 58,51 milhões de sacas de café beneficiado (CONAB, 2018; MINIUSSI et al., 2015).

Um dos principais problemas enfrentado pelos cafeicultores, que acarreta redução de rendimento e aumento dos custos de produção, é a doença conhecida como ferrugem. Causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br, é a principal doença do café e ocorre em quase todos os países produtores. A formação de pústulas nas folhas reduz a área fotossintética e leva à queda precoce das folhas e à seca dos ramos, podendo causar até 50% de perda de produtividade, se nenhuma medida de controle for tomada (SILVA et al., 2006). A grande maioria das cultivares de café produzidos no Brasil são suscetíveis à ferrugem e são tratadas com fungicidas para evitar ou combater a doença, porém existem algumas cultivares desenvolvidas por cruzamento as quais apresentam resistência natural contra a doença (ZAMBOLIM, 2016).

Dentre as cultivares de café resistentes à ferrugem, destaca-se a IAPAR-59, que segundo análise efetuada no CIFIC (Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro), apresenta resistência completa à ferrugem do cafeeiro, sendo resistente a todas as 45 raças de *H. vastatrix*. Esta resistência se mantém completa e duradoura desde 1975. A utilização de cultivares resistentes como a IAPAR-59 diminui pelo menos os custos com fungicidas, além de diminuir a contaminação ao ambiente (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2017).

Quando uma planta possui resistência a um certo patógeno, significa que ela possui a capacidade de atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente colonização do patógeno em seus tecidos. As plantas possuem mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro. Os mecanismos estruturais são as barreiras físicas as quais impedem a penetração e/ou colonização do patógeno, como por exemplo, a formação de papilas, halos e tubos ligníferos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Já os mecanismos bioquímicos são caracterizados por substâncias que inibem o desenvolvimento do patógeno ou criam condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro. Substâncias correspondentes aos mecanismos

bioquímicos pré-formados estão presentes nas plantas em altas concentrações nos tecidos saudáveis antes do contato com o patógeno ou podem se converter em substâncias altamente tóxicas para o mesmo com o início da infecção. Dentre estas substâncias que constituem os mecanismos bioquímicos pré-formados destacam-se os compostos fenólicos (GOODMAN et al., 1986; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários largamente distribuídos na natureza e abrangem uma classe de compostos que incluem grande diversidade de estruturas simples e complexas. Tais compostos participam de mecanismos de defesa das plantas, protegendo-as principalmente contra o ataque de microrganismos. São descritos como composto fenólicos, os ácidos fenólicos e derivados, além de ligninas e taninos. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico (SANTOS, 2013).

Os mecanismos de defesa vegetal podem ser divididos em pré e pós-formados. Os mecanismos pré-formados são constituídos por estruturas e substâncias já existentes na planta que dificultam a penetração do patógeno ou atuam logo após a invasão do mesmo. Já os pós-formados são induzidos ou ativados após o contato com o patógeno. São conhecidos como mecanismos de defesa estruturais pré-formados a cutícula, parede celular, estômatos e tricomas. Compõem os bioquímicos pós-formados os compostos fenólicos e glicosídeos antifúngicos. Os inúmeros compostos fenólicos que atuam na defesa pré-formada podem ser simples, como os ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido protocatecóiico e catecol), ou complexos, como os taninos condensados e os glicosídeos. Cafeína, ácido clorogênico e hidroxihidroquinonas por exemplo atuam na defesa pré-formada e de amplo espectro em cafeeiro, onde são encontrados em grandes concentrações (RESENDE et al., 2014, p. 187).

Em função da importância da cultura do café no Brasil, dos prejuízos causados pela ferrugem no cafeeiro e pela vantagem da utilização de cultivares resistentes a esta doença, mostra-se de grande importância o estudo dos mecanismos de defesa pelos quais tais cultivares se apresentam resistentes, o que trará um maior conhecimento sobre o assunto e desta forma poderá contribuir para o combate à ferrugem.

Este trabalho teve como ponto de partida a dissertação de Silva (2015), em que a autora afirma que, a partir de análises da composição química dos extratos aquosos de folhas de mudas de café sem a inoculação de patógenos, das cultivares IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4 foi possível concluir que a cultivar IAPAR-59 apresentou maior teor de compostos fenólicos e sólidos solúveis que a cultivar Mundo Novo 376/4. Desta constatação surgiu a

hipótese de que os compostos fenólicos estão relacionados a resistência a ferrugem em café, pois a cultivar IAPAR-59 é imune a esta doença e a Mundo Novo 376/4 é suscetível.

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo analisar a relação entre o metabolismo de compostos constitutivos e a resistência à ferrugem em seis cultivares de café. Para isto, foi realizada análise de expressão relativa dos genes *PAL*, *CAD* e *POX* por RT-qPCR, quantificação de lignina, fenóis solúveis totais, sólidos solúveis totais e quantificação de ácido clorogênico, cafeína e trigonelina por HPLC com objetivo de verificar se há diferença no metabolismo constitutivo destes compostos entre cultivares resistentes e suscetíveis à ferrugem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cafeeiro

O cafeeiro pertence ao gênero *Coffea* e à família *Rubiaceae*. Possui cerca de 100 espécies, porém somente duas têm importância econômica: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora*. O café é um dos produtos agrícolas mais importantes para o Brasil, pois sua bebida é a segunda mais consumida no país além de ser um dos produtos agrícolas mais exportados do mundo. Cerca de 60% da produção global de café é representado por *C. arabica* e o restante é em grande parte representado por *C. canephora*. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor do produto. A safra de 2018 está estimada entre 54,44 e 58,51 milhões de sacas de café beneficiado, sendo de 29,09 a 30,63 milhões de sacas apenas em Minas Gerais, estado maior produtor de café do Brasil. A área total utilizada com o cultivo deve ser de 2,2 milhões de hectares (286,5 mil hectares em formação e 1,92 milhão de hectares em produção) (CONAB, 2018; MINIUSI et al., 2015).

2.2 *Hemileia vastatrix*

A ferrugem alaranjada do cafeeiro é uma doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., pertencente ao filo *Basidiomycota*, à classe *Teliomycetes*, à ordem *Uredinales* e família *Pucciniaceae*. A morfologia deste fungo é caracterizada por apresentar uma face lisa (côncava) e outra equinulada (convexa) coberta de espínulas. *H. vastatrix* é um parasita biotrófico, sendo assim, depende das células vivas do seu hospedeiro para se desenvolver e se reproduzir e é exclusivo do gênero *Coffea*. O primeiro relato desta doença data de 1861, nos cafeeiros silvestres da região do lago Victoria-Nyanza, no Quênia, África. Oito anos mais tarde ela foi descrita por Berkeley e Broome no Ceilão, atual Sri Lanka. O primeiro relato de ataque do fungo aos cafeeiros no Brasil foi feito em 1970, no estado da Bahia. A partir de então a doença disseminou-se para os demais estados brasileiros produtores de café e para outros países da América Latina também produtores desta commodity (RODRIGUES, 1990; SCHIEBER; ZENTMYER, 1984).

O fungo causador da ferrugem se desenvolve na superfície abaxial foliar, após a germinação dos urediniosporos, na presença de água e na temperatura ótima entre 20°C e 24°C. Em seguida, o patógeno emite de um a três tubos germinativos. Quando o tubo germinativo atinge a célula-guarda do estômato, forma-se uma estrutura denominada apressório, da qual

saem as hifas primárias e destas, as secundárias ou também denominadas de hifas de penetração. Posteriormente as hifas ramificam-se pelos espaços intercelulares, e então, na face de contato entre o micélio do fungo e a célula do hospedeiro forma-se o haustório, estrutura pela qual o patógeno absorve nutrientes de dentro das células do hospedeiro (RAMIRO et al., 2009).

Os sintomas da ferrugem são caracterizados pela ocorrência de manchas cloróticas translúcidas na face abaxial do limbo foliar, medindo de 1 a 3 mm de diâmetro. Essas manchas aumentam de tamanho rapidamente, atingindo de 1 a 2 cm de diâmetro e desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração alaranjada, formadas por uredíniosporos de *H. vastatrix*. Em seguida, no centro das lesões, forma-se uma área necrótica, na qual a esporulação é reduzida e chega a ser interrompida. Já na face adaxial, observam-se manchas cloróticas amareladas que correspondem aos limites da pústula na face inferior. Eventualmente, o patógeno pode atacar a extremidade do ramo em desenvolvimento e os frutos verdes. A perda de produtividade acarretada pela ferrugem do cafeeiro ocorre em função da desfolha prematura, a qual reduz a área fotossintética da planta, o que resulta em morte dos ramos e compromete o florescimento, a produção e a qualidade física dos grãos de café (CHALFOUN; ZAMBOLIM, 1985; GODOY et al., 1997; MATIELLO et al., 2002).

O controle da ferrugem do cafeeiro é realizado por meio da aplicação de fungicidas protetores e sistêmicos, principalmente durante a estação chuvosa, dependendo da severidade da doença. Habitualmente, são realizadas pulverizações foliares e aplicações via solo de fungicidas sistêmicos, ao quais podem ser associados ou não a inseticidas. Contudo, embora eficiente, o controle químico da ferrugem alaranjada do cafeeiro eleva o custo de produção, aumenta os riscos de contaminação do ambiente e dos trabalhadores e é de difícil aplicação em lavouras com áreas em declive. Outro fator importante é que a utilização descontrolada de fungicidas sem suporte técnico contribui para o surgimento de novas raças fisiológicas resistentes do patógeno, o que acarreta na diminuição da eficácia das aplicações e assim na sustentabilidade da atividade (AGRIOS, 2005).

2.3 Resistência de plantas à doenças

A resistência pode ser definida como sendo a capacidade da planta de diminuir o estabelecimento de certas populações de patógenos, por meio do seu sistema de defesa direto e ativo. A resistência pode se manifestar de diferentes formas quanto à estabilidade e à especificidade, sendo regida geneticamente também de modo diferenciado. De acordo com

suas características, pode ser classificada como resistência vertical ou horizontal. A resistência vertical pode ser exercida pela expressão de um ou mais genes (monogênica ou oligogênica). Apresenta resistência a raças específicas do patógeno e normalmente possui pouca estabilidade, pois é condicionada por poucos genes, e desta forma o patógeno pode conseguir suplantá-la mais facilmente por meio de processos de mutação e recombinação genética. Já a resistência horizontal é condicionada por vários genes (poligênica), raça-não-específica, geralmente durável, por ser condicionada por vários genes, e não há interação diferencial entre as raças do patógeno e as variedades do hospedeiro. A resistência horizontal reduz a taxa média de progresso da doença, ao contrário da resistência vertical que atua preferencialmente no inóculo inicial do patógeno. Portanto, em plantas com resistência vertical o patógeno não consegue realizar a infecção (MATIELLO et al., 1997).

Existem substâncias correspondentes aos mecanismos bioquímicos pré-formados, as quais estão presentes nas plantas em altas concentrações nos tecidos sadios antes do contato com o patógeno, ou podem se converter em substâncias altamente tóxicas com o início da infecção. Dentre estas substâncias que constituem os mecanismos bioquímicos pré-formados destacam-se os compostos fenólicos (GOODMAN et al., 1986; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

2.3.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, os quais contêm um grupo fenol caracterizado por um grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Estes compostos constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. Alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis, como a lignina e os taninos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Compostos fenólicos possuem ação antifúngica, antibacteriana e antiviral. O efeito inibitório de compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e produção/atividade de enzimas microbianas varia entre os diferentes grupos de fenóis. Deste modo, os compostos fenólicos podem estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas. Existem diversas substâncias fenólicas associadas à resistência a doenças como, por exemplo, ácido clorogênico, ácido protocatecólico e catecol, floridizina e arbutina (glicosídeos fenólicos) (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; VIDHYSEKARAN, 1998).

Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. A rota do ácido chiquímico participa na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos vegetais, a qual converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose-fosfato em três aminoácidos aromáticos. Um dos intermediários dessa rota é o ácido chiquímico, o qual dá o nome a essa sequência de reações. Já a rota do ácido malônico, embora seja uma fonte importante de produtos secundários fenólicos em fungos e bactérias, é menos expressiva nas plantas superiores (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.3.2 Enzimas associadas aos mecanismos de defesa da planta

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas as quais estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primário e secundário. Duas dessas enzimas chaves apresentam grande importância, a fenilalanina amônia-liase (PAL) e a peroxidase (POX). As classes mais abundantes de compostos fenólicos em plantas são derivadas da fenilalanina, pela eliminação de uma molécula de amônia, formando o ácido cinâmico. Essa reação é catalisada pela fenilalanina amônia liase, a qual está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário, de modo que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos, tais como ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico, os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas. A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz (pelo seu efeito nos fitocromos) e infecção por fungos. O controle da taxa de produção desta enzima parece estar no início da transcrição. A infecção por fungos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL, o que aumenta a quantidade dessa enzima na planta, e por sua vez, estimula a síntese de compostos fenólicos (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A peroxidase é uma classe de enzimas presente em tecidos de animais, plantas e microorganismos, que cataliza a oxidoredução entre H_2O_2 e vários redutores. É relativamente estável em altas temperaturas, participa de uma ampla variedade de processos fisiológicos nas plantas, tais como a lignificação, suberização, formação e reticulação de componentes da parede celular, catabolismo de auxinas, senescência, proteção contra ataque de patógenos, insetos e estressores abióticos. (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014).

A lignina é um heteropolímero fenólico que fornece às células vegetais rigidez estrutural, hidrofobicidade, e uma barreira contra insetos e espécies patogênicas (BARAKAT et al., 2009). As ligninas de angiospermas são constituídas por três subunidades principais (referidas como monolignóis) denominadas hidroxifenilo, guaiacil e siringil monolignóis (RONG et al., 2016). Os monolignóis, precursores da lignina, são sintetizados no citoplasma por uma rota metabólica que começa com a enzima fenilalanina amônia liase e termina com a cinamil álcool desidrogenase. Após isso eles são transportados para a parede celular onde são utilizados pela peroxidase para sintetizar a lignina (YOON; CHOI, 2015). A cinamil álcool desidrogenase (CAD) é uma enzima especializada envolvida na redução de cinamaldeídos em álcoois cinâmicos, o último passo da biossíntese de monolignol antes da polimerização oxidativa na parede celular (SIBOUT et al., 2005).

2.4 Alcaloides

Os alcaloides são compostos naturais encontrados principalmente em plantas, especialmente em certas plantas com flores. São compostos por carbono, hidrogênio, nitrogênio e, geralmente, oxigênio (HUSSAIN et al., 2018). Plantas que produzem esses compostos tornam suas folhas pouco atraentes para a alimentação de insetos e animais superiores. Um dos alcaloides de ocorrência natural é a cafeína (3,7-di-hidro-1,3,7-trimetil-1*H*-purina-2,6-diona), a qual é encontrada em vários produtos vegetais e bebidas, mas principalmente em grãos de café (AMARE; AKLOG, 2017). A cafeína pode exercer função de defesa contra estresses bióticos nas plantas, como mostra os trabalhos de Medeiros et al. (1990) e Gonçalves et al. (1995) em café e Aneja e Gianfagna (2001) em cacau.

A trigonelina é outro composto alcaloide e recebeu este nome por ter sido primeiramente isolado de sementes de *Trigonella foenum-graecum*. Este composto é encontrado em uma ampla variedade de espécies de plantas, desde samambaias até plantas com flores e compõe cerca de 1% da matéria seca de grãos de café (*Coffea arabica*). Pouco se sabe sobre as funções fisiológicas na planta desempenhadas pela trigonelina, mas ela parece exercer funções regulatórias do metabolismo vegetal (LI et al., 2017). A trigonelina pode ainda ter uma possível função no sistema imune do cafeeiro, como mostra o trabalho de Machado et al. (2012).

2.5 Melhoramento genético do cafeeiro e características de cultivares utilizadas

A utilização de cultivares de café resistentes é a medida de controle contra a ferrugem mais eficiente. A maioria das cultivares de café resistentes são produzidas por métodos de melhoramento convencional (ZAMBOLIM, 2016).

A cultivar MGS Aranãs originou-se do cruzamento entre as cultivares Icatu Vermelho IAC 3851-2 e Catimor UFV 1602-215, ambas portadoras de resistência genética ao agente causador da ferrugem do cafeeiro, iniciado em 1985 no Campo Experimental da EPAMIG, em São Sebastião do Paraíso. A MGS Aranãs é resistente à ferrugem, tem alta produtividade e se destaca por seus grãos graúdos e bebida de qualidade. Apresenta produtividade média de 56,48 sacas por hectare e excelente qualidade da bebida. Possui porte baixo (altura média de 2,7 metros) e a copa em formato cônico. Os frutos maduros apresentam coloração vermelha e as sementes são graúdas. As folhas novas são de coloração bronze e, quando adultas, verde-escuro brilhante. Testes preliminares de avaliação sensorial apontaram elevada qualidade de bebida (88 pontos na escala, que vai de zero a cem pontos pelos critérios da *Brazil Specialty Coffee Association* - BSCA) (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2017).

O Clone 224 é oriundo de Catucaí Amarelo 2SL e o Clone 312 é oriundo de um cruzamento entre as cultivares Siriema e Catucaí Amarelo 2SL. O desenvolvimento das cultivares do grupo Catucaí foi iniciado com o aproveitamento de um cruzamento natural entre 'Icatu' e 'Catuaí', ocorrido nos experimentos do extinto Instituto Brasileiro do Café (IBC), em São José do Vale do Rio Preto, RJ. Em geral, as cultivares do grupo Catucaí apresentam resistência moderada à ferrugem do cafeeiro, o que significa que as plantas podem ser infectadas, mas os danos causados, geralmente, são pequenos, não havendo grande queda de folhas (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2017).

De modo geral, as cultivares do grupo Catucaí apresentam boa capacidade de rebrota, elevado vigor vegetativo e alta produtividade. Todas as cultivares apresentam bebida de boa qualidade, semelhante à da cultivar Catuaí. A Catucaí Amarelo 2SL apresenta porte baixo a médio, crescimento vegetativo vigoroso, frutos amarelos de maturação média e sementes de tamanho médio. Em condições de campo, tem-se observado que é menos infectada por *Phoma* que outras cultivares do grupo e que as cultivares Catuaí, Bourbon Amarelo e Mundo Novo. (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2017)

A cultivar Siriema AS1 teve origem na hibridação, realizada no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), entre *Coffea racemosa* e *C. arabica* (cultivar Blue Mountain), e retrocruzadas com Mundo Novo da qual foram recebidas as sementes na Fazenda

Experimental Caratinga, MG, na década de 1970. Em ensaios foram selecionadas duas plantas, pela resistência ao bicho-mineiro e por maiores produtividades. Essas plantas foram cruzadas com outras do Catimor UFV 417, para associar resistência a ferrugem, porte baixo e produtividade e em seguida foram realizadas mais alguns testes e seleções por alguns anos até chegar a cultivar existente atualmente. Ela apresenta folhas com verde mais escuro, com limbo foliar mais espesso, maior tolerância à seca, maturação precoce e com frutos amarelos. O diâmetro de copa é bem estreito, útil para plantios em sistemas com menores espaçamentos, e a arquitetura de copa é aberta. A cultivar ainda apresenta resistência moderada a ferrugem, alta resistência ao bicho-mineiro, alto vigor e produtividade e boa qualidade de bebida (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2017).

A 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 Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, onde recebeu a denominação de H 361. A geração F2 (H 361-4) foi recebida pelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) que a denominou LC 1669. Em 1975, o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) recebeu do IAC a geração F (LC 1669 Ep127 3 cv.506), que passou a ser denominada de PR 75163. A progênie PR 75163-22, na geração F, destacou-se nos ensaios realizados pelo IAPAR nos municípios de Londrina, Loanda e Carlópolis, no Paraná, dando origem à cultivar IAPAR 59. Segundo análise efetuada no CIFC, essa cultivar apresenta resistência completa à ferrugem, sendo resistente a todas as 45 raças de *Hemileia vastatrix*. Esta resistência se mantém completa e duradoura desde 1975. Apresenta porte baixo, copa cônica de tamanho médio, folhas jovens (brotos) de cor bronze (predominante) e verde, resistência ao nematoide *Meloidogyne exigua*, alta produtividade e boa qualidade de bebida (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2017).

As cultivares do grupo Mundo Novo correspondem a uma recombinação resultante de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho, encontrada no município paulista de Mineiros do Tietê. Sementes de um desses cafeeiros foram plantadas no município de Mundo Novo, hoje Urupês (SP), onde foram selecionadas as plantas matrizes que deram origem à cultivar Mundo Novo. Realizaram-se, nessa localidade, entre os anos de 1943 a 1952, seleções de várias plantas matrizes e, posteriormente, seleções entre e dentro das progênies, procurando-se eliminar vários dos defeitos observados na população. Progênies selecionadas, então denominadas Mundo Novo, foram multiplicadas para serem distribuídas aos agricultores a partir de 1952. Novas seleções foram liberadas pelo IAC a partir de 1977. Estas cultivares são suscetíveis à ferrugem e a nematoides, porém, caracterizam-se por elevada produtividade de café beneficiado, aliada a ótimo aspecto vegetativo. As plantas

adultas, com 12 a 14 anos, podem alcançar altura média de 3,4 m. Além do porte alto elas apresentam copa grande e cilíndrica, folhas jovens de cor verde ou bronze, frutos maduros vermelhos e de formato oblongo, alto vigor e produtividade e boa qualidade de bebida (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2017).

Conillon é uma variedade da espécie *Coffea canefora*. É originária do Gabão (África) e foi introduzida no Sudeste brasileiro, nas primeiras décadas do século XX. De modo geral apresenta grande variabilidade genética em produtividade, maturação, porte, características de frutos, de grãos e com relação à tolerância a pragas e doenças. Possui sistema radicular volumoso, intensa emissão de ramos ortotrópicos, internódios longos, ramos mais compridos e pouco ramificados, folhas pequenas, subanceoladas e com bordos ondulados, fruto chato ou piriforme (fruto pera), comumente contem protuberância apical chamada de “coroa”, sementes pequenas com coloração que pode variar de amarelo-palha a marrom. Apresenta maior produção de grãos do tipo moca, quando comparada com outras variedades de *C. canefora* (SOUZA et al., 2004).

De modo geral, cultivares de *Coffea canefora* apresentam certa resistência à ferrugem, e por isso são utilizadas como fonte de resistência à ferrugem em trabalhos de melhoramento de café (MISHRA; SLATER, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT do Café) implantou em 2015 na Universidade Federal de Lavras um painel de cultivares de cafeeiro para a avaliação da resistência a doenças, produtividade e qualidade da bebida. Este painel é dividido em duas áreas, com um total de 34 cultivares, sendo 30 de café arábica e 4 de conilon. A área 1 contém as cultivares de café arábica e área 2 contém as cultivares de café conilon. Ambas estão divididas em 3 blocos, e contém parcelas com 10 plantas de cada cultivar. Este painel recebe tratamentos culturais pertinentes ao sistema de manejo convencional.

Neste trabalho foram utilizadas seis cultivares de cafeeiro, todas em seu primeiro ano produtivo, sendo cinco de café arábica e uma de café conilon. Dentre as cultivares de café arábica foram utilizadas: Aranãs RV (resistência vertical), desenvolvida pela Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) e estabilizada pelo professor e pesquisador Mário Lúcio Vilela de Resende; Clone 224 (clone derivado de Catucaí Amarelo 2SL) e Clone 312 (Siriema x Catucaí Amarelo 2SL), ambos desenvolvidos pela Fundação PROCAFE; IAPAR 59 desenvolvida pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná) e Mundo Novo IAC 379-19 desenvolvido pelo IAC (Instituto Agrônômico de Campinas). Quanto ao café conilon, foi utilizada a cultivar Conilon 213, desenvolvido pelo INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural).

Para a realização das análises, foram escolhidas cultivares de cafeeiro que possuem diferentes níveis de resistência à ferrugem: Aranãs RV (resistente), IAPAR 59 (imune), Clone 312 (resistente) e Conilon 213 (resistente), Clone 224 (resistente) e Mundo Novo IAC 379-19 (suscetível).

3.2 Obtenção do material vegetal

Para as análises por RT-qPCR e análise de teores de fenóis solúveis totais e lignina, foram utilizadas cinco plantas de cada parcela do experimento, as quais foram as mais uniformes e desenvolvidas. Foram coletados dois pares de folhas de cada planta, sendo este o segundo par de folhas totalmente expandidas, do terço médio da planta. As folhas foram guardadas em envelopes de alumínio devidamente identificados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em freezer a -80°C. Para a quantificação do teor de sólidos solúveis e análises por HPLC, foram coletadas folhas de cada planta

selecionada por parcela em uma quantidade suficiente para se obter 5 gramas de folhas secas e moídas em cada bloco (vale ressaltar que foi coletado uma quantidade de folhas suficiente para repetir as análises caso fosse preciso). As folhas foram colocadas em sacos de papel e secas em estufa a 45°C. A coleta do material vegetal foi realizada entre outubro e novembro, após as primeiras chuvas. Neste período (quente e chuvoso) o crescimento dos ramos e a formação de folhas é mais intenso, sendo possível padronizar a idade aproximada das folhas. As folhas para análises de RT-qPCR, fenóis solúveis totais e lignina foram coletadas pela manhã em um único só dia, já para as demais análises as coletas foram realizadas também pela manhã porém durante três dias consecutivos após o início da coleta, sendo um bloco por dia. O objetivo da coleta neste período foi coletar folhas sem a presença de ferrugem, maduras, estáveis e uniformes entre as diferentes cultivares para se avaliar a diferença de expressão gênica constitutiva, bem como quantificar alguns compostos fenólicos e alcaloides, nas seis cultivares de café com diferentes níveis de resistência à ferrugem.

3.3 Avaliação de ferrugem em campo

A partir do início do aparecimento de sintomas de ferrugem na cultivar suscetível (MUNDO NOVO IAC 379-19) em março de 2017, cinco avaliações quinzenais, foram realizadas no terço médio da planta para se monitorar a ocorrência e severidade da doença, seguindo a escala diagramática proposta por Cunha et al. (2001). Os índices médios de incidência e severidade foram transformados em área abaixo da curva de progresso de incidência (AACPI) e de severidade (AACPS) (SHANER; FINNEY, 1977).

3.4 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

Foi analisada a expressão de genes que codificam enzimas que participam da rota dos compostos fenólicos com o objetivo de se verificar se há relação entre a expressão destes genes em folhas de café com a resistência à ferrugem. Os genes analisados foram *PAL*, *CAD* e *POX*, que codificam as enzimas fenilalanina amônia-ase, cinamil álcool desidrogenase e peroxidase, respectivamente. A expressão quantificada foi relativa aos genes constitutivos *14-3-3* e *RPL7*.

3.4.1 Extração de RNA e tratamento com DNase

Para se realizar a extração de RNA, as folhas foram maceradas em cadinho utilizando nitrogênio líquido. Foi utilizado o Protocolo do Concert (Plant RNA Purification Reagent – Invitrogen), com pequenas alterações. Ao final da extração as amostras foram estocadas em freezer -80°C até a realização das futuras análises.

Após a extração do RNA, as amostras foram analisadas quanto à quantidade e qualidade utilizando-se um espectrofotômetro Nanovue® (NanoVue GE Healthcare). Foram utilizados 2 µL de cada amostra para realizar essa análise, observando-se a concentração do RNA e as relações de pureza A260\280 e A260\230, priorizando, preferencialmente, valores entre 1,8 a 2,0. Para avaliar a integridade do RNA extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReader XS D-77Ls-20. M).

Em seguida as amostras foram tratadas com o Turbo DNA Free™ kit (Ambion) para eliminação do DNA residual. Após isso as amostras foram mais uma vez analisadas quanto à quantidade e qualidade utilizando-se um espectrofotômetro Nanovue® e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UV-transilluminator para avaliar a integridade do RNA após o tratamento.

3.4.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

3.4.3 Primers

Os *primers* para RT-qPCR dos genes *PAL*, *POX* e *CAD* de cafeeiro foram desenhados com o auxílio do software Integrated DNA Technologies - IDT. Além desses genes, foram utilizados *primers* para amplificar genes que foram usados como controle constitutivo. Foram utilizados como genes de referência: *RPL7* e *14-3-3* por serem estáveis em folhas de café. Para todos os *primers* foram realizados teste de eficiência dos mesmos (Tabela 1).

Tabela 1-Sequência e eficiência de *primers*.

<i>Primers</i>	Sequência	Eficiência (%)
<i>PAL</i>	Forward: CATCAGGGCTTCGACAAAAT Reverse: CGGGTGTTATCCATCGAGAC	100
<i>CAD</i>	Forward: AAAATGGGGAGCTTGGAAGT Reverse: CATCTTCAGGGCCTGTGTTT	100
<i>POX</i>	Forward: TTGCCTTCTCTGCTTTTGCA Reverse: GCTTGACTTGCTCCCTGATGA	98
<i>14-3-3</i>	Forward: CGCCTGATCGTGCTTGTTTC Reverse: GCACATCAGGAGTCCACAAAGTAA	92
<i>RPL7</i>	Forward: GACCTTGCCCATGAGATCCTGAC Reverse: CCAGCATCGCCTCCTTCAACATAG	93

Fonte: Do Autor (2018).

3.4.4 RT-qPCR

Para a análise da RT-qPCR, foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems) e o sistema de detecção foi o SYBR Green. As condições da reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C e finalizando com 15 segundos a 95°C. Para cada reação, foi utilizado 1,0 µL de cDNA, 0,2 µL de cada primer e 5,0 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix com ROX (Invitrogen) para um volume final 10,0µL, por amostra. Para cada gene em estudo, o experimento foi conduzido a partir de cDNAs obtidos de três repetições biológicas, com três replicatas técnicas, sendo os resultados normalizados usando CTs (Ciclo *Threshold*) obtidos pela expressão do gene constitutivo. A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método descrito por Pfaffl, 2001.

3.5 Análise de teores de fenóis solúveis totais e lignina

Para a análise de teores de fenóis solúveis totais e lignina, os tecidos vegetais foliares coletados foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de

um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 24 horas. Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol 80% e mantida sob agitação por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual realizou-se a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o precipitado foi utilizado para determinação de lignina.

Para determinação da lignina, foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol 80%, homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65°C por 15 horas. Foi acrescentado 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico: HCl 2M (1:10). Em seguida, os microtubos foram agitados suavemente para hidratar o resíduo e colocados em banho-maria a 100°C por 4 horas. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água ultrapura e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria a 4°C por 4 horas para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 20 µL da suspensão foi transferida para microplacas de ELISA, onde completou-se o volume para 200 µL de NaOH 0,5 M. A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro de ELISA, a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de massa seca.

O método desenvolvido por Spanos e Wrolstad (1990), com algumas modificações, foi utilizado para a determinação de concentração de compostos fenólicos solúveis totais. Em microplacas, alíquotas de 15 µL do extrato metanólico foram misturadas a 15 µL de metanol 80% e a 30 µL do reagente Folin-Ciocalteau 0,25 N. Após 5 minutos, foi acrescentado 30 µL de Na₂CO₃ 1M, que ficou em repouso por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 110 µL de água destilada, que ficou por uma hora, à temperatura ambiente. Os valores de absorbância desta reação foram determinados a 725 nm, em espectrofotômetro de ELISA e calculados

com base em curva de ácido clorogênico. Os fenóis solúveis totais foram expressos em equivalente μg de ácido clorogênico por miligrama de massa seca.

3.6 Determinação do perfil de ácido clorogênico, cafeína e trigonelina por HPLC

3.6.1 Reagentes e padrões

Foram utilizados como compostos padrões para análise o ácido clorogênico, cafeína e trigonelina, todos adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados para cromatografia foram metanol (Merck) e ácido acético (J.T. Baker), ambos de grau analítico para HPLC (espectroscópico) e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q (DirectQ-3).

3.6.2 Preparação dos padrões e amostras

O método utilizado para a quantificação foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições, contendo uma mistura de todos os padrões, sendo que esta foi obtida por meio da diluição das soluções-estoque previamente preparadas em água. Nas soluções-estoque, os padrões encontravam-se na concentração de 1mg mL^{-1} e a faixa de construção da curva analítica foi de 0,001 a $0,8\text{ mg mL}^{-1}$. Na construção das curvas analíticas foram realizadas injeções em triplicata.

Primeiramente as folhas secas em estufa foram moídas com o auxílio de um moinho de facas. Em seguida o pó foi peneirado para que ficasse com uma granulação homogênea e recolhido em peneira de 400 mesh. Os extratos aquosos foram realizados com 0,5 g de amostra moídas em 50 mL água destilada em ebulição durante 3 minutos em banho-maria. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e em filtros de membranas de nylon de $0,45\mu\text{m}$ e encaminhados para as análises cromatográficas, de acordo com Malta e Chagas, 2009. A identidade dos analitos contidos nos extratos foi confirmada pelo tempo de retenção e pelos picos da amostra comparados aos dos padrões.

3.6.3 Equipamento e Condições HPLC

As análises foram realizadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café) da Universidade Federal de Lavras – UFLA. As análises cromatográficas foram realizadas em um UFLC Shimadzu, equipado com bomba quaternária de alta pressão modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20^a5, forno modelo CTO-20^a, interface modelo CBM-20^a, injetor automático modelo SIL-20^a-HT e detector UV-Vis (SPD-20^a). A coluna

empregada foi a Shim-pack CLC-ODS (6,0 x 150 mm, 5 μ m) conectada a uma pré-coluna Eclipse XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 μ m).

A fase móvel para a eluição dos compostos analisados contou com uma solução de ácido acético 1% em água (Solvente A) e metanol (Solvente B), obedecendo a seguinte proporção: água/metanol/ácido acético (84:15:1% v/v). As amostras e os padrões foram eluídos em modo isocrático. O comprimento de onda utilizado foi de 272 nm, fluxo de 1,0 mL/ min, temperatura do forno de 40°C e volume de injeção de 20 μ L. O tempo de corrida de cada amostra foi de 50 minutos e as amostras foram injetadas em triplicata.

3.7 Sólidos solúveis

Para realizar a quantificação de sólidos solúveis, primeiramente as folhas secas em estufa foram moídas com o auxílio de um moinho de facas. Em seguida o pó foi peneirado para que ficasse com uma granulação homogênea. Após isso foi realizado a extração de sólidos solúveis de 5 gramas do pó de folhas secas e moídas com o auxílio de 170 ml de água destilada fervente e filtração à vácuo. Então a solução obtida teve seu volume mensurado em uma proveta e o grau *Brix* mensurado com auxílio de um refratômetro digital portátil, marca Hanna, modelo HI 96801. O teor de sólidos solúveis foi obtido a partir de uma curva padrão baseada no °*Brix*.

3.8 Análise estatística

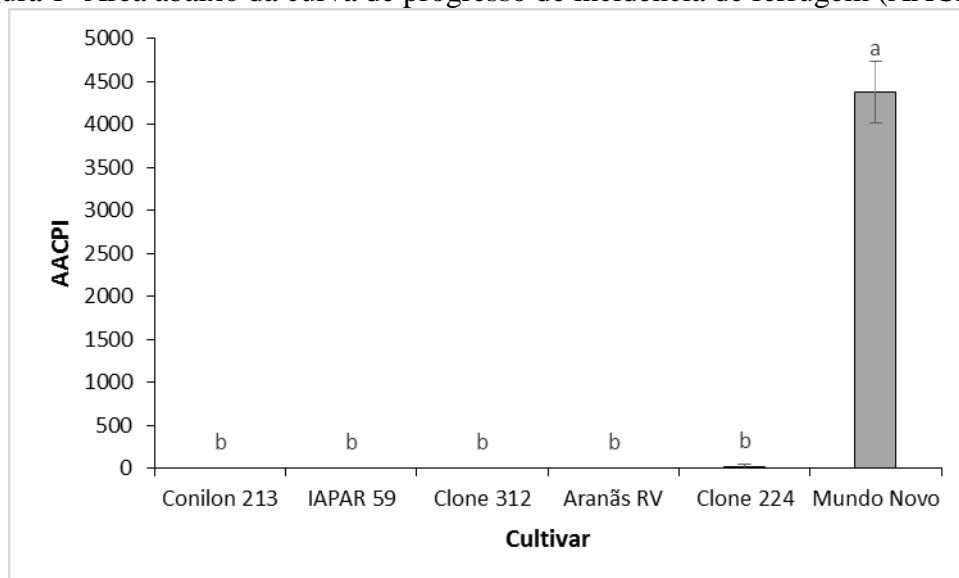
O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados, sendo três blocos com cinco repetições biológicas por parcela. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) (SCOTT; KNOTT, 1974). As variáveis estudadas foram analisadas utilizando-se o programa de análises estatísticas Sisvar 5.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Incidência e severidade de ferrugem

A partir da análise dos gráficos de área abaixo da curva de progresso de incidência e severidade de ferrugem, observou-se que a cultivar Mundo Novo IAC 379-19 obteve resultado significativamente diferente das demais cultivares, sendo que apresentou incidência e severidade de ferrugem muito maior do que as demais cultivares. O clone 224 apresentou incidência de ferrugem mesmo que em um valor mínimo. Já as demais cultivares não apresentaram ferrugem nas folhas (FIGURAS 1 E 2).

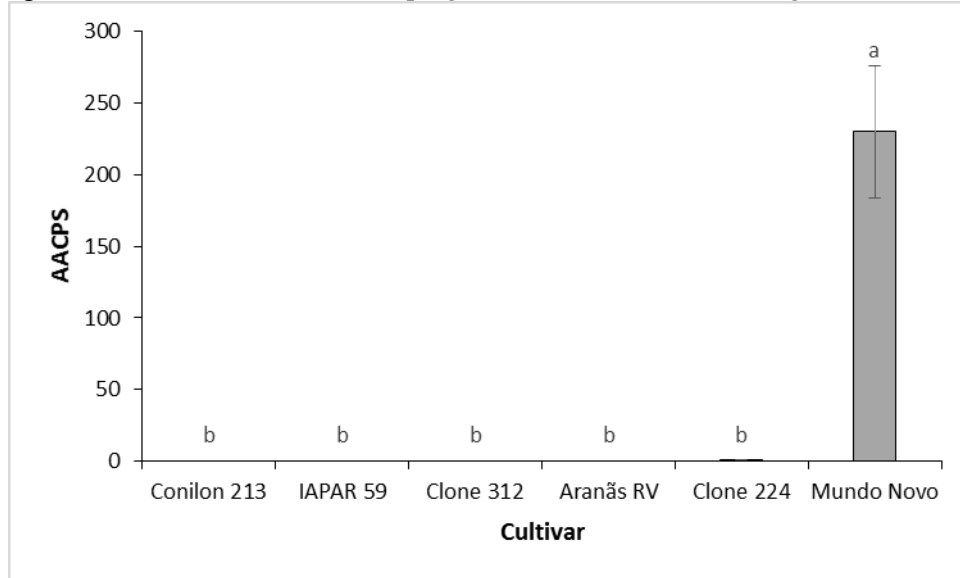
Figura 1- Área abaixo da curva de progresso de incidência de ferrugem (AACPIF).



Resultado obtido após cinco avaliações com intervalo de quinze dias entre elas. As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Figura 2-Área abaixo da curva de progresso de severidade de ferrugem (AACPSF).



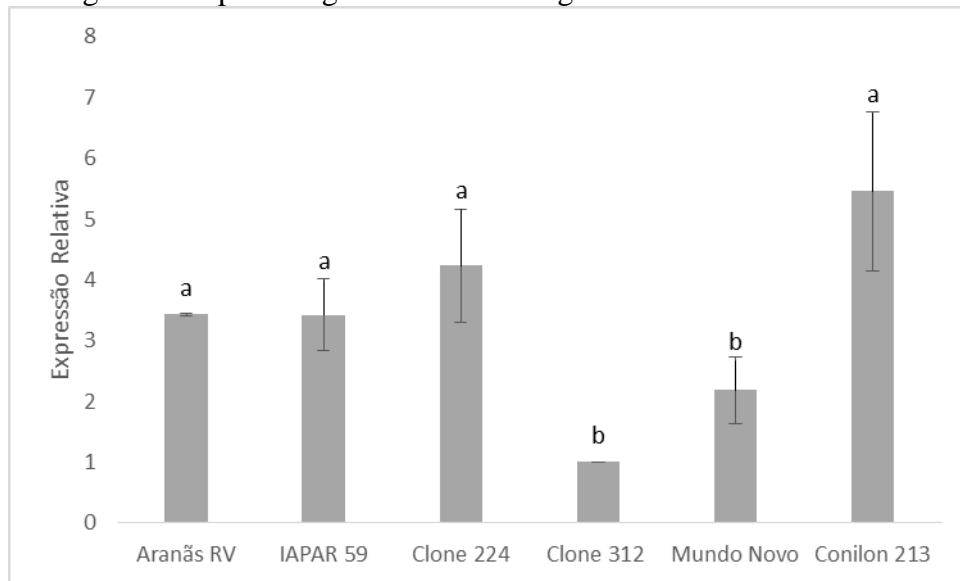
Resultado obtido após cinco avaliações com intervalo de quinze dias entre elas. As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).
Fonte: Do autor (2018).

Os dados apresentados nos dois gráficos acima corroboram com as características das cultivares em relação a resistência e severidade à ferrugem descritas no Consórcio e Pesquisa Café (2017). Apesar dos pesquisadores não relatarem informações das cultivares Clone 224 e Clone 312, eles apresentam dados das cultivares que às deram origem. O Clone 224 é oriundo de Catucaí Amarelo 2SL e o Clone 312 é oriundo de um cruzamento entre as cultivares Siriema e Catucaí Amarelo 2SL, as quais possuem resistência moderada a ferrugem. Contudo, Clone 312 se mostrou imune a ferrugem durante o período do experimento e Clone 224 mostrou-se ser altamente resistente.

4.2 Expressão gênica

A partir do resultado do gráfico referente a expressão do gene *PAL* observou-se que as cultivares Clone 312 e Mundo Novo IAC 379-19 obtiveram expressão relativa do gene *PAL* nas folhas significativamente menor (pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$)) do que as demais cultivares avaliadas neste experimento (FIGURA 3).

Figura 3- Expressão gênica relativa do gene *PAL* em folhas de café.



As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

A fenilalanina amônia liase (*PAL*) é uma importante enzima para o mecanismo de defesa das plantas, pois é a primeira enzima da rota dos fenilpropanóides e responsável pelo início do metabolismo de vários compostos do metabolismo secundário relacionados com a defesa vegetal. Plantas que superexpressam genes *PAL* possuem resistência à patógenos aumentada quando comparadas com as selvagens (ZHANG et al., 2017).

No trabalho de Shadle, et al. (2003), os autores comprovaram que plantas de tabaco geneticamente modificadas para superexpressar o gene da Fenilalanina Amônia Liase, eram mais resistentes que as plantas selvagens quando submetidas à infecção por *Cercospora nicotianae*. Resultados semelhantes do papel da enzima *PAL* foram relatados por Brueske e Charles (1980), em tomate, e por Henderson e Friend (1979) em batata, trabalho no qual também observaram que o aumento da atividade de *PAL* ocorreu um dia antes do aumento da produção de lignina. Estes trabalhos sugerem que plantas resistentes apresentam maior expressão de genes *PAL* quando comparadas com plantas suscetíveis após serem infectadas por patógenos.

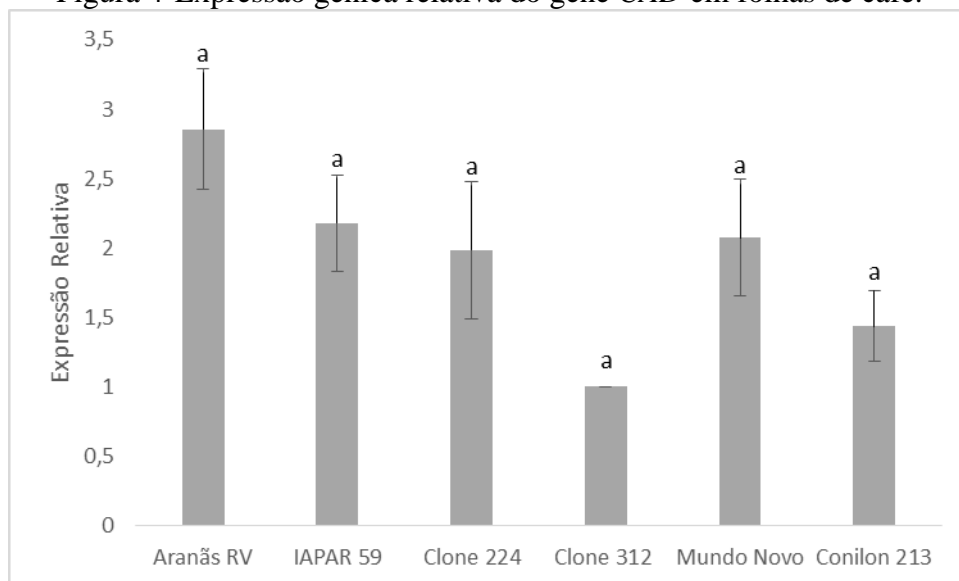
Já o trabalho de Gayoso et al. (2010) foi realizado com plantas de tomate resistentes e suscetíveis ao fungo *Verticillium dahliae*. Eles quantificaram a expressão relativa de 4 genes *PAL* nas raízes das plantas nos tempos 0, 4, 8 e 48 horas após a inoculação do fungo. Algumas horas após a inoculação do patógeno, os 4 genes *PAL* apresentaram níveis de expressão significativamente diferentes entre as plantas resistentes e suscetíveis, como relatado nos

trabalhos anteriormente citados. Porém, os 4 genes *PAL* não apresentaram níveis de expressão significativamente diferentes no tempo 0, entre as plantas resistentes e suscetíveis.

A maioria das cultivares resistentes à ferrugem estudadas neste trabalho apresentou expressão relativa constitutiva do gene *PAL* significativamente maior do que a cultivar suscetível (diferente dos resultados de Gayoso et al. (2010)), o que indica que possivelmente cultivares de café resistentes à ferrugem expressam este gene de maneira constitutiva em maior quantidade do que as suscetíveis. Contudo, a cultivar resistente Clone 312 não obteve expressão deste gene significativamente diferente da cultivar suscetível, e com isso não podemos afirmar que todas as cultivares de café resistentes à ferrugem expressam o gene *PAL* de maneira constitutiva em maior quantidade do que as suscetíveis.

No gráfico referente a expressão do gene *CAD* observa-se que não houve diferença significativa (pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$)) entre a expressão relativa do gene *CAD* nas folhas das cultivares avaliadas neste experimento (FIGURA 4).

Figura 4-Expressão gênica relativa do gene *CAD* em folhas de café.



As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

A enzima cinamil álcool desidrogenase é importante na produção de lignina, polímero que dificulta a entrada de patógenos na célula vegetal. É a última enzima da rota metabólica responsável pela produção dos monolignóis (p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S)) os quais são utilizados na síntese da lignina. Após o ataque de um patógeno a uma planta, esta passa a expressar o gene *CAD* em maior quantidade (GOVENDER et al., 2017).

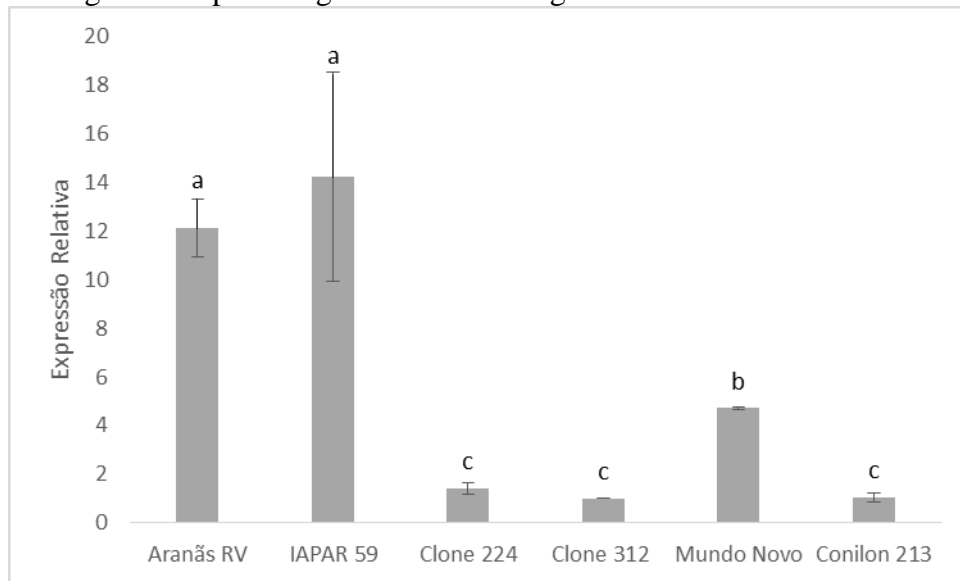
Em um trabalho realizado por Li et al. (2009), os pesquisadores produziram plantas de arroz transgênicas com gene *CAD* nocauteados. O resultado foi que as plantas modificadas apresentaram colmo flexível, semi-nanismo, florescimento tardio e menor rendimentos de grãos. O que comprova a importância da cinamil álcool desidrogenase na síntese de lignina.

Em um trabalho Grand et al. (1987), os pesquisadores identificaram um aumento rápido da expressão do gene *CAD* em células de feijão em suspensão tratadas com um eliciador do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, o que sugere que a *CAD* está ligada ao mecanismo de defesa da planta. Mauch-Mani e Slusarenko, 1996, observaram um aumento da atividade enzimática de *CAD* em plantas de trigo resistentes e suscetíveis ao fungo da ferrugem do caule *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* raça 32 após a inoculação do patógeno, porém esse aumento foi mais rápido nas plantas resistentes. Contudo, antes da inoculação não houve diferença da atividade de cinamil álcool desidrogenase entre as plantas resistentes e suscetíveis, resultado este que corrobora com o do presente trabalho (FIGURA 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Tronchet et al. (2010), em *Arabidopsis thaliana* e por Smit e Dubery (1997), em algodão.

A partir dos resultados da Figura 4 podemos afirmar que possivelmente não existe diferença constitutiva de expressão do gene *CAD* entre cultivares resistentes e suscetíveis à ferrugem.

Já com gráfico referente a expressão do gene *POX* nota-se que as cultivares resistentes à ferrugem, Aranãs RV e IAPAR 59, obtiveram as maiores expressões relativas do gene *POX* nas folhas, seguidas por Mundo Novo IAC 379-19 em segundo lugar e as demais cultivares obtiveram os menores níveis de expressão não diferenciando significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) (FIGURA 5).

Figura 5-Expressão gênica relativa do gene *POX* em folhas de café.



As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Peroxidases são muito importantes no combate à patógenos pelas plantas e tem um papel fundamental na síntese da lignina, pois estas enzimas sintetizam a lignina na parede celular pela polimerização dos monolignóis produzidos no citoplasma (ALEJANDRO et al., 2012). Plantas que superexpressam genes *POX* possuem resistência à patógenos aumentada quando comparadas com as selvagens (QUE et al., 2017).

Há vários trabalhos que comprovam o papel das peroxidases na defesa vegetal. No trabalho de Cardoso (2009), a autora concluiu que há uma maior expressão do gene *POX* em cafeeiro suscetível à ferrugem quando inoculado com *Hemileia vastatrix*. Retig (1974), relatou que um aumento na atividade da enzima peroxidase ocorreu em raízes de tomate resistente à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 24 horas após a inoculação do fungo, enquanto que na cultivar suscetível um aumento similar foi encontrado 48 h após a inoculação.

Bindschedler et al. (2006) observaram que plantas de *Arabidopsis thaliana* suscetíveis à *Fusarium oxysporum* tinham uma menor expressão de genes relacionados à síntese de peroxidase do tipo III e exibiram uma explosão oxidativa prejudicada quando comparadas com plantas resistentes. Gayoso et al. (2010) quantificaram a atividade de peroxidase em raízes de plantas de tomate resistentes e suscetíveis ao fungo *Verticillium dahliae* nos tempos 0, 8, 16, 24, 96 e 192 horas após a inoculação do fungo. No tempo 0 não houve diferença de atividade da *POX* entre as plantas, porém após algumas horas as plantas resistentes apresentaram atividade enzimática da peroxidase maior do que as plantas suscetíveis. Vale

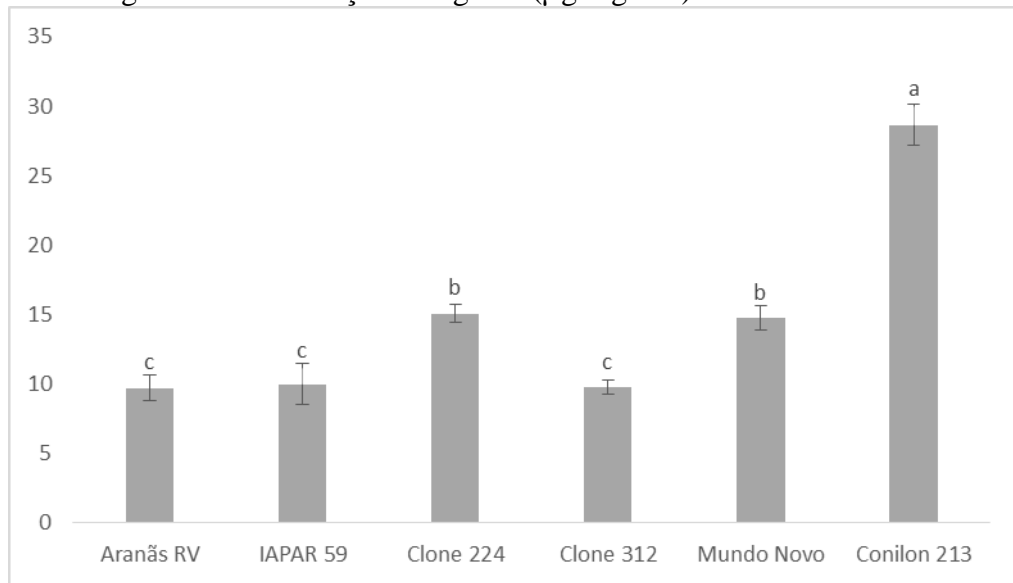
ressaltar que também foi mensurada a atividade de POX das plantas resistentes e suscetíveis sem a inoculação do fungo, e os resultados demonstram que não houve diferença entre as plantas resistentes e suscetíveis. Estes resultados diferem dos encontrados no presente trabalho, pois as cultivares resistentes Clone 224, Clone 312, Conilon 213 obtiveram expressão relativa do gene *POX* significativamente menor do que a suscetível Mundo Novo IAC 379-19. Porém as cultivares resistentes Aranãs RV e IAPAR 59 apresentaram expressão relativa do gene *POX* significativamente maior do que a cultivar suscetível Mundo Novo IAC 379-19.

O resultado geral das análises de expressão gênica relativa revela que não há um padrão de expressão constitutiva de genes relacionados à defesa vegetal quando comparadas cultivares de café resistentes e suscetíveis, pois algumas cultivares resistentes apresentaram maior expressão de determinados genes e outras apresentaram menor expressão do que a cultivar suscetível.

4.3 Lignina e fenóis solúveis totais

A partir do gráfico referente à concentração de lignina na folha observa-se que a cultivar Conilon 213 foi a que apresentou a maior concentração de lignina (FIGURA 6). De maneira não esperada, a cultivar suscetível à ferrugem (Mundo Novo IAC 379-19) obteve concentração de lignina significativamente maior do que as cultivares Aranãs RV, IAPAR 59 e Clone 312, as quais mostraram-se resistentes ao patógeno em questão. Clone 224 não obteve resultado significativamente diferente da cultivar Mundo Novo IAC 379-19.

Figura 6-Concentração de lignina ($\mu\text{g}/\text{mg MS}$) em folhas de café.

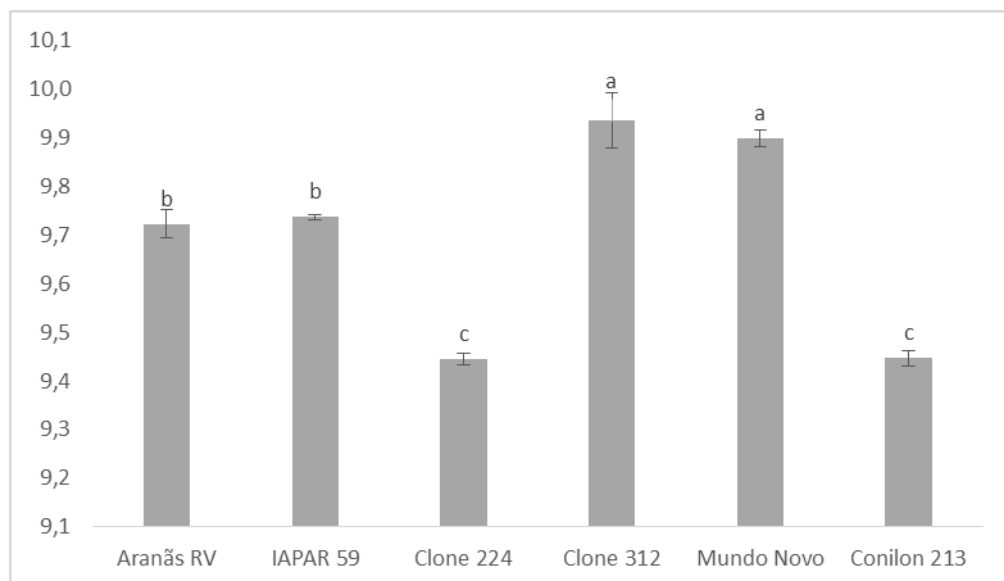


As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

De acordo com o gráfico referente à concentração de fenóis solúveis totais nas folhas, as cultivares Clone 312 e Mundo Novo IAC 379-19 apresentaram a maior concentração de fenóis solúveis totais nas folhas, seguidas por Aranãs RV e IAPAR 59. Clone 224 e Conilon 213 apresentaram a menor concentração de fenóis solúveis totais nas folhas (FIGURA 7).

Figura 7-Concentração de fenóis solúveis totais ($\mu\text{g}/\text{mg MS}$) em folhas de café.



As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

A resistência à ferrugem pode estar ligada a concentração de lignina nas folhas, uma vez que a lignina dificulta a penetração de fungos nas plantas, por constituir uma barreira física, e dificulta inclusive a infiltração de enzimas e toxinas fúngicas nas paredes celulares das plantas (LIU et al., 2018).

Em um estudo realizado por Cahill e McComb (1992), foi mostrado que o teor de lignina e fenóis solúveis totais aumentavam em raízes de eucalipto resistente (*Eucalyptus calophylla*) à *Phytophthora cinnamomi* após a inoculação do patógeno, porém em plantas de eucalipto suscetíveis (*Eucalyptus marginata*) as concentrações destas substâncias permaneceram quase inalteradas alguns dias após a inoculação. Antes da inoculação, as plantas resistentes já possuíam concentrações de lignina e fenóis solúveis maiores do que as plantas suscetíveis.

Outro dado interessante apresentado no trabalho anteriormente citado é que, as análises foram realizadas em 5 segmentos de raízes, com 1 centímetro cada, cortados sequencialmente a partir da ponta da raiz, e verificou-se que o teor de lignina crescia da ponta para a outra extremidade da raiz, já o teor de fenóis solúveis crescia da outra extremidade para a ponta. Este resultado corrobora com os dados obtidos no presente trabalho, pois correlacionando os gráficos de concentração de lignina e fenóis solúveis totais, podemos observar que os resultados são inversamente proporcionais. As cultivares que obtiveram as maiores concentrações de lignina foram também as que apresentaram as menores concentrações de fenóis solúveis totais e vice-versa. Isto pode ter ocorrido porque compostos fenólicos são substrato para a síntese de lignina pela ação da peroxidase (KUHN et al., 2010).

Kang e Buchenauer (2000), realizaram um estudo no qual quantificaram lignina em espigas de trigo resistentes e suscetíveis ao fungo *Fusarium culmorum*. Da mesma forma que os resultados de Cahill e McComb (1992), após a inoculação do patógeno houve um maior aumento da concentração de lignina na cultivar de trigo resistente do que na suscetível. Contudo, não houve diferenças nos teores de lignina nas espigas de trigo entre cultivares suscetíveis e resistentes em relação ao tecido saudável não inoculado, resultado este que difere do encontrado por Cahill e McComb (1992).

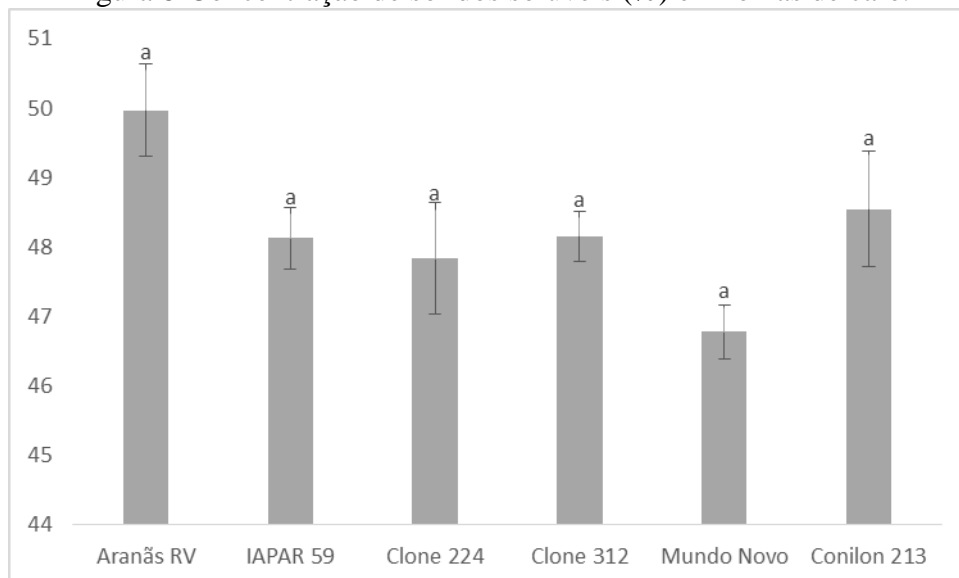
A divergência entre os resultados de Cahill e McComb (1992) e Kang e Buchenauer (2000) corrobora com a divergência dos resultados de concentrações de lignina e fenóis solúveis totais deste trabalho, pois não há um padrão entre a concentração constitutiva de lignina e fenóis solúveis totais entre as cultivares resistentes e a suscetível testadas neste trabalho.

A partir dos resultados das Figuras 6 e 7, observamos que não há uma relação entre a concentração constitutiva de lignina e fenóis solúveis totais e a resistência à ferrugem nas cultivares de cafeeiro testadas. Lignina e fenóis solúveis totais são importantes na defesa vegetal, porém os resultados apresentados sugerem que cultivares de café resistentes à ferrugem não produzem esses compostos em maior quantidade do que as cultivares suscetíveis de forma constitutiva como forma de se preparar antecipadamente para o ataque do patógeno.

4.4 Sólidos solúveis

Não houve diferença significativa entre as cultivares para concentração de sólidos solúveis nas folhas (FIGURA 8). Este resultado difere do encontrado por Silva (2015), em que a autora encontrou uma concentração de sólidos solúveis significativamente maior nas folhas da cultivar IAPAR 59 do que em Mundo Novo 376/4. Contudo, vale ressaltar que as plantas utilizadas neste experimento estavam no seu primeiro ano produtivo; em contrapartida as plantas utilizadas no experimento de Silva (2015) eram mudas de café.

Figura 8-Concentração de sólidos solúveis (%) em folhas de café.



As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

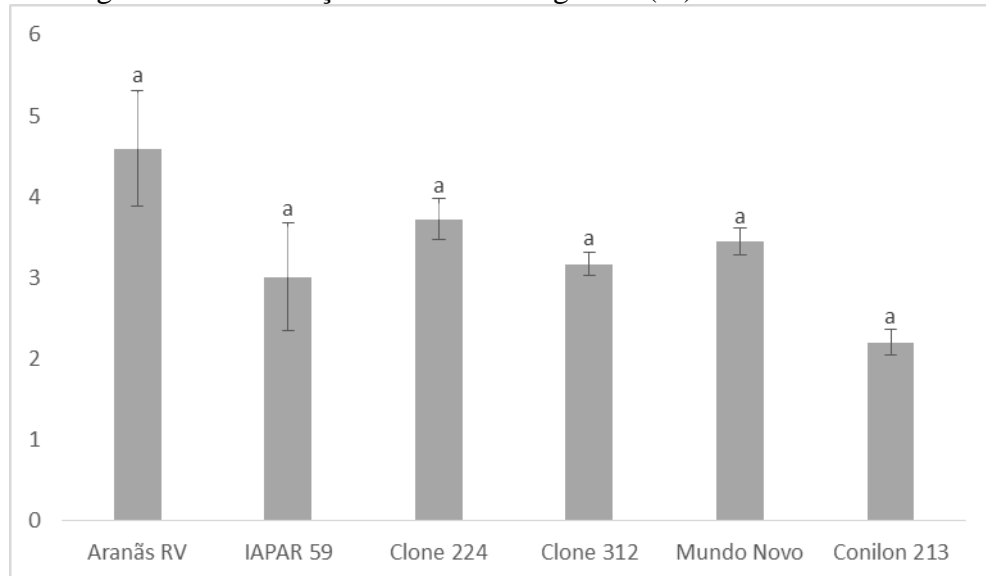
Fonte: Do autor (2018).

Com resultado da análise do teor de sólidos solúveis, notamos que não há uma relação entre a concentração constitutiva de sólidos solúveis nas folhas e a resistência à ferrugem nas cultivares de cafeeiro testadas.

4.5 Análise cromatográfica

Não houve diferença significativa entre as cultivares para concentração de ácido clorogênico nas folhas (FIGURA 9). Ácido clorogênico é um composto fenólico com atuação na resistência de plantas à patógenos relatada em vários estudos, como nos trabalhos a seguir.

Figura 9-Concentração de ácido clorogênico (%) em folhas de café.



As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

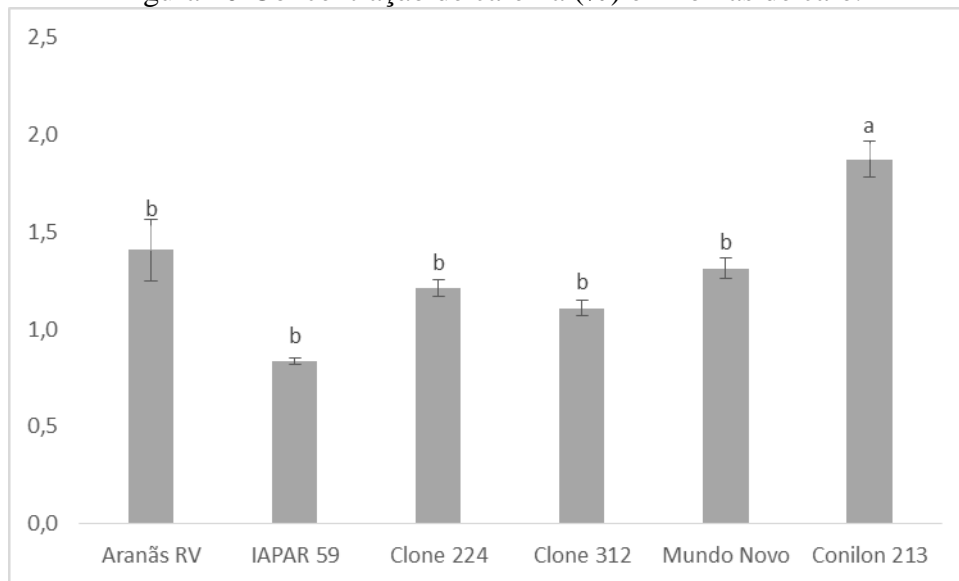
Um estudo realizado por Salgado (2009) indica que a concentração de alguns ácidos clorogênicos em folhas de cafeeiro aumentou após serem inoculadas em laboratório por *Hemileia vastatrix*. Akazawa e Wada (1961) identificaram um aumento na concentração de ácido clorogênico em batata doce após a infecção por *Ceratocystis fimbriata*, porém neste trabalho também foi identificado um aumento deste composto após a realização de cortes nas batatas, o que demonstra que o ácido clorogênico também está envolvido na resposta contra ferimentos mecânicos. Ngadze et al. (2012) mostraram resultados parecidos, quando identificaram que cultivares de batata resistentes à podridão macia apresentavam maior teor de ácido clorogênico do que cultivares suscetíveis, algumas horas após a infecção com o patógeno.

Atanasova-Penichon, et al. (2012), revelaram que antes da inoculação do patógeno *Fusarium graminearum*, uma cultivar de milho resistente apresentava teor de ácido clorogênico maior do que uma cultivar suscetível, resultado este que difere do apresentado no presente trabalho, onde mostra que não houve diferença significativa de concentração de

ácido clorogênico entre as cultivares de café resistentes e a suscetível à ferrugem. Os resultados revelam que a função de defesa do ácido clorogênico não é constitutivamente ativa de maneira diferente em cultivares de café resistentes e suscetíveis à ferrugem.

A cultivar Conilon 213 apresentou concentração de cafeína nas folhas significativamente maior do que as demais cultivares, as quais não obtiveram diferença significativa entre si (FIGURA 10).

Figura 10-Concentração de cafeína (%) em folhas de café.



As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Os resultados da Figura 10 corroboram com a literatura, pois geralmente cultivares de *Coffea canephora* possuem maior quantidade de cafeína do que cultivares de *Coffea arabica* (PERROIS et al., 2015).

Medeiros et al. (1990) identificaram em um experimento que o teor de cafeína das folhas de café infectadas por *Hemileia vastatrix* foi maior no quinto dia após a inoculação em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis. Os pesquisadores demonstraram que a cafeína tem um efeito tóxico no alongamento do tubo germinativo dos fungos *H. vastatrix* e sugeriram que ela pode contribuir com o mecanismo de resistência do café à ferrugem.

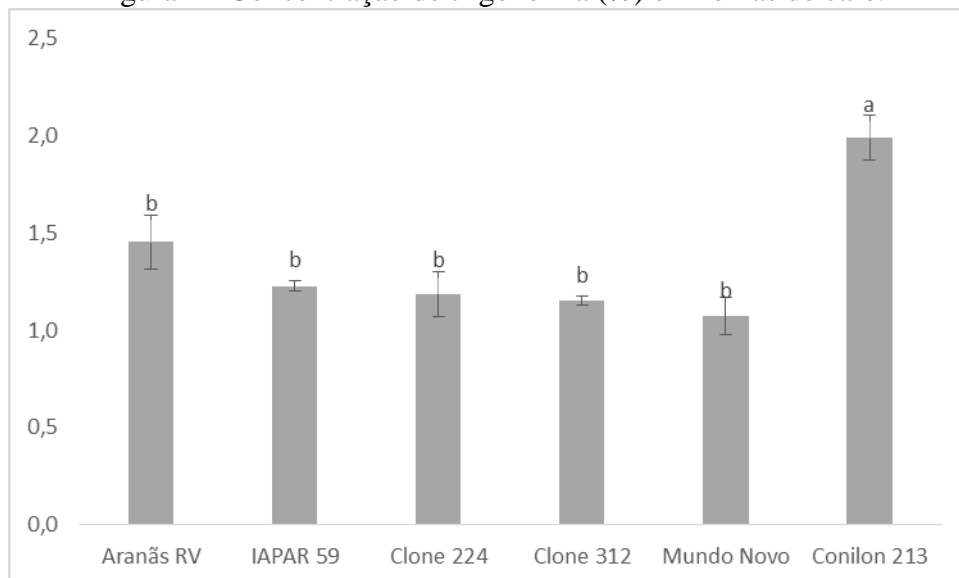
Gonçalves et al. (1995) observaram um aumento na concentração de cafeína em plantas de cafeeiro inoculadas com *M. incógnita*. Guerreiro e Mazzafera (2000) realizaram um estudo com cultivares de café com diferentes níveis de resistência ao bicho mineiro. Neste estudo os autores relataram que houve um aumento de cafeína em folhas após o ataque do

inseto, porém o experimento não estabeleceu uma correlação significativa entre a redução do dano das folhas e o teor de cafeína do tecido. Aneja e Gianfagna (2001) relataram uma possível atuação da cafeína contra infecção pelo fungo *Crinipellis perniciososa* em cacau.

Apesar de a cafeína estar envolvida na defesa vegetal (DORSEY; JONES, 2017) os resultados deste trabalho sugerem que cultivares de café resistentes à ferrugem não produzem constitutivamente este composto em maior quantidade do que cultivares suscetíveis.

A cultivar Conilon 213 apresentou concentração de trigonelina nas folhas significativamente maior do que as demais cultivares, as quais não obtiveram diferença significativa entre si (FIGURA 11).

Figura 11-Concentração de trigonelina (%) em folhas de café.



As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Machado et al. (2012) realizaram um estudo no qual identificaram que uma cultivar de café resistente à nematoide (IAPAR 59) possuía maior concentração de trigonelina nas raízes antes e 24 horas após a inoculação de *Meloidogyne exigua* do que a cultivar suscetível (Catuaí Vermelho). Contudo, a partir dos resultados da Figura 11 observa-se que apenas a cultivar Conilon 213 (resistente) apresentou concentração de trigonelina nas folhas significativamente maior do que a cultivar suscetível. O resultado da Figura 11 revela que, diferente do trabalho de Machado et al. (2012) realizado com raízes de café, cultivares de café resistentes à ferrugem não produzem constitutivamente maior quantidade de trigonelina nas folhas do que cultivares suscetíveis.

Com os resultados das análises cromatográficas, conclui-se que não há uma relação entre a concentração constitutiva do composto fenólico ácido clorogênico e dos alcaloides cafeína e trigonelina nas folhas, e a resistência à ferrugem nas cultivares de cafeeiro testadas.

A partir deste resultado e dos resultados de outros experimentos citados neste trabalho podemos afirmar que, possivelmente, as plantas de café resistentes à ferrugem não produzem de maneira constitutiva maior quantidade de compostos relacionados à defesa vegetal do que as suscetíveis como forma de economia de energia e melhor uso dos recursos que possui para o seu desenvolvimento naquele momento.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que não há relação entre a expressão relativa constitutiva dos genes *PAL*, *CAD* e *POX*, concentração constitutiva de lignina, fenóis solúveis totais, sólidos solúveis totais, ácido clorogênico, cafeína e trigonelina nas folhas, e a resistência à ferrugem do cafeeiro nas cultivares testadas neste experimento.

Como perspectivas futuras, seria interessante realizar este experimento com inoculação do fungo *Hemilei vastatrix* para se comparar os resultados após a inoculação do patógeno com os resultados constitutivos deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. **Plant Pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. chap. 11, p. 562-580.
- AKAZAWA, T.; WADA, K. Analytical study of ipomeamarone & chlorogenic acid alterations in sweet potato roots infected by *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Physiology**, v. 36, n. 2, p. 139, 1961.
- ALEJANDRO, Santiago et al. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. **Current Biology**, v. 22, n. 13, p. 1207-1212, 2012.
- AMARE, Meareg; AKLOG, Senait. Electrochemical Determination of Caffeine Content in Ethiopian Coffee Samples Using Lignin Modified Glassy Carbon Electrode. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2017, 2017.
- ANEJA, Madhu; GIANFAGNA, Thomas. Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicios*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 1, p. 13-16, 2001.
- AQUINO, F.W.B.; RODRIGUES, S.; NASCIMENTO, R.F.; CASEMIRO, A.R.S. Simultaneous determination of agind markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 569-574, 2006.
- ATANASOVA-PENICHON, Vessela et al. Chlorogenic acid and maize ear rot resistance: A dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, n. 12, p. 1605-1616, 2012.
- BARAKAT, Abdelali et al. The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Populus*: phylogeny, organization, and expression. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 26, 2009.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BINDSCHEDLER, Laurence V. et al. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. **The Plant Journal**, v. 47, n. 6, p. 851-863, 2006.
- BRUESKE, Charles H. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato roots infected and resistant to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiological Plant Pathology**, v. 16, n. 3, p. 409-414, 1980.
- CAHILL, David M.; MCCOMB, Jen A. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 40, n. 5, p. 315-332, 1992.
- CARDOSO, Danielle Cunha. Análise quantitativa da expressão gênica de quitinase e peroxidase induzida por acibenzolar-S-metil e extrato vegetal em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. 2009.

CHALFOUN, S. M.; ZAMBOLIM, L. Ferrugem do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 42-46, jun. 1985.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 2, p. 764-775, 1955.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO Acompanhamento da safra brasileira 2018: Disponível em: < www.conab.gov.br/ >. Acesso em: 21 fevereiro de 2018.

CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ. Cultivares de café. Disponível em: <<http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/index.php/2016-05-09-18-10-56>>. Acesso em: 22 fevereiro 2017.

CUNHA, R. L. D., Pozza, E. A., Dias, W. P., & Barretti, P. B. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. **SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**, v. 2, p. 1101-1108, 2001.

DORSEY, Benjamin M.; JONES, Marjorie A. Healthy components of coffee processing by-products. In: **Handbook of Coffee Processing By-Products**. 2017. p. 27-62.

GAYOSO, Carmen et al. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 232, 2010.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas e seu controle**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 184-200.

GONÇALVES, W. et al. Biochemical basis of coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita*. **Plantations Recherche Développement**, v. 2, n. 1, p. 54-60, 1995.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia, University of Missouri Press, 1986. 433p.

GOVENDER, Nisha T. et al. The phenylpropanoid pathway and lignin in defense against *ganoderma boninense* colonized root tissues in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1395, 2017.

GRAND, Claude; SARNI, Farid; LAMB, Christopher J. Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. **The FEBS Journal**, v. 169, n. 1, p. 73-77, 1987.

GUERREIRO FILHO, Oliveira; MAZZAFERA, Paulo. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1447-1464, 2000.

HENDERSON, Susan J.; FRIEND, J. Increase in PAL and Lignin-like Compounds as Race-specific Resistance Responses of Potato Tubers to *Phytophthora infestans*. **Journal of Phytopathology**, v. 94, n. 4, p. 323-334, 1979.

HUSSAIN, Ghulam et al. Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. **International journal of biological sciences**, v. 14, n. 3, p. 341, 2018.

KANG, Zhensheng; BUCHENAUER, H. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat

spikes infected by *Fusarium culmorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 6, p. 255-268, 2000.

KUHN, Odair José et al. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 107-114, 2010.

LI, Wei et al. A novel N-methyltransferase in *Arabidopsis* appears to feed a conserved pathway for nicotinate detoxification among land plants and is associated with lignin biosynthesis. **Plant physiology**, v. 174, n. 3, p. 1492-1504, 2017.

LI, Xiangjun et al. FLEXIBLE CULM 1 encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. **Plant molecular biology**, v. 69, n. 6, p. 685-697, 2009.

LIU, Qingquan; LUO, Le; ZHENG, Luqing. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 335, 2018.

MACHADO, Alan Rodrigues Teixeira et al. Metabolic profiling in the roots of coffee plants exposed to the coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. **European journal of plant pathology**, v. 134, n. 2, p. 431-441, 2012.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. p. 387.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciencia Rural**. Santa Maria. vol. 27, n. 1 (jan./mar. 1997), p. 161-168, 1997.

MAUCH-MANI, Brigitte; SLUSARENKO, Alan J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **The Plant Cell**, v. 8, n. 2, p. 203-212, 1996.

MEDEIROS, MAPXL et al. Has caffeine a role in the resistance of coffee to the orange rust?. In: **13th International scientific colloquium on coffee, Paipa (Colombia) 21-25 August 1989**. Association Scientifique Internationale du Café, 1990. p. 733-744.

MINIUSSI, M. et al. Aquaporins in *Coffea arabica* L.: identification, expression, and impacts on plant water relations and hydraulics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 95, p. 92-102, 2015.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of coffee. **Biotechnology research international**, v. 2012, 2012.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSSI, J. A. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v. 1, p. 234-250, 2014.

NGADZE, Elizabeth et al. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 186-192, 2012.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v.30, p.369-389, 1992.

- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, v. 3, p. 417-453, 1995.
- PERROIS, Charlène et al. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). **Planta**, v. 241, n. 1, p. 179-191, 2015.
- PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- QUE, Youxiong et al. A novel L-ascorbate peroxidase 6 gene, ScAPX6, plays an important role in the regulation of response to biotic and abiotic stresses in sugarcane. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 2262, 2017.
- RAMIRO, D. A. et al. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology**, v. 58, n. 5, p. 944-955, 2009.
- RESENDE, M.L. et al. Mecanismos de defesa de plantas a patógenos. In: ZAMBOLIM, L. et al. **O Essencial da Fitopatologia: Epidemiologia de Doenças de Plantas**. v. 1. Viçosa. UFV - Departamento de Fitopatologia, 2014. p. 187-210.
- RETIG, N. Changes in peroxidase and polyphenoloxidase associated with natural and induced resistance of tomato to *Fusarium* wilt. **Physiological Plant Pathology**, v. 4, n. 2, p. 145-150, 1974.
- RIBEIRO, M. M; CHAGAS, S. J. R. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região Sul de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 1, 2009.
- RODRIGUES, C. J. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and 4 host resistances. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 5-9, Mar. 1990.
- RONG, Wei et al. A wheat cinnamyl alcohol dehydrogenase TaCAD12 contributes to host resistance to the sharp eyespot disease. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.
- SALGADO, Paula Rodrigues. Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*). 2009.
- SANTOS, M. A. I. Folhas de mandioca: caracterização de compostos fenólicos, atividades antioxidante e inseticida. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, 2013.
- SCHIEBER, E.; ZENTMYER, G. A. Coffee rust in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, n. 2, p. 89-93, Feb. 1984.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, p.227-248, 2008.
- SHADLE, Gail L. et al. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 153-161, 2003.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

- SIBOUT, Richard et al. CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and-D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 2059-2076, 2005.
- SILVA, Joyce Alves Goulart da. Quantificação de metabólitos secundários relacionados à resposta de defesa do cafeeiro contra *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, 2015.
- SILVA, M. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 119-147, 2006.
- SMIT, Franchoan; DUBERY, Ian A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. **Phytochemistry**, v. 44, n. 5, p. 811-815, 1997.
- SOUZA, Flávio de França et al. Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. 2004.
- SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, 1990.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. et al. **Fisiología vegetal/Plant physiology**. Universitat Jaume I, 2013.
- TRONCHET, Maurice et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 83-92, 2010.
- URBANEK, H.; KUZNIAKGEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean-leaves by botrytis-cinerea polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.
- VIDHYSEKARAN, P. **Physiology of disease resistance in plants**. Vol. I. Florida, CRC Press, 1988. 149p.
- YOON, Jinmi; CHOI, Heebak; AN, Gynheung. Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. **Journal of integrative plant biology**, v. 57, n. 11, p. 902-912, 2015.
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2016.
- ZHANG, Chuanzhong et al. Phenylalanine ammonia-lyase2. 1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 7242, 2017.
- ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 40, n. 5, p. 779-784, 1965.