

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DURANTE A INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL CAFEIEIRO-*Hemileia vastatrix*

Ana Paula Gallina^{2*}; Robson Ferreira de Almeida^{3*}; Eveline Teixeira Caixeta⁴; Eunize Maciel-Zambolim⁵; Fernanda de Souza Freitas⁶; Laércio Zambolim⁷; Ney Sussumu Sakiyama⁸

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café e pela FINEP

² Bolsista, M.Ss., Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, anagall@yahoo.com.br

³ Doutorando UFV, Viçosa-MG, rfdealmeida@yahoo.com.br

⁴ Pesquisador, D.Sc., Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br, autor para correspondência

⁵ Pesquisador, D.Sc., UFV, Viçosa-MG, eunize@ufv.br

⁶ Bolsista de Iniciação científica CNPq, UFV, Viçosa-MG, fernandaufv@yahoo.com.br

⁷ Professor, PhD., UFV, Viçosa-MG, zambolim@ufv.br

⁸ Professor, D.Sc., UFV, Viçosa-MG, sakiyama@ufv.br

* Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho

RESUMO: O trabalho teve como objetivo identificar genes envolvidos na resistência do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*, por meio da técnica de Hibridização Subtrativa por Supressão. Para isso, folhas do genótipo Híbrido de Timor CIFC 832/2 foram inoculadas com a raça II do fungo. Esse cafeeiro foi escolhido por ser resistente a todas as raças do patógeno identificadas até o momento. Nos períodos de 12 e 24 horas após a inoculação, os RNAs de folhas inoculadas e não inoculadas foram coletados e os cDNAs sintetizados. A subtração dos cDNAs resultou em quatro bibliotecas contendo 528 clones. Esses clones correspondem a potenciais genes diferencialmente expressos em respostas à infecção do cafeeiro a *H. vastatrix*. As subtrações foram realizadas em ambas as direções, de forma a possibilitar a identificação de genes induzidos e reprimidos na interação incompatível. A análise da sequência de 31 clones diferencialmente expressos indicou que muitos destes codificam proteínas envolvidas com a resposta de defesa de hospedeiro a fitopatógenos, como por exemplo, quitinases, proteases serina e endoxyloglucano transferase. A caracterização futura de outros clones das bibliotecas, bem como a comprovação do envolvimento dos genes por outras técnicas de genômica funcional contribuirão para o esclarecimento do mecanismo molecular envolvidos na defesa do cafeeiro a *H. vastatrix*, visando dar subsídios à obtenção de variedades com resistência duradoura.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, ferrugem do cafeeiro, genes de resistência, mecanismo de defesa da planta, Hibridização Subtrativa por Supressão.

IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN INCOMPATIBLE INTERACTION OF COFFEE-*Hemileia vastatrix*

ABSTRACT: This work aims to identify coffee genes involved in resistance against the phytopathogen *Hemileia vastatrix* using suppression subtractive hybridization (SSH) technique. For this proposal, leaves of Híbrido de Timor CIFC 832/2 were inoculated with race II of the fungi. This genotype was chosen due to its resistance to all the known races of the pathogen. After 12 and 24 hours pos inoculation, the RNA of inoculated and non-inoculated leaves was collected and the cDNAs were synthesized. The cDNA subtraction resulted in four library containing 528 clones. These clones correspond to the potential differentially expressed genes in response to the *H. vastatrix* infection in coffee. The subtractions were performed in both directions to enable the identification of genes induced and repressed during the incompatible interaction. The analysis of 31 differentially expressed clones indicated that some of them codify proteins involved in host defense response to phytopathogens, for instance, chitanases, serine proteases, endoxyloglucan transferase. Further characterization of the remain clones of the library and validation of the involvement of these genes by other functional genomics techniques will contribute to the understanding of the molecular mechanism involved in coffee defense to *H. vastatrix*.

Key words: *Coffea arabica*, coffee leaf rust, resistance genes, plant defense mechanisms, suppression subtractive hybridization

INTRODUÇÃO

As doenças do cafeeiro vêm ao longo dos anos afetando a qualidade e a produtividade do café. Dentre as doenças que ocorrem no cafeeiro, a ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é a mais importante por causar grandes prejuízos para a cafeicultura. Inicialmente confinada na África e Ásia, esta doença chegou ao Brasil em 1970 e, atualmente, encontra-se presente em todos os países produtores de café, exceto no Havaí e na Austrália. Os danos econômicos causados pela doença têm sido agravados pelo fato de a maioria dos cafeeiros cultivados da espécie *C. arabica* apresentarem-se suscetíveis ao fungo (Van der Vossen, 2001). No Brasil, estima-se que as perdas ocasionadas

podem atingir até 30%, se medidas eficientes de controle não forem adotadas (Kushalappa & Eskes, 1989; Zambolim *et al.*, 1999).

Os principais danos provocados pela doença são evidenciados pela queda prematura de folhas, o que resulta na redução de área foliar e seca de ramos laterais conduzindo, gradualmente, a deformação da planta atacada (Guzzo, 2004). O emprego do controle químico mostra-se eficaz pela utilização de fungicidas protetores cúpricos e/ou sistêmicos do grupo dos triazóis (Matiello *et al.*, 2002; Zambolim *et al.*, 2002). Embora eficientes, os efeitos causados ao meio ambiente e aos organismos não-alvos poderão conduzir a explosões populacionais de pragas e/ou de outras doenças do cafeeiro. Adicionalmente, a pressão de seleção exercida sobre o patógeno com esta estratégia de controle predispõe ao surgimento de novas raças resistentes aos produtos aplicados (Zambolim *et al.*, 2002). Dessa forma, uma alternativa de controle é a obtenção de cultivares portadores de genes de resistência ao patógeno (Fazuoli *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Sera *et al.*, 2002; Fazuoli *et al.*, 2005). O uso de resistência genética é a principal medida, sobretudo pela eficiência, pela economia e pelo menor prejuízo ao meio ambiente. Ressalta-se ainda a grande importância na disponibilidade de tais variedades resistentes, principalmente em sistemas de cultivo onde o emprego do controle químico sofra restrições, seja por imposição das entidades reguladoras, como no caso da cafeicultura orgânica, seja pela dificuldade de operacionalização das aplicações, como no caso de cultivos adensados próximos a mananciais e plantio em declive. Assim sendo, o emprego de variedades resistentes ou tolerantes à ferrugem pode contribuir para a racionalização das medidas de controle químico, através da redução do número de aplicações de fungicidas.

Os trabalhos de melhoramento desenvolvidos pelas instituições de pesquisa do país têm buscado, vigorosamente, entre outros fatores, disponibilizar variedades resistentes ou tolerantes à ferrugem. No entanto, deve-se considerar que por tratar-se de uma cultura perene, os resultados de um programa desta natureza demandam um longo período de tempo. Além disso, melhoristas de café enfrentam a dificuldade da grande variabilidade do patógeno e o aparecimento de novas raças devido à pressão de seleção (Várzea & Marques, 2005), demandando esforço contínuo no desenvolvimento de novas variedades resistentes. Desta forma, a nova revolução da biologia molecular e os grandes avanços das técnicas de biotecnologia, disponíveis atualmente, podem oferecer alternativas para a redução do tempo de obtenção de novos genótipos, auxiliando as várias etapas do melhoramento genético.

Além disso, as técnicas moleculares podem contribuir para o entendimento da interação planta-patógeno. A elucidação de vias de sinalização de defesa que levam a resistência em plantas, e que são ativadas após o reconhecimento do patógeno potencial, são relevantes para maior compreensão dessa interação (Schenk *et al.*, 2000). A identificação de diferentes elementos e suas interações envolvidas no processo de infecção da planta pelo patógeno fornecerá subsídios para o conhecimento do mecanismo de resistência do cafeeiro, visando à obtenção de resistência duradoura.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo identificar genes envolvidos na resistência e defesa do cafeeiro à ferrugem, por meio da técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (HSS).

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação das plantas:

Duas plantas do cafeeiro Híbrido de Timor CIFC 832/2, apresentando boas condições nutricionais, foram usadas para a execução deste experimento. Esse cafeeiro foi escolhido por ser resistente a todas as raças de *H. vastatrix* identificadas até o momento. Duas folhas jovens e completamente desenvolvidas do terço superior de uma das plantas foram inoculadas com a raça II de *H. vastatrix*. Para isso, uredosporos do fungo foram depositados, com auxílio de um pincel, na face abaxial das folhas. As folhas foram aspergidas com água destilada até obter-se um leve molhamento superficial. Folhas da planta controle (não inoculada) também foram pulverizadas com água destilada. As plantas foram mantidas no escuro, a 22°C e umidade relativa próximo a 100%. Após 12 e 24 horas da inoculação, as folhas foram coletadas para extração de RNA.

Extração de RNA e síntese de cDNA:

As folhas foram destacadas das plantas, imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e levadas para o laboratório BioCafé. O RNA foi extraído utilizando Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante. A purificação do mRNA foi realizada utilizando Dynabeads® mRNA Purification Kit (DynaL Biotech – Invitrogen) e os cDNAs sintetizados utilizando SMART™ PCR cDNA Synthesis kit (Clontech), de acordo com as indicações do fabricante. Dessa forma, foram obtidas quatro amostras de cDNA: (1) Híbrido de Timor inoculado, coleta 12hs após inoculação (HT I 12hs); (2) Híbrido de Timor não inoculado 12hs (HT NI 12 hs); Híbrido de Timor inoculado, coleta 24hs após a inoculação (HT I 24 hs); e, Híbrido de Timor não inoculado 24hs (HT NI 24hs).

Hibridização Subtrativa e clonagem dos cDNAs:

A Hibridização Subtrativa Supressiva (HSS) foi realizada com PCR-Select cDNA Substration Kit (Clontech), de acordo com o protocolo do fabricante. Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em células de *Escherichia coli* DH-5a por choque térmico. Os clones transformantes foram selecionados em LB (Luria-Bertani broth) contendo ampicilina (200mg/ml) e X-GAL (20mg/ml) e crescidos em seguida em meio líquido. O estoque das colônias foi obtido através da transferência de 300 ml da cultura para tubos de 1,5 ml juntamente

com 300ml de glicerol 50% para que a mistura ficasse na proporção 1:1. A mistura foi rapidamente congelada em Nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C.

Purificação do DNA plasmidial

Para a obtenção do DNA plasmidial, a cultura foi ativada em 5 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (200mg/ml) por 12hs. Em seguida, o DNA plasmidial foi purificado utilizando Wizard DNA Extraction Kit (Promega), seguindo-se as indicações do fabricante.

Sequenciamento e análise dos clones recombinantes

Os cDNAs clonados foram sequenciados em um sequenciador automático MegaBACE 1000. A homologia dessas sequências foi analisada utilizando Basic local alignment search tools (BLASTN) comparando-as àquelas depositadas no banco de dados do Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBG), National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL Nucleotide Sequence Database, SOL Genomics Network e HarvEST database. As sequências foram também agrupadas quanto as suas funções. Para esta anotação foi utilizado Blast2GO que permite a classificação quanto à função biológica associada à sequência analisada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando o método HSS, quatro bibliotecas de cDNA foram enriquecidas com sequências diferencialmente expressas. As bibliotecas obtidas e os números de clones, contendo fragmentos de potenciais genes diferencialmente expressos, que formam cada biblioteca estão descritos na Tabela 1. As subtrações foram realizadas em ambas as direções, *forward* e *reverse*. As bibliotecas *Forward* (F) correspondem às obtidas do cafeeiro inoculado com o fungo, subtraído do não inoculado e as bibliotecas *Reverse* (R) do cafeeiro não inoculado, subtraído do inoculado. A subtração na direção *forward* enriquece a amostra para os cDNAs presentes apenas nas plantas inoculadas. Assim, espera-se que a biblioteca *Forward* seja constituída de genes induzidos durante a interação Híbrido de Timor-*H. vastatrix*. O contrário ocorre na biblioteca *Reverse*, na qual a subtração seleciona genes expressos apenas nas plantas não inoculadas e, portanto, correspondem a genes reprimidos durante a infecção.

Tabela 1. Descrição das bibliotecas obtidas por meio de Hibridização Subtrativa por Supressão, contendo potenciais genes diferencialmente expressos na interação incompatível cafeeiro-*H. vastatrix*.

Nome da biblioteca (F/R ^a)	Descrição ^b	Número de clones obtidos
HTI 12hs (F)	HTI 12hs subtraído do HTNI 12hs	104
HTNI 12hs (R)	HTNI 12hs subtraído do HTI 12hs	142
HTI 24hs (F)	HTI 24hs subtraído do HTNI 24hs	151
HTNI 24hs (R)	HTNI 24hs subtraído do HTI 24hs	131

^aF corresponde a *Forward* e R a *Reverse*

^b HTI 12hs e HTI 24hs - cDNA obtido de folhas do cafeeiro Híbrido de Timor inoculado com *H. vastatrix*, coleta das folhas realizada, respectivamente, 12hs e 24 hs após a inoculação; HTNI 12hs e HTNI 24hs - cDNA obtido de folhas de Híbrido de Timor não inoculado.

Os períodos de coleta das amostras 12 e 24hs foram escolhidos por serem estes os momentos de desenvolvimento do apressório (12hs) e de penetração do fungo por meio do estômato (24hs) (Silva *et al.*, 2002). Em interação incompatível, o fungo tem seu crescimento impedido em diferentes estágios durante o processo de infecção.

A biblioteca HTI 12h, que corresponde aos cDNAs obtidos 12 hs após a inoculação subtraído dos cDNAs de planta não inoculada, ficou constituída de 104 clones. Na biblioteca HTNI 12hs, cDNA de plantas não inoculadas subtraídos de cDNAs de planta inoculada, foram obtidos 142 clones. Duas outras bibliotecas foram construídas por meio da coleta de amostras à 24hs após a inoculação. Estas bibliotecas, identificadas como HTI 24hs e HTNI 24hs, ficaram constituídas de 151 e 131 clones, respectivamente.

Dos clones diferencialmente expressos obtidos com a HSS, 31 provenientes da biblioteca HTI 12h foram sequenciados. O tamanho das sequências obtidas variou de 175pb a 1340pb. As sequências diferencialmente expressas apresentaram alta identidade com sequências depositadas em alguns bancos de dados ($10^{-11} < E\text{-value} < 0$). Algumas delas mostraram identidade com sequências que codificam proteínas envolvidas com resposta de defesa de plantas hospedeiras a patógeno, como quitinases, serina proteases e endoxyloglucano transferase (Tabela 2).

Genes codificando enzimas hidrolíticas como quitinases, que degradam componentes da parede celular são candidatos a genes importantes na resistência a doenças. Plantas de tabaco expressando constitutivamente quitinases apresentaram aumento da resistência ao fungo patogênico *Rhizoctonia solani* (Brogue *et al.*, 1991).

Quitinases podem ser considerados marcadores de resposta sistêmica adquirida (SAR) que são induzidos em resposta a fungos e bactérias. Ácido quitinase classe III foi diferencialmente expresso em *C. arabica* durante infecção causada por *H. vastatrix* (Fernandez *et al.*, 2004).

Serina proteinases apresentam-se envolvidas na morte celular em plantas. A ruptura do DNA durante o processo de morte celular (resposta de hipersensibilidade) tem envolvido a atividade dessas proteínas (Dong *et al.*, 1997). A rápida morte celular em planta é uma resposta comum durante interações incompatíveis. O mecanismo de

resistência associado com resposta de hipersensibilidade (HR) apresenta-se eficiente contra patógenos biotróficos, como fungos causadores de ferrugem do cafeeiro, *H. vastatrix* (Silva *et al.*, 2002).

Endoxyloglucanos transferase podem funcionar incorporando novos glucanos durante o desenvolvimento da parede celular da planta. A função dessas enzimas tem sido relacionada ao rearranjo e fortalecimento da parede celular (Albert *et al.*, 2004).

Tabela 2. Descrição dos cDNAs diferencialmente expressos identificados na biblioteca HTI 12hs

EST	Resultado do Blastn	E-value PBGC ^a	E-value NCBI ^b	E-value EMBL ^c	E-value SOL ^d	E-value HarvEST ^e
A01	RNA polymerase II subunit(hsRPB10)[<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1e-32		1,7e-08	2e-15	2e-89
A06	No hits found	e-147	ns	ns	2e-27	ns
B01	Endoxyloglucan transferase [<i>Daucus carota</i>]	0,0	ns	9e-108	0,0	0,0
B02	Hypothetical protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	0,0	ns	ns	0,0	0,0
B04	No hits found	e-169	2e-88	ns	ns	ns
B05	No hits found	0,0	ns	3e-111	8e-60	5e-49
B06	60S ribosomal protein L24 [<i>Prunus avium</i>]	3e-38	ns	3e-16	3e-35	2e-35
B07	Hypothetical protein F7H19.70 expressed protein	0,0	ns	9e-119	0,0	0,0
B10	ADP-ribosylation factor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	0,0	2e-98	3e-96	0,0	1e-26
B11	No hits found	e-144	ns	ns	2e-99	e-143
B12	Unknown protein [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	e-162	ns	ns	1e-157	e-157
C01	No hits found	8e-78	ns	ns	ns	2e-12
C02	60S ribosomal protein l34	0,0	8e-66	1,0e-88	0,0	0,0
C03	Catalase	e-123	1e-66	3,0e-48	1e-124	e-127
C05	No hits found	5e-49	ns	4,7e-18	9e-52	8e-52
C06	Chaperone protein dnaJ-related	0,0	ns	3,3e-104	0,0	0,0
C07	Cysteine protease 1 [<i>Plantago major</i>]	8e-12	ns	2e-13	2e-13	2e-13
C12	Acidic class III chitinase SE2 [<i>Beta vulgaris</i>]	e-154	ns	3,2e-58	1e-159	e-159
D02	Chloroplast fatty acid desaturase 6(<i>Olea europaea</i>)Glycine max	0,0	6e-136	3,5e-139	0,0	0,0
D03	Metallothionein I	4e-14	ns	2,5e-20	5e-11	4e-11
D08	Metallothionein I homolog spotted monkey flower	e-124	ns	5,7e-47	1e-125	e-108
D10	Metallothionein-like protein [<i>Citrus unshiu</i>]	e-142	0,0	1,4e-80	1e-136	e-139
D11	Unknown protein [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	e-137	ns	1,4e-64	1e-136	0,0
E01	No hits found	0,0	ns	4,0e-96	ns	2e-66
E02	CCR4-associated factor 1-related protein	0,0	ns	2,9e-45	1e-125	e-125
E03	Protein glycine-rich cell wall structural protein precursor, ATPP2-B10	0,0	ns	1,1e-73	0,0	e-174
E04	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	e-166	7e-38	2,4e-97	0,0	0,0
E05	Hypothetical protein SB20O07.12 [<i>Sorghum bicolor</i>]	0,0	ns	9,0e-119	0,0	0,0
E06	No Hits Found	0,0	ns	1,7e-90	2e-66	2e-66
E07	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast	0,0	6e-58	3,2e-109	0,0	0,0
E08	Beta-galactosidase precursor	ns	ns	2,9e-26	1e-75	4e-72
F01	No Hits Found	0,0	ns	5,6e-112	0,0	ns

^a PBGC - Projeto Brasileiro do Genoma Café, ^b NCBI- National Center for Biotechnology Information, ^c EMBL- Nucleotide Sequence Database, ^d SOL Genomics Network e ^e HarvEST database

ns- Identidade não significativa

Os genes identificados foram agrupados em categorias funcionais de acordo com a classificação disposta no Blast2GO. Como mostrado na Figura 1, a maior parte das sequências identificadas na biblioteca HTI 12hs estão relacionadas principalmente com a atividade catalítica e atividade de ligação. As proteínas citadas anteriormente estão incluídas dentro dessas duas classes.

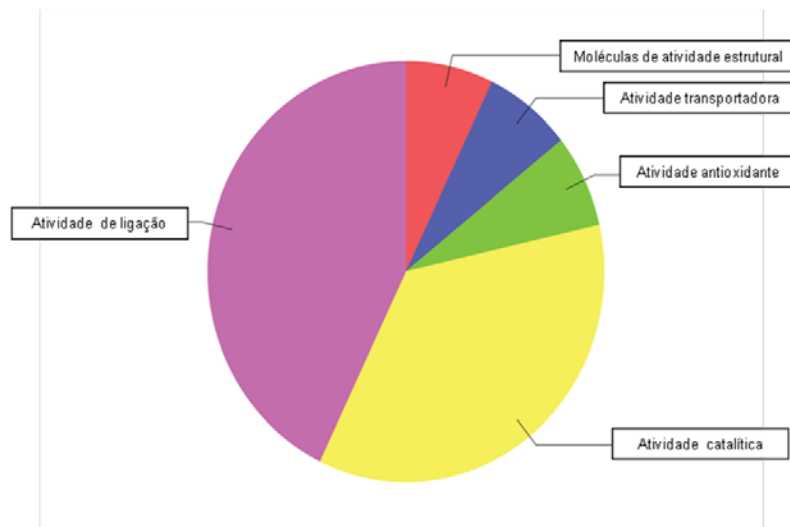


Figura 1. Categorias funcionais dos genes identificados por meio da HSS, 12hs após a inoculação de plantas de Híbrido de Timor CIFC 832/2 com *H. vastatrix*.

CONCLUSÕES

Por meio da metodologia de Hibridização Subtrativa por Supressão foram obtidas 528 clones de cDNA, que correspondem a potenciais genes diferencialmente expressos em respostas a infecção do cafeeiro a *H. vastatrix*. A análise da seqüência de 31 desses clones demonstrou que alguns deles apresentam similaridade com genes previamente caracterizados como envolvidos no mecanismo de resistência ativado durante a interação de diferentes plantas a patógenos.

A identificação de genes envolvidos na interação de cafeeiros a *H. vastatrix* 12hs após a inoculação é de grande importância para o entendimento das primeiras respostas dessa planta ao agente causador da ferrugem. A caracterização futura dos demais genes identificados e a confirmação e envolvimento dos genes no processo de defesa da planta permitirão ampliar o conhecimento do mecanismo envolvido na defesa de cafeeiros a esse patógeno. Esses conhecimentos poderão ser úteis para subsidiar a obtenção de variedades de cafeeiro com resistência duradoura, que é um grande desafio para os melhoristas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, M.; WENER, M.; PROKSCH, P.; FRY, S.C.; KALDENHOFF, R. The cell wall-modifying xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase *lexth1* is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite *Cuscuta reflexa*. **Plant Biology**, Darmstadt, v.6, n.4, p.402-407, 2004.
- BROGUE, K.; CHET, I.; HOLLIDAY, M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; KNOWLTON, S.; MAUVAIS, C.J.; BROGLIE, R.. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science**, Heildeberg, v.254, n.5035, p. 1194-1197, 1991.
- DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. **The American Journal of Pathology**, Rockville Pike, v.151, n.5, p.1205-1213, 1997.
- FAZUOLI, L.C.; MEDINA FILHO, H.P.; GONÇALVES, W.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arabica obtidas no Instituto Agronômico em Campinas. In: ZAMBOLIM, L. (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa: UFV, 2002. p.63-215.
- FAZUOLI, L.C.; OLIVEIRA, A.C.B.; TOMA-BRAGUINI, M.; SILVAROLLA, M.B. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at the IAC. In: ZAMBOLIM, L. (ed) Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa: UFV, 2005. p.137-185.
- FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BON, M.C.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M.. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, Reading, v.5, n.6, p. 527-536, 2004.
- GUZZO, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese de doutorado, Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 236p., 2004.
- KUSHALAPPA, A.C.; ESKES, A.B. Advances in coffee rust research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p.503-531, 1989.
- MATIELLO, J.B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A.W.R.; ALMEIDA, S.R.; FERNANDEZ, D.R. Cultura de café no Brasil. Novo Manual de Recomendações. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFE, 2002. 387p.

- PEREIRA, A.A.; MOURA, W.M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA; N.S.; CHAVES, G.M. Melhoramento genético do cafeeiro no Estado de Minas Gerais: cultivares lançados e em fase de obtenção. In: ZAMBOLIM, L. (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa: UFV, 2002. p.253-295.
- SERA, T.; ALTEIA, M.Z.; PETEK, M.R. Melhoramento do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). In: ZAMBOLIM, L. (eds) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa: UFV, 2002. p.217-251.
- SILVA, M.C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES, Jr. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Atlanta, v. 60 n.4, p.169-183, 2002.
- SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v.97, p.11655-11660, 2000.
- VAN DER VOSSSEN, H.A.M. Coffee breeding practices. In: CLARKE, R.J.; VITZTHUM, O.G. (eds) Coffee Recent Developments. London: Blackwell, 2001. p.184-201.
- 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. (eds.) Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa: UFV, 2005. p.53-74.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H.; CHAVES, G.M. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (ed) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa: UFV, 2002. p.369-450.
- ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Manejo integrado das doenças do cafeeiro In: ZAMBOLIM L (eds) Produção de café com qualidade. Viçosa: UFV, 1999. p.134-215.