



**FORMULAÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS E  
MICRONUTRIENTES NA INDUÇÃO DE  
RESISTENCIA EM MUDAS DE CAFEIRO  
CONTRA *Cercospora coffeicola***

**DANIEL RUFINO AMARAL**

**2008**

**DANIEL RUFINO AMARAL**

**FORMULAÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS E MICRONUTRIENTES  
NA INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM MUDAS DE CAFEIEIRO  
CONTRA *Cercospora coffeicola***

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Fitopatologia, a para obtenção do título de “Doutor”

**Orientador**

**Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2008**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos  
Técnicos da Biblioteca Central da UFLA**

Amaral, Daniel Rufino.

Formulações de extratos vegetais e micronutrientes na indução de resistência em mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* / Daniel Rufino Amaral. – Lavras : UFLA, 2008.

92 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. Cercosporiose. 2. *Coffea arabica*. 3. Extratos. 4. Indução de resistência. 5. Micronutrientes. 6. PR proteínas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.73944

**DANIEL RUFINO AMARAL**

**FORMULAÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS E MICRONUTRIENTES  
NA INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM MUDAS DE CAFEIEIRO  
CONTRA *Cercospora coffeicola***

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”

APROVADA em 7 de março de 2008

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA
Profa. Dra. Janice Guedes de Carvalho	UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun	Epamig
Dra. Sônia Maria de Lima Salgado	Epamig

**Prof. Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2008**

A Deus,

pela vida, saúde e força para alcançar meus objetivos.

### **Ofereço**

Aos meus pais, irmãos e familiares, pelo carinho, amor e incentivo. À minha esposa, Priscilla, pelo amor, carinho, compreensão, companheirismo e apoio durante a minha caminhada e aos nossos filhos, João e Lucas, que me fazem o homem mais feliz do mundo todos os dias com lindos sorrisos e carinhos.

### **Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

À Fapemig pelo financiamento do projeto.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação e amizade.

Aos membros da banca: Prof. Mário Sobral de Abreu, Profa. Janice Guedes de Carvalho, Dra. Sara Maria Chalfoun e Sônia Maria de Lima Salgado, pelas valiosas sugestões.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia que contribuíram muito para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia: Ana Maria, Ângela, Cleber, Edson, Heloísa, Maria Delurdes, Renata, Ruti e Tarley, que sempre auxiliaram nas atividades durante o doutorado.

Aos colegas do NEFIT.

Aos colegas de turma do doutorado, Ellen, Hermínio, Igor, Pedro e Silvia, pelos momentos de estudos, alegrias, estresses e descontração.

Aos colegas de laboratório, Carla Heloísa, Fabrício, Fernanda Lopes, Jadir, João de Cássia, Márcia, Moises, Pedro e Vanessa, pelo apoio.

Aos alunos bolsistas de iniciação científica: Jerônimo, Rodrigo, Ana Cristina, Lucas, Renato, Henrique e Flávio, pela ajuda na execução dos trabalhos.

Aos demais colegas do departamento de Fitopatologia, pela convivência e contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos Frederico, Paulo, Pedro, Ricardo, Lucas, Otávio, Clebes, Washington, pela amizade.

Aos meus sobrinhos e afilhados, pelos lindos sorrisos de alegria.

A Giovana por trazer ao mundo o meu amor, Priscilla e pela grande amizade e apoio.

A “Dindinha” Rosália, pela presença sempre contagiante, por boas conversas, pela ajuda incondicional, pelo carinho e afeto inesquecíveis.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Importância da cultura do café.....	4
2.2 Cercosporiose do cafeeiro.....	5
2.3 O fenômeno da indução de resistência.....	7
2.4 Extratos vegetais na indução de resistência em plantas.....	8
2.5 Cobre e manganês.....	10
2.5.1 Cobre (Cu).....	10
2.5.2 Manganês (Mn).....	11
2.6 Relação entre a nutrição mineral e as doenças do cafeeiro.....	12
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
ARTIGO 1 .....	19
Formulações à base de extratos vegetais e acibenzolar S- metil na proteção de cafeeiro contra <i>Cercospora coffeicola</i> .....	19
RESUMO.....	19
ABSTRACT .....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
Obtenção das formulações.....	24
Obtenção do fungo <i>C. coffeicola</i> e inoculação.....	24
Obtenção de mudas de cafeeiro.....	24
Instalação e condução de experimentos.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
Experimento 1: Efeito de formulações a base de extratos e ASM na proteção de cafeeiro contra <i>C. coffeicola</i> .....	27
Experimento 2: Efeito de formulações à base de extratos e ASM na proteção de cafeeiro contra <i>C. Coffeicola</i> , em duas épocas de aplicação.....	31



CONCLUSÃO .....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ARTIGO 2 .....	41
Formulações à base de extratos vegetais, cobre e manganês, na proteção de cafeeiro contra <i>Cercospora coffeicola</i> .....	41
Resumo .....	41
Abstract.....	42
Formulations based on vegetal extracts, copper and manganese, for the protection of coffee seedlings against <i>Cercospora coffeicola</i> .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS .....	45
Obtenção das formulações .....	45
Obtenção de mudas de cafeeiro .....	45
Instalação e condução de experimentos.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
Proteção de cafeeiro contra <i>C. coffeicola</i> por formulações à base de extratos e cobre .....	49
Experimento 1.....	49
Experimento 2.....	53
Proteção de cafeeiro contra <i>C. coffeicola</i> por formulações à base de extratos e manganês .....	56
Experimento 1.....	56
Experimento 2.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ARTIGO 3 .....	66
Estudo dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa ativada por formulações à base de folhas de cafeeiro contra <i>Cercospora coffeicola</i> em plantas de cafeeiro .....	66
Abstract.....	67

INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAL E MÉTODOS.....	70
Obtenção das formulações.....	70
Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa	70
Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e atividade de peroxidase de guaiacol, quitinase e $\beta$ -1,3-glucanase.....	71
Proteínas totais.....	71
Peroxidase de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7).....	71
Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14).....	72
$\beta$ -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6).....	72
Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais.....	73
Determinação de lignina solúvel.....	73
Determinação de fenóis solúveis totais.....	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
Peroxidase.....	75
Quitinase e $\beta$ 1, 3 glucanase.....	77
Lignina e fenóis totais.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91

## RESUMO

AMARAL, Daniel Rufino. **Formulações de extratos vegetais e micronutrientes na indução de resistência em mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola***. 2008. 92 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes formulações à base de extratos vegetais, em mistura e em combinação com os compostos ASM (acibenzolar-S-metil), sulfato de cobre, sulfato e cloreto de manganês, na severidade da cercosporiose e no enfolhamento de mudas de café. Avaliaram-se também os mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa contra *C. coffeicola*. Todos os tratamentos foram aplicados via foliar, sete dias antes da inoculação com *C. coffeicola*. Verificou-se que os tratamentos com pyraclostobin + epoxiconazole, ASM, EFID e EFID + ASM (no primeiro experimento), Viça Café<sup>®</sup> e o NEFID (2 aplicações) (no segundo experimento) fosfito de cobre, a mistura de EFID com cobre e EFID isoladamente (no terceiro e quarto experimentos); fosfito de cobre, a formulação EFID, a mistura de EFID com sulfato de manganês (0,29 g/L) e EFID com cloreto de manganês (0,435 g/L) (no quinto e sexto experimentos) proporcionaram maior proteção contra a doença e aumento no número de folhas quando comparados à testemunha inoculada. As atividades de peroxidase, quitinase e  $\beta$  1,3-glucanase foram maiores nas últimas coletas, a partir de 7 até 21 dias. A exceção foi para a enzima  $\beta$  1, 3-glucanase, que a atividade aumentou nas primeiras horas para os tratamentos com ASM e NEFID. Para o conteúdo de fenóis totais, observaram-se maiores atividades aos 11 dias de tratamento. A área abaixo da curva do conteúdo de fenóis totais foi significativamente maior para os tratamentos com EFID e NEFID em relação ao ASM e às testemunhas inoculada e absoluta.

---

<sup>1</sup>Comitê de Orientação: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador)

## ABSTRACT

AMARAL, Daniel Rufino. **Formulations of vegetal extracts and micronutrients for the induction of resistance of coffee seedlings against *Cercospora coffeicola***. 2008. 92 p. Thesis (Doctorate Program in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>.

The current work was aimed at evaluating the effect of different formulations based on plant extracts, in mixture or in combination with the compounds ASM (acibenzolar-S-methyl), copper sulfate, manganese sulfate or manganese chloride, in the severity of brown eye spot and on the number of leaves of coffee seedlings. Biochemical mechanisms involved in the defense response against *C. coffeicola* were also evaluated. All the treatments were applied by foliar spraying, seven days before inoculation with *C. Coffeicola*. It was verified that the treatments with pyraclostobin + epoxiconazole, ASM, EFID and EFID+ASM (in the first experiment), Viça Café® and NEFID (two applications) (in the second experiment); copper phosphite, the mixture of EFID with copper and EFID separately (in the third and fourth experiments); copper phosphite, the formulation EFID, the mixture of EFID with manganese sulfate (0,29 g/L) and EFID with manganese chloride (0,435 g/L) (in the fifth and sixth experiments) had provided higher protection against the disease and increase at the numbers of leaves when compared to the inoculated control. The activities of peroxidase, quitinase and beta-1,3-glucanase were higher for samples collected later in time, from 7 to 21 days after spraying. The exception was for  $\beta$  1, 3-glucanase, which activity increased in the first hours, for the treatments with ASM and NEFID. The highest content of total phenolics was detected 11 days after spraying. The area under total phenolic content curve was significantly higher for treatments with EFID and NEFID in relation to ASM and controls.

---

<sup>1</sup>**Guidance Committee:** Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Major Professor).

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é uma das importantes fontes de divisas para o Brasil, que é o principal produtor e exportador mundial. Na safra de 2006/2007, a produção nacional foi de 42,5 milhões de sacas (60 kg), correspondendo a 34,04% da produção mundial. Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional, com 21,9 milhões de sacas; as regiões Sul e Centro-Oeste mineiras contribuem com mais da metade desta produção, com 12,04 milhões de sacas, numa área estimada em 507 mil hectares (Companhia Nacional de Abastecimento, Conab, 2007).

Apesar da representatividade na cafeicultura mundial e do grande potencial produtivo, alguns fatores contribuem para as perdas na produção. Entre os principais problemas da cafeicultura e fontes de perdas na produção estão as doenças foliares do cafeeiro, causadas por *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*.

A cercosporiose, conhecida também por mancha-de-olho-pardo ou olho-de-pomba, causada por *C. coffeicola*, é uma das doenças mais antigas do cafeeiro, tanto na América do Sul como na América Central e encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras. Nas regiões altas do estado do Espírito Santo e em Minas Gerais, a partir de 1971, ocorreram ataques intensos dessa doença no campo, com perdas na produção de 30% (Carvalho & Chalfoun, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos cerrados ou em áreas de baixa fertilidade natural, pois existe grande relação entre a incidência de cercospora e a nutrição mineral das plantas (Pozza et al., 2000; Talamini et al., 2001).

O controle químico por meio de fungicidas ainda é uma das alternativas mais utilizadas no controle desta doença. Entretanto, representa alto custo para o produtor, além de causar grandes impactos ao homem e ao meio ambiente.

Todavia, a agricultura atual busca um modelo de sustentabilidade no qual se deve usar o mínimo de pesticidas possíveis para combater pragas e doenças. Para estar de acordo com esta tendência, é preciso encontrar medidas alternativas de manejo fitossanitário, compatíveis com a qualidade ambiental visada no manejo sustentável. Dentre as opções de manejo, incluindo tecnologias limpas, cita-se o uso de extratos vegetais possuidores de substâncias bioativas, capazes de atuar como indutores de resistência às doenças em plantas.

Os indutores de resistência em plantas não atuam do mesmo modo que fungicidas, nematicidas e inseticidas, matando o organismo alvo do pesticida em questão, e, sim, ativam os mecanismos de defesa latentes nas plantas. As plantas não possuem sistema imunológico evoluído, como nos mamíferos, mas podem também reconhecer estímulos e responder aos mesmos, defendendo-se de estresses bióticos ou abióticos. A resistência induzida (RI) pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada e ou subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios.

Avanços na pesquisa envolvendo RI em plantas são acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficiência, estabilidade e menor impacto ao ambiente. Eles são capazes de propiciar melhora na produtividade agrícola, devido à redução de perdas ocasionadas por patógenos e, em alguns casos, até mesmo devido a incrementos no desenvolvimento vegetativo.

Dessa maneira, é notória a importância do estado nutricional das plantas em relação à redução da severidade de doenças. Os nutrientes minerais influenciam, de uma maneira ou de outra, na resistência a doenças, trabalhando como co-fatores de enzimas que participam de diversas rotas metabólicas de defesa das plantas. Muitos compostos produzidos nessas rotas metabólicas são formados após a infecção, proporcionando maior resistência às doenças.

Dessa forma, objetivou-se, com a realização do presente trabalho, verificar o efeito de formulações à base de extratos vegetais no desenvolvimento (enfolhamento e altura) e na proteção de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*, bem como caracterizar as reações bioquímicas, desenvolvidas em função do estímulo de indução no patossistema estudado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância da cultura do café

O café é uma das importantes fontes de divisas para o país, sendo o Brasil o principal produtor e exportador mundial, com estimativa de safra, para 2007/2008, de 33,7 milhões de sacas de café beneficiado. Desse total, aproximadamente 70% (23,5 milhões de sacas) são de arábica e 30% (10,3 milhões de sacas) são de robusta. Comparada à safra anterior (42,5 milhões de sacas de café beneficiado), verifica-se redução de 20,6% (8,8 milhões de sacas) devido, principalmente, à biennialidade negativa da cultura e às condições climáticas adversas, como a estiagem ocorrida entre março e setembro, que afetou a floração das lavouras e, também, o excesso de chuvas nos meses de dezembro 2006 e janeiro de 2007. Esse fator favoreceu o aparecimento de pragas e doenças, prejudicando o controle das mesmas e afetando, assim, a qualidade do café produzido e afetando, indiretamente, as exportações deste produto (Conab 2007).

O Brasil, atualmente, é o segundo maior consumidor de café do mundo. No passado, consumia cerca de 6,4 milhões de sacas de café e passou a consumir cerca de 13 milhões de sacas, em 2002.

A procura pela qualidade do café no mercado internacional exigiu do Brasil uma modernização na produção de café, tanto pelo uso de melhores variedades, como pelo controle fitossanitário do produto para a exportação. Hoje, os cafés brasileiros são altamente competitivos e o país está passando de produtor de quantidade para produtor de quantidade e qualidade. A produtividade média aumentou de cerca de 10 a 12 sacas para 16 a 18 sacas, com um dos custos de produção mais baixos do mundo para o café arábica.

A maior parte do café produzido mundialmente é proveniente de áreas cultivadas com *C. arabica*, o qual ocupa em torno de 70% das áreas cultivadas



(Agrianual, 2007). Atualmente, o café ocupa área cultivada com cerca de 11.168.000 hectares no mundo. O Brasil contribui com uma área de dois milhões de hectares, sendo o país com maior área cultivada (Conab, 2007).

A produção de café, principalmente *C. arabica*, é essencial para cerca de 50 países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. A cafeicultura representa contribuição importante para o PIB desses países, porém, a distribuição das riquezas geradas pelo mercado do café entre os países produtores e consumidores é muito desequilibrada. Em 2001, o mercado do café gerou cerca de 70 bilhões de dólares, contudo, em função desses desequilíbrios, 92% foi retido por países consumidores e apenas 8% ficaram com os países produtores.

Além dos problemas de mercado, a produção nos países produtores encontra, como um dos principais obstáculos, a ocorrência de uma série de doenças causadas por patógenos. Entre essas doenças, podem-se citar a ferrugem-do café, causada por *Hemileia vastatrix* Berk & Br.; a antracnose-dos-frutos (CBD), causada por *Colletotrichum kahawae*; a mancha-aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *Garceae*; a cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cook e as manchas foliares, causadas por *Phoma* spp. e *Ascochyta coffeae*.

No Brasil, a ferrugem e a cercosporiose estão entre os principais causadores de perdas na produtividade. Estima-se que as perdas relacionadas apenas ao ataque por *C. coffeicola* sejam da ordem de 30% a 40% da produção quando na ausência de medidas de controle dessa doença (Zambolim et al., 1985; Matiello, 1991).

## **2.2 Cercosporiose do cafeeiro**

A cercosporiose, conhecida por mancha-de-olho-pardo ou olho-de-pomba, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, é uma das doenças mais antigas do cafeeiro, tanto na América do Sul como América Central e

encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras. A cercosporiose se manifesta por manchas circulares de coloração castanho-clara a escura, com centro branco-acinzentado, quase sempre envolvidas por halo amarelo, dando à lesão aspecto de olho. Vêm daí os nomes vulgares mancha-de-olho-pardo e olho-de-pomba. No centro cinza das lesões, notam-se pontuações escuras que constituem as frutificações do fungo (esporodóquios). Podem ocorrer variações nos sintomas descritos, pela ausência do halo amarelado e, assim, a doença é denominada, em algumas regiões, como "cercospora-negra". Os frutos também podem ser infectados por cercospora e, neles, as lesões são mais frequentes quando estão próximos da maturação.

A infecção nos frutos inicia-se, mais ou menos, quatro meses após a floração, causando lesões deprimidas de coloração castanho-clara, dispostas no sentido do pedúnculo-coroa do fruto. As manchas mais velhas são escuras e com aspecto ressecado, onde a polpa correspondente ao local da lesão fica aderente ao pergaminho. Os frutos, quando atacados no estágio verde e verde cana, amadurecem precocemente devido ao avermelhamento a partir da lesão (Chalfoun, 1997; Zambolim et al., 1997).

Nas regiões altas do estado do Espírito Santo e em Minas Gerais, a partir de 1971, ocorreram ataques intensos da doença no campo, chegando a causar perdas, na produção, de 30% (Carvalho & Chalfoun, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos cerrados ou em áreas de baixa fertilidade natural, pois existe grande relação entre a incidência de cercospora e a nutrição mineral das plantas (Pozza et. al., 2000; Talamini et al., 2001).

O que torna esta doença ainda mais importante é o fato de ela se constituir um problema desde as mudas no viveiro até os plantios novos no campo (Chalfoun, 1997; Zambolim et al., 1997). Nos viveiros, a doença provoca desfolha, afetando o crescimento das mudas, tornando-as raquíticas e

inadequadas para o plantio. Em plantios novos, é comum ocorrerem intensos ataques com desfolha acentuada, com prejuízos ao crescimento das mudas, principalmente em lavouras implantadas em terrenos de baixa fertilidade e ou com adubações desequilibradas. Além disso, podem ocorrer ataques severos da doença, provocando queda de folhas e frutos após as primeiras produções.

Em lavouras adultas, além da queda de folhas, a doença provoca a queda prematura e o chochamento dos frutos atacados, podendo funcionar também como porta de entrada para outros fungos que interferem na qualidade do café. Isso implica na redução da produção, do rendimento e na depreciação do tipo e da bebida do café (Chalfoun, 1997).

A cercosporiose se desenvolve em condições de umidade relativa alta, temperatura amena e excesso de insolação ou alta luminosidade. Em lavouras adultas, além das condições climáticas já citadas, também solos argilosos, arenosos ou compactados, sistema radicular deficiente e pião torto são fatores que favorecem o progresso da doença (Chalfoun, 1997; Zambolim et al., 1997).

### **2.3 O fenômeno da indução de resistência**

A indução de resistência é definida como o aumento da capacidade de defesa da planta contra amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactérias e vírus (Loon, 1998). A resistência resultante é proporcionada por agente indutor (biótico ou abiótico) que aciona mecanismos de defesa na planta, os quais se encontram na forma latente (Hammerschmidt & Kúc, 1982). Esta ativação pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos, ou seja, formas avirulentas de patógenos, extratos vegetais, extratos de fungos (Stangarlin & Pascholati, 1997; Stadnik, 1999) ou por ativadores químicos, como o ácido aminobutírico (Cohen, 1996), o ácido 2,6-dicloroisonicotínico e o acibenzolar-S-metil (Ciba, 1995).

A resistência induzida (RI) ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas e ou estruturais, aumentando a resistência geral da planta (Oliveira et al., 1997). A proteção obtida contra determinado patógeno pode ser local ou sistêmica, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador) (Pascholati & Leite, 1995). A sua duração pode ser de poucos dias a algumas semanas ou, mesmo, durar todo o ciclo de vida da planta (Pascholati & Leite, 1995), passando a funcionar como mecanismo de defesa constitutivo da mesma.

Alguns autores dividem a RI em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (RSA) (Sticher et al., 1997) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (Loon et al., 1998). Na primeira, a resistência se desenvolve sistêmica ou localizadamente em resposta a um patógeno que causa lesão necrótica (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o éster S-metil do ácido benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotióico (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). Nesta, a resistência expressada, geralmente, é efetiva contra amplo espectro de patógenos e está associada com a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs). Muitas delas possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (Hammerschmidt & Smith-Becker, 1999). Já na RSI, o processo de sinalização, geralmente induzida por rizobactérias, é mediado pelo ácido jasmônico e etileno (Loon et al., 1998).

#### **2.4 Extratos vegetais na indução de resistência em plantas**

Uma forma de controle de doenças do cafeeiro, que desperta o interesse dos especialistas, é baseada na utilização de produtos naturais, com extratos de plantas ou subprodutos da cadeia produtiva do café, como extratos de folhas ou de casca de frutos de café. A utilização de extratos de casca de café e de folhas de café infectadas com *H. vastatrix* proporcionou certa proteção de mudas de

café contra os patógenos *Phoma costarricensis* e *Cercospora coffeicola* (Resende et al. 2004; Amaral, 2005; Barguil et al., 2005). Foi observada redução na percentagem da mancha-de-phoma, de 20% e 38%, para extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem, respectivamente (Resende et al., 2004; Barguil et. al, 2005). Para cercosporiose, observou-se diminuição na percentagem da doença em 40% e 37%, em plantas tratadas com extrato de casca de café e extrato de folhas de café com ferrugem, respectivamente (Amaral, 2005). Santos (2006) observou, em testes de campo, que o tratamento com extrato de folhas de café reduziu a área abaixo da curva de progresso da mancha-de-phoma em 61%, comparada à testemunha pulverizada com água e em 30% em relação à testemunha pulverizada com Viça-Café plus®.

Em condição semelhante à da agricultura orgânica, Santos et al. (2007) observaram menor desfolha dos cafeeiros pulverizados com os extratos à base de casca de frutos e folhas de café. Assim, onde não existe controle efetivo das doenças foliares por defensivos agrícolas, o uso de produtos capazes de reduzir a intensidade das doenças, em qualquer percentual, deve ser visto com interesse. Muitos compostos induzem resistência a patógenos em experimentos conduzidos em condições controladas, porém, comparativamente, poucos são rotineiramente testados em campo. No campo, esses produtos naturais oferecem oportunidade de reduzir o impacto da aplicação de fungicidas convencionais. Por se tratarem de tecnologias mais limpas, a partir de matéria-prima reciclável, existe a possibilidade de substituir paulatinamente a aplicação de fungicidas pelo uso dessas formulações, seja isoladamente ou combinadas/alternadas entre si.

Resende et al. (2006; 2007) solicitaram, recentemente, depósito de patente para formulação à base de extratos de folhas de café (*Coffea* spp.) (INPI, Protocolo número 0000220604167501, Formulação para Indução de Resistência... 2 de agosto de 2006) e para formulação à base de cascas de frutos de café (INPI, Protocolo número 0000220701755455, Composição para Indução

de Resistência... 2007). Tais formulações, cuja principal matéria-prima reciclável é formada por folhas que caem ao solo (devido a doenças, à colheita de frutos e a outros estresses) e o subproduto do beneficiamento dos grãos (endocarpo, mesocarpo e exocarpo), podem ser usadas com ou sem espalhantes adesivos ou outros adjuvantes, para o controle de doenças no cafeeiro, cacauzeiro, algodoeiro e tomateiro.

Em análises químicas realizadas em laboratórios da Universidade Federal de Lavras, observou-se que, no extrato de folhas de cafeeiro infectadas com ferrugem (EFID), a pectina total variou de 84,628 a 114,553 mg/100g; a pectina solúvel, de 37,248 a 61,092 mg/100g; os açúcares totais, de 0,126% a 0,629%; a glicose variou de 0,084% a 0,247%; a sacarose, de 0,042% a 0,362%; os carotenóides totais, de 0,038% a 0,057%; os compostos fenólicos totais, de 286,688 a 769,725 mg/100g e o pH do EFID variou de 4,88 a 6,27. Os teores de cafeína, teobromina e ácido clorogênico, importantes compostos do café no contexto de defesa, ainda estão em fase de quantificação (Resende et al., 2006). No extrato obtido a partir de casca de frutos de café (média de três repetições) detectaram-se: pectina total: 171,504 mg/100g; pectina solúvel: 160,338 mg/100g; açúcares totais: 0,517%, açúcares redutores: 0,466%; sacarose: 0,048%; carotenóides totais: 0,004%; compostos fenólicos totais: 145,273 mg/100g e pH: 4,88.

## **2.5 Cobre e manganês**

### **2.5.1 Cobre (Cu)**

O Cu está envolvido nos processos de fotossíntese, respiração, regulação hormonal e fixação do nitrogênio, de forma indireta e no metabolismo de compostos secundários. A deficiência de Cu causa alterações morfológicas ou bioquímicas que favorecem a infecção de patógenos (Malavolta et al., 1997). Sob deficiência deste micronutriente, existe menor lignificação dos tecidos. Essa

alteração da redução da lignificação da parede celular é a alteração anatômica mais típica da deficiência de Cu em plantas superiores, com deformações de folhas novas e aumento da susceptibilidade de cereais a patógenos, particularmente em combinação com altos suprimentos de nitrogênio.

Além da redução da lignina, a deficiência do Cu pode, ainda, causar, por questão nutricional, perda do seu efeito direto como fungicida. O nutriente pode, ainda, atuar como co-fator na síntese de enzimas, inclusive aquelas ligadas à patogênese mais uma evidência da atuação destas substâncias no processo de defesa das plantas. O Cu está também envolvido na enzima Cu-Zn superóxido dismutase (CuZnSOD), que está diretamente envolvida no mecanismo de detoxificação do superóxido gerado na fotossíntese. Esta enzima está localizada, além dos cloroplastos, na mitocôndria e nos glioxissomos. Neste último, a CuZnSOD possui função de controle da peroxidação dos lipídios na membrana e, portanto, na senescência. Outras enzimas importantes de que o Cu faz parte é a ascorbato oxidase, a lacase (responsável pela síntese de plastoquinonas) e a fenolase (responsável pela síntese de lignina, alcalóides e outras) (Marschner, 1995).

### **2.5.2 Manganês (Mn)**

O Mn está envolvido em diversos processos fisiológicos, como absorção iônica, fotossíntese, redução do nitrogênio, respiração, regulação hormonal, síntese de proteínas e proteção contra a entrada de patógenos. Além disso, este micronutriente atua na ativação das enzimas ATPase, sintetase de glutatone e ativação de metionina, entre outras.

Assim, como pôde ser observado para o Cu, a deficiência de Mn reduz a respiração, a atividade fotossintética, a inibição da síntese de lipídeos e ou de metabólitos secundários, como ácido giberélico e isoprenoides, diminuindo a defesa contra a entrada de patógenos (Malavolta et al., 1997). Sob deficiência de

Mn, as plantas de cafeeiro apresentam sintomas de clorose de folhas novas (reticulado grosso), manchas pequenas e necróticas e, geralmente, a formação de folhas anormais.

Por outro lado, a presença de Mn inibe a aminopeptidase (enzima que hidrolisa proteínas, produzindo aminoácidos essenciais ao desenvolvimento de fungos) e metilesterase da pectina (exoenzima de fungos que degrada a parede celular do hospedeiro) (Marschner, 1995).

Na proteção contra a entrada de patógenos, o Mn atua, principalmente, na síntese de lignina (barreira física a entrada de patógenos) e de compostos fenólicos (substâncias tóxicas aos patógenos).

Estes compostos fenólicos possuem papel fundamental no início dos estágios de infecção, tanto como fitoalexinas como precursores da síntese de lignina e suberina. Muitos nutrientes minerais, sobretudo o Cu e Mn, participam da biossíntese de vários fenóis e o estado nutricional influencia essas respostas de defesa (Marschner, 1995).

## **2.6 Relação entre a nutrição mineral e as doenças do cafeeiro**

Os efeitos da nutrição mineral no crescimento e produção das plantas são usualmente explicados em termos de funções dos nutrientes no metabolismo vegetal. Entretanto, os nutrientes minerais podem aumentar ou diminuir a resistência ou a tolerância de plantas a patógenos. As principais mudanças proporcionadas pela nutrição mineral, responsáveis por alterar a intensidade de doenças, são a espessura da parede celular e cutículas, a manutenção de compostos solúveis dentro das células, como açúcares simples e aminoácidos, variações na suberização, na silificação e na lignificação dos tecidos, na síntese e no acúmulo de compostos fenólicos. No caso de doenças fúngicas, principalmente as manchas foliares, como a ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) e a mancha-de-olho-pardo (*Cercospora coffeicola* Berk &



Cook.), a proteção promovida pela nutrição mineral equilibrada teria como consequência uma eficiente barreira física, com inibição a penetração das hifas ou melhor controle da permeabilidade da membrana citoplasmática. Isso evita a saída de açúcares e aminoácidos para os espaços intercelulares e constitui barreira química, com a produção ou a formação de compostos fenólicos com propriedades fungistáticas (Marschner, 1995).

Todos os nutrientes minerais influenciam, de uma maneira ou de outra, a incidência ou a severidade da doença (Graham & Webb, 1991; Huber, 1980). Muitos compostos produzidos por meio de rotas metabólicas secundárias são formados após a ocorrência da infecção, proporcionando maior resistência às doenças. Esses compostos são as fitoalexinas, os fenóis, os flavonóides e as auxinas, os quais se acumulam ao redor dos sítios de infecção, dependendo da disponibilidade dos vários nutrientes. Dessa forma, os mecanismos de defesa das plantas são regulados por vários nutrientes, conforme descrito por Graham & Webb (1991).

No intuito de complementar os métodos de controle de doenças, a nutrição mineral de plantas, como importante fator ambiental, pode ser considerada um método relativamente fácil, quando bem manipulado (Marschner, 1995). Miguel & Paiva (1977) relataram que a adição de uréia, zinco e boro em fungicidas cúpricos, aplicados em cafeeiros em produção na Costa Rica, a partir do início da época chuvosa, em intervalos de 30 dias, reduziu consideravelmente a incidência da mancha-de-olho-pardo. Os efeitos do cobre e do manganês sobre a evolução da infecção em folhas de cafeeiros inoculados com *H. vastatrix*, em ambiente controlado, foram estudados quando se aplicaram previamente doses variadas destes nutrientes através do pecíolo. Nessas condições, segundo Becker-Raterink et al. (1991), os íons fornecidos influenciaram de maneira não linear a evolução da infecção e a taxa de germinação dos esporos. Os resultados desses estudos permitem supor que os

efeitos não foram diretos sobre a ferrugem, mas sim indiretos sobre o hospedeiro, por meio da ativação de enzimas.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário da agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004. 496p.

AMARAL, D.R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais.** 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BARGUIL, B.M.; RESENDE, M.L.V.; RESENDE, R.S.; BESERRA Jr., J.E.A.; SALGADO, S.L. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.5, p.535- 537, 2005.

BECKER-RATERINK, S.; MORAES, W.B.C.; QUIJANO-RICO, M. **La roya del cafeto:** conocimiento y control. Schborn: GTZ, 1991. 281 p.

CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S. M. **Cercospora:** doença do cafeeiro também chamada de "olho pardo" ou "olho de pomba. Lavras, MG: UFLA, 2001. (Informe Tecnológico, 026).

CHALFOUN, S.M. **Doenças do cafeeiro:** importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93p.

CIBA Technical Data Sheet. CGA 245704. **A plant activator for disease protection.** Basel, 1995. 9 p.

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E.; SISLER, H. D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds.** Andover: Intercept, 1996. p. 461-466.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2007/2008.** Brasília, 2007.

GRAHAM, R.D.; WEBB, M.J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J.J.; COX, F.R.; SHUMAN, L.M.; WELCH, R.M. (Ed.). **Micronutrients in agriculture.** 2.ed. Madison: Soil Science Society of America, 1991. p.329-370.

HAMMERSCHMIDT, D.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 61-71, 1982.

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J. A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A. A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture**. Saint Paul: APS, 1999. p.37-53.

HUBER, D.M. The role of mineral nutrition in defense. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. **Plant pathology**, an advanced treatise. New York: Academic, 1980. p.381-406.

LOON, L.C. van; BAKKER, P.; AH. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p. 453-483, 1998.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic, 1995. 889p.

MATIELLO, J.B. **O café: do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, 1991. cap. 24, p.345-363. (Coleção do Agricultor – Grãos).

MIGUEL, A.E.; PAIVA, J.E.P. **Relatório de viagem de cooperação técnica a El Salvador, Costa Rica e Colômbia**. Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1977. 45p.

OLIVEIRA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.195-197, jun. 1997.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap. 22, p.417-454.

POZZA, A.A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; POZZA, E.A.; CAIXETA, S.L.; ZAMBOLIM, L. Intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro em função de doses de N e K em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.29-33, jan./mar. 2000.

RESENDE, M.L.V.; BARGUIL, B.M.; RESENDE, R.S.; BEZERRA JÚNIOR, J.E.A.; SALGADO, S.M.L. Induction of resistance against *phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 2004, Helsingor. **Proceeding...** Helsingor, Dinamarca, 2004. p. 79.

RESENDE, M.L.V.; CAVALCANTI, F.R.; SANTOS, F.S.; AMARAL, D.R.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro**. Pedido de patente INPI protocolo 0000220604167501). 2006.

RESENDE, M.L.V.; ISHIDA, A.K.N.; SANTOS, F.S.; AMARAL, D.R.; COSTA, J.C.B. **Composição para indução de resistência em plantas, a base de extratos de casca de frutos de café**. Pedido de patente INPI protocolo 0000220701755455. 2007.

SANTOS, F. da S.; SOUZA, P.E.; RESENDE, M.L.V.; POZZA, E.A.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; MIRANDA, J.C.; MANERBA, F.C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.59-63, 2007.

SANTOS, F.S. **Estudo e manejo de doenças de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) sob cultivo orgânico**. 2006. 187p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STADNIK, M.J. **Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*): practical aspects and mechanisms of action**. 1999. (PhD Thesis) - University of Hohenheim, Stuttgart.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticaba, v. 23, p. 346, 1997. Suplemento.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

TALAMINI, V.; SOUZA, P.E.; POZZA, E.A.; SILVA, A.M.; BUENO FILHO, J.S.S. Progresso da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro (*coffea arabica* l.) em diferentes lâminas de irrigação e diferentes parcelamentos de adubação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.55-62, 2001.

ZAMBOLIM, L.; MARTINS, M.C. Del P.; CHAVES, G.M. Café. **Informe Agropecuário**, v.131, p.64-75, 1985.

ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO do VALE, F.X.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: RIBEIRO do VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. v.2, p.83-179.

## ARTIGO 1

### **Formulações à base de extratos vegetais e acibenzolar S- metil na proteção de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola***

(Preparado de acordo com as normas da revista “Fitopatologia Brasileira” exceto as citações (NBR 10520) e as referências bibliográficas (NBR 6023)

**Daniel R. Amaral<sup>1,2\*</sup>, Mário Lúcio V. Resende<sup>2</sup>, Rodrigo E. O. Mac Leod, Pedro Martins R. Júnior<sup>2</sup> & Jadir B. Pinheiro**

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Fax (0xx35)38291283.

E-mail: mlucio@ufla.br

(Aceito para publicação em / / )

Autor para correspondência: Mário Lúcio Vilela de Resende

---

AMARAL, D.R.; RESENDE, M.L.V.; MAC LEOD, R.E.O; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; PINHEIRO, J.B.. Formulações a base de extratos vegetais e acibenzolar S- metil na proteção de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. Fitopatologia Brasileira.

#### **RESUMO**

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito de extratos vegetais e a mistura dos mesmos com o indutor de resistência comercial ASM na severidade da cercosporiose e no desenvolvimento de mudas de cafeeiro em dois experimentos. Os extratos, provenientes de folhas de café infectadas com ferrugem (EFID) e cascas de frutos de café (ECFC), obtidos de partículas mais grosseiras e extremamente finas (30 micras) - NEFID e NCFC foram utilizados isoladamente em uma ou duas aplicações (EFID) e misturados com ASM. Os extratos e suas misturas, além do indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM), a formulação fungicida pyraclostobin + epoxiconazole e o produto a base de cobre Viça Café<sup>®</sup> foram aplicados via foliar sete dias antes da inoculação de *Cercospora coffeicola* e realizou-se uma segunda pulverização 30 dias após a inoculação para os tratamentos com EFID. Observou-se no primeiro

experimento que os tratamentos com pyraclostobin + epoxiconazole, ASM, EFID e EFID + ASM proporcionaram maior proteção contra doença e maior desenvolvimento das mudas, quando comparados com a testemunha inoculada. No segundo experimento, os tratamentos que proporcionaram maior proteção contra cercosporiose foram Viça Café<sup>®</sup>, NEFID (2 aplicações) e a formulação EFID (2 aplicações). Na avaliação do desenvolvimento das mudas, observou-se que os mesmos tratamentos que proporcionaram os melhores resultados no controle da doença também proporcionaram aumento de folhas e maior altura das mudas.

**Palavras-chaves adicionais:** controle alternativo, produtos naturais, indutor de resistência, cercosporiose



## **ABSTRACT**

### **Formulations based on plant extracts and acibenzolar S – methyl for the protection of coffee seedlings against *Cercospora coffeicola***

The objectives of this work were to assess the effect of plant extracts and the mixture of these with the commercial inducer of resistance ASM, in the severity of brown eye spot and on the development of coffee seedlings in two experiments. The extracts from coffee leaves infected with *Hemileia vastatrix* (EFID) and husks of coffee berries (ECFC), and with smaller particles (30 micra) - NEFID and NCFC, were used separately in one or two applications (EFID) or even mixed with ASM. The extracts and their mixtures, ASM, pyraclostobin + epoxiconazole and the copper based-product Viça Café® were sprayed on coffee leaves seven days before the inoculation of *Cercospora coffeicola*. An EFID based treatment was also sprayed 30 days after inoculation. It was observed in the first experiment that the treatments pyraclostobin + epoxiconazole, ASM, EFID and EFID + ASM provided higher protection against the disease and increased seedling development, compared to the control. In the second experiment, Viça Café®, NEFID (two applications) and the formulation EFID with two applications provided better disease control and increased height and number of leaves, compared to the control.

**Additional Keywords:** alternative control, natural products, resistance inducer, brown eye spot.

## INTRODUÇÃO

A cercosporiose, ou mancha-de-olho-pardo, causada por *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, é uma das principais doenças da fase de viveiro da cultura do café (*Coffea arabica* L.). As plantas doentes apresentam desfolha, redução no desenvolvimento e raquitismo, tornando-se impróprias ao plantio (Carvalho & Chalfoun, 2008). O principal método de controle da cercosporiose é o químico, no entanto, o uso indiscriminado de fungicidas causa danos ao meio ambiente, aos seres vivos e favorece a seleção de raças resistentes de patógenos. Uma alternativa no manejo de doenças é a utilização da indução de resistência (Bettiol, 1991).

A resistência induzida se caracteriza pela ativação dos mecanismos latentes de resistência da planta (Hammerschmidt & Dann, 1997) e pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos, como microrganismos vivos ou inativados (Stangarlin & Pascholati, 1994) ou abióticos, como, por exemplo, pelo acibenzolar S-metil (ASM). A resposta de defesa das plantas pode estar relacionada com o acúmulo de fitoalexinas, lignina e de proteínas relacionadas à patogênese (Pascholati, 1998).

Os extratos vegetais são considerados eliciadores bióticos (Pascholati & Leite, 1995), cuja eficiência no controle de fitopatógenos é observada em diversos patossistemas (Bonaldo et al., 2004; Guzzo et al., 1987; Maxemiuc–Naccache & Dietrich, 1985). Extratos aquosos de folhas de café infectadas com *H. vastatrix* Berk. & Br. proporcionaram 28% de redução na severidade da mancha-foliar em cafeeiro, causada por *Phoma costaricensis* Echandi, quando comparados com a testemunha inoculada (Barguil et al., 2005). Resultados promissores também foram alcançados com o uso do indutor químico de resistência acibenzolar S-metil (ASM, produto do grupo benzotiadiazole ou BTH). A aplicação do produto proporcionou proteção contra *Hemileia vastatrix*,

em mudas de cafeeiro cv. Mundo Novo e cv. Catuaí Vermelho M-99 (Guzzo et al., 2001; Marchi et al., 2002). Esse efeito indutor do ASM contra a ferrugem do cafeeiro foi confirmado por Nojosa (2003), em que o tratamento com ASM proporcionou controles de 56,82% e 52%, em folhas destacadas e em mudas de café, respectivamente. Nas plantas tratadas com ASM, foi possível observar aumento considerável nos teores de lignina e na atividade de peroxidase. Segundo Martins et al.. (1998), em condições controladas, este produto induziu proteção contra *H. vastatrix* por até 10 semanas.

Considerando-se que o produto ASM e as formulações à base de extratos, como os de cascas de frutos de café e folhas de café infectadas com *H. vastatrix*, propiciaram resultados promissores na indução de resistência, objetivou-se, com este estudo, avaliar o efeito de formulações à base dos referidos extratos e o ASM (acibenzolar S-metil), bem como avaliar o efeito das formulações obtidas a partir de partículas extremamente finas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção das formulações**

Folhas de café cv. Mundo Novo, naturalmente infectadas por *H. vastatrix* e caídas no solo (EFID e NEFID) e cascas de frutos de café (CFC e NCFC) coletadas após o beneficiamento dos grãos foram processados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para a obtenção dos extratos vegetais. Tais extratos foram misturados entre si e com ASM, obtido junto à Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.

### **Obtenção do fungo *C. coffeicola* e inoculação**

O patógeno foi obtido de folhas naturalmente infectadas, coletadas em lavoura no campus da UFLA. As folhas foram lavadas superficialmente em água corrente e, em seguida, transferidas para câmara úmida, por três dias. Os conídios produzidos foram retirados da superfície foliar com pincel de ponta macia. A concentração da suspensão de conídios para as inoculações foi ajustada em câmara de Neubauer, para  $15.000 \text{ conídios.mL}^{-1}$ . A suspensão de conídios foi pulverizada sobre as folhas de mudas de cafeeiro nos diferentes tratamentos. Logo após a pulverização, as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas.

### **Obtenção de mudas de cafeeiro**

As mudas de cafeeiro, cultivar Mundo Novo, foram produzidas em substrato comercial Plantmax-café, suplementadas com aplicações de Iogen<sup>®</sup> (Fertilizantes Mitsui S.A., Poços de Caldas, MG) e adubadas com 0,5 g de fertilizante de liberação lenta por muda (formulação 4-14-8 de NPK). As mudas

foram mantidas em casa de vegetação, na UFLA, à temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade em torno de 60%, para a realização do experimento.

### Instalação e condução de experimentos

Durante o segundo semestre de 2006, foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, UFLA. Estes ensaios foram conduzidos em delineamento de blocos casualizados (DBC), com quatro repetições, sendo a parcela experimental constituída por 6 plantas. Utilizaram-se formulações de extratos com partículas mais grosseiras (EFID e CFC) e partículas extremamente finas - 30 micras (NEFID e NCFC) (Tabela 1).

**TABELA 1** Tratamentos com formulações à base de extratos e ASM avaliados nos experimentos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, UFLA, 2008.

<b>Experimento 1</b>	
Tratamentos	Dosagens
1) Testemunha inoculada	-
2) ASM	0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
3) EFID	10 g.L <sup>-1</sup>
4) CFC	100 g.L <sup>-1</sup>
5) EFID + CFC	100 g.L <sup>-1</sup> + 100 g.L <sup>-1</sup>
6) EFID + ASM	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
7) CFC + ASM;	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
8) pyraclostrobin + epoxiconazole	2,0 mL.L <sup>-1</sup>
<b>Experimento 2</b>	
Tratamentos	Dosagens
1) Testemunha inoculada	-
2) ASM	0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
3) Viça – Café	10 g.L <sup>-1</sup>
4) EFID	100 g.L <sup>-1</sup>
5) CFC	100 g.L <sup>-1</sup>
6) NEFID	25 g.L <sup>-11</sup>
7) NCFC	25 g.L <sup>-1</sup>
8) NEFID + NCFC	25 g.L <sup>-1</sup> + 25 g.L <sup>-10</sup> ,29 g.L <sup>-1</sup>
9) EFID + ASM	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
10) CFC + ASM	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
11) EFID*	100 g.L <sup>-1</sup>
12) NEFID*	25 g.L <sup>-11</sup>
13) NCFC*	25 g.L <sup>-1</sup>

\*2 aplicações: a primeira, 7 dias antes da inoculação e a segunda, 30 dias após a inoculação.

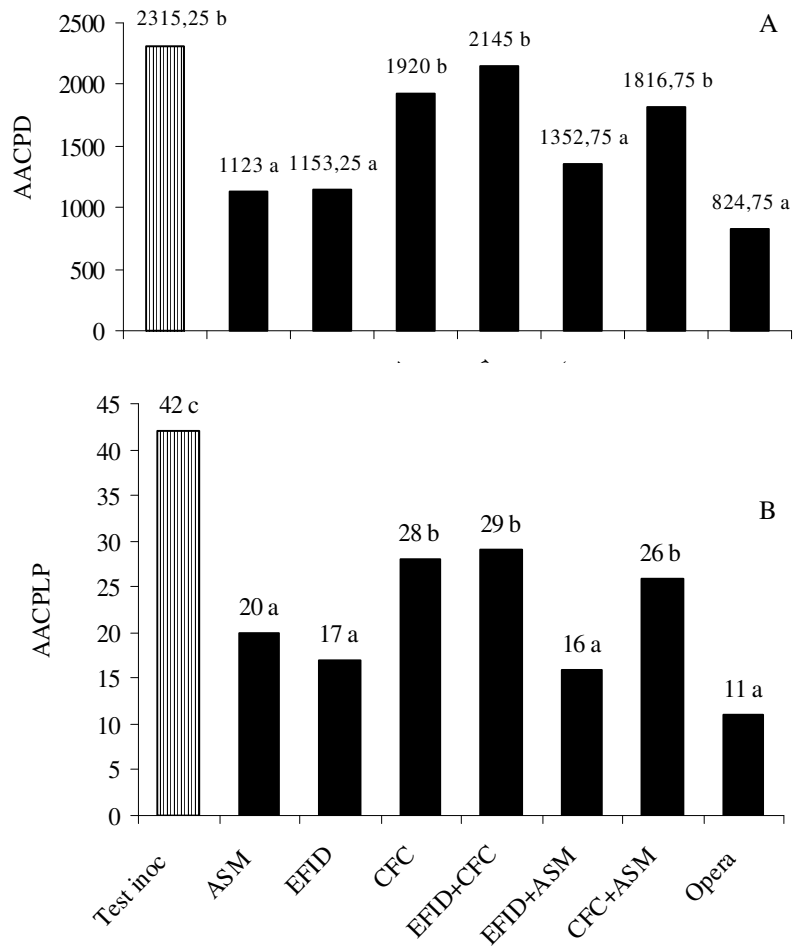
Nos dois experimentos foram utilizadas mudas de 1 ano (experimento 1) e de 6 meses (experimento 2) de idade. Os tratamentos foram pulverizados sete dias antes da inoculação, até o ponto de escorrimento e as mudas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura de 25°C, até o final do experimento. As avaliações da severidade, número de lesões da mancha-do-olho-pardo, enfolhamento e crescimento foram realizadas quinzenalmente, totalizando seis avaliações, seguindo escala proposta por Oliveira et al. (2001).

Após as avaliações, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença para cada tratamento, de acordo com Shaner & Finney (1977).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Experimento 1: Efeito de formulações a base de extratos e ASM na proteção de cafeeiro contra *C. coffeicola***

As formulações EFID e EFID+ASM apresentaram área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) estatisticamente semelhante ao produto indutor de resistência ASM e o fungicida Pyraclostrobina+Epoxiconazole, e menores que a testemunha inoculada e os demais tratamentos (Figura 1A). O produto pyraclostrobina + epoxiconazole proporcionou maior proteção do cafeeiro à *C. coffeicola*: 65% quando comparado à testemunha inoculada. Para os demais tratamentos com comportamento semelhante ao pyraclostrobina + epoxiconazole, observou-se proteção de 52% para o ASM, 51% para a formulação de EFID e 42% para a formulação de EFID+ASM. (Figura 1A).



**FIGURA 1** Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD)(A) e número de lesões (AACPLP)(B). Tratamentos com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).



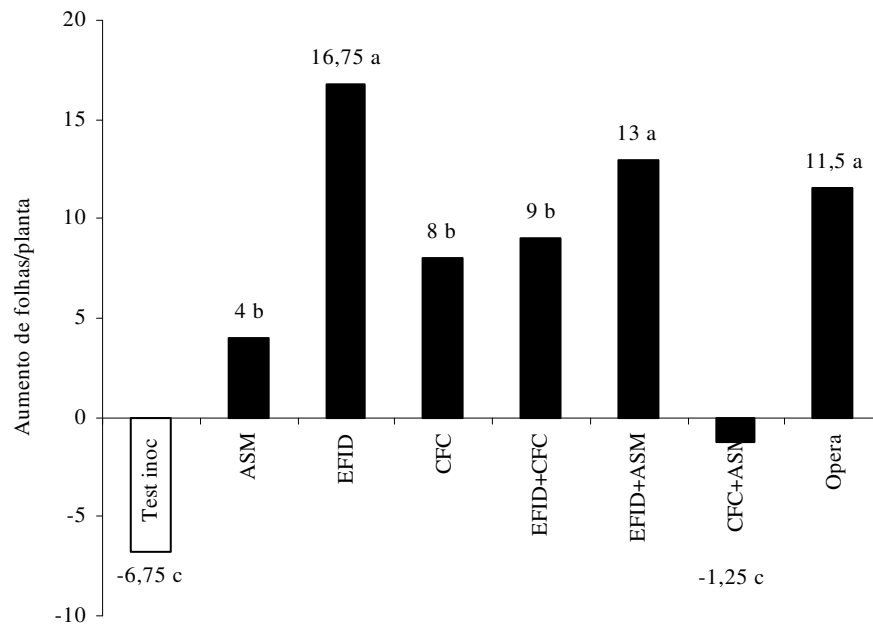
Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Maxemiuc–Naccache & Dietrich (1985), em que esporos de *H. vastatrix*, inativados por autoclavagem e preparados na forma de extratos aplicados sete dias antes da inoculação, foram capazes de induzir proteção contra *H. vastatrix*. Já Resende et al. (2004) observaram redução na severidade da mancha-de-phoma em plantas tratadas sete dias antes da inoculação com extrato aquoso de folhas de café infectadas com *H. vastatrix*. Segundo Guzzo et al. (1987), a parede fúngica é composta pela combinação de  $\beta$ -glucanas e quitinas, que poderiam ser moléculas eliciadoras da indução de respostas de defesa em plantas a patógenos. Estes mesmos compostos podem estar presentes nas formulações testadas, principalmente aquela obtida de folhas de café infectadas com ferrugem.

Para a área abaixo da curva de progresso de lesões por folha (AACPLP), observou-se que os tratamentos que proporcionaram menor AACPD também reduziram a AACPLP (Figura 1 B).

Pode-se observar que a formulação EFID+CFC apresentou baixa eficácia na proteção do cafeeiro, provavelmente devido à menor eficiência do extrato CFC.

Quando se observou o desenvolvimento das mudas de cafeeiro, constatou-se que alguns tratamentos, além de proporcionarem bons resultados no manejo da doença, proporcionam bom desenvolvimento das plantas, como é o caso da formulação com EFID (Figura 2). Observaram-se, em média, aproximadamente 5 folhas por planta a mais que o tratamento com o fungicida pyraclostrobina + Epoxiconazole e, aproximadamente, 12 folhas a mais que o tratamento com ASM. A formulação de EFID+ASM também proporcionou aumento médio no número de folhas, ao final do experimento. Isso, provavelmente, se deve à presença na formulação do extrato EFID, pois o ASM, aplicado isoladamente, apresentou ligeiro aumento no número de folhas. Para a testemunha inoculada com o patógeno, verificou-se efeito contrário àquele

obtido nos demais tratamentos. As plantas deste tratamento apresentaram redução, no número médio de folhas, inferior ao observado no início do experimento, provavelmente devido à característica do patógeno em causar desequilíbrio no hormônio etileno, um dos responsáveis pela senescência de folhas, ocasionando grande desfolha, sintoma típico da doença (Carvalho & Chalfoun, 2008).



**FIGURA 2** Aumento médio no número de folhas, em função dos tratamentos com formulações e produtos químicos, 110 dias após a aplicação dos tratamentos, ao final do experimento. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).

Santos et al. (2007) observaram que plantas de cafeeiro, sob o sistema de cultivo orgânico, tratadas com EFID, ECFC e VLA (extrato de lobeira com

sintomas de vassoura-de-bruxa) proporcionaram maior área foliar. Os autores observaram também que, nestes tratamentos, a desfolha ao longo das avaliações foi menor, comparada à dos demais. Cunha et al. (2004) observaram que, entre vários tratamentos químicos e aplicações diferenciadas para o controle da ferrugem em cafeeiro, o melhor tratamento foi epoxiconazole (0,6 l/ha)+oxicloreto de cobre (3 kg/ha), o último aplicado 60 dias após a aplicação do primeiro. Os autores observaram que este tratamento proporcionou menor AACPD e menor desfolha. Quando utilizado isoladamente, o Epoxiconazole apresentou AACPD 73% e desfolha 23% maiores, comparados aos da mistura de Epoxiconazole e oxicloreto de cobre.

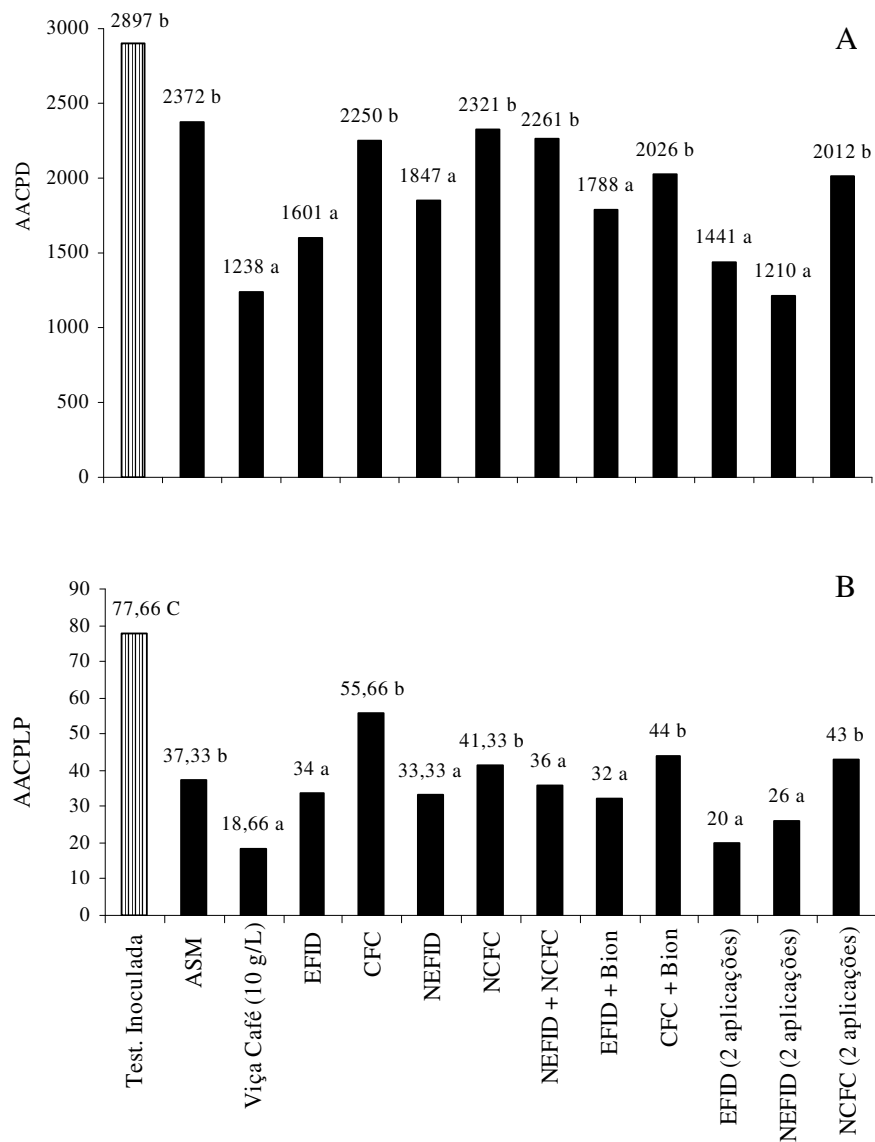
### **Experimento 2: Efeito de formulações à base de extratos e ASM na proteção de cafeeiro contra *C. Coffeicola*, em duas épocas de aplicação**

No segundo experimento, pode-se visualizar que os melhores resultados foram obtidos pela formulação NEFID e as formulações EFID e NEFID, em duas aplicações. Estes tratamentos foram estatisticamente semelhantes entre si e também ao produto padrão utilizado, o Viça Café (Figura 3A). A menor AACPD observada foi proporcionada pelo tratamento com NEFID (2 aplicações), com 59% de controle, quando comparado à testemunha inoculada. Em relação ao produto Viça Café, a diferença foi de 3% no controle. A formulação aplicada uma vez proporcionou 37% de controle, em comparação ao observado com a testemunha inoculada. Vários trabalhos relatam a maior eficiência no controle de doenças, em função do maior número de aplicações de produtos para o controle de doenças de plantas (Martin & Johnston, 1982; Wong et al.; 1992; Panisson et al., 2002). Santos et al. (2007) observaram redução na severidade da ferrugem de 61% em relação à testemunha, após cinco pulverizações de EFID em campo.

Observou-se que o tratamento com ASM apresentou desempenho inferior àquele observado no experimento 1, com 19% de proteção em relação à testemunha inoculada. Para alguns autores, as dosagens de ASM e o número de aplicações ainda precisam ser estudados, visando melhores resultados no controle de doenças e no desenvolvimento das culturas (Kuhn, 2007).

Para o número de lesões, o resultado foi semelhante ao observado para a severidade (Figura 1B). Os tratamentos com as formulações EFID e NEFID em duas aplicações, juntamente com Viça Café, demonstraram maior eficácia no controle da cercosporiose.

Resende et al. (2004) observaram que o extrato EFID também influenciou no tamanho das lesões observadas em folhas destacadas de café inoculadas com *P. costarricensis*. Os autores observaram que este extrato proporcionou área abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL) inferior àquela apresentada pela testemunha inoculada. Em experimento com tomate e *Xantomonas vesicatoria*, Pereira et al. (2004) e Cavalcanti et al. (2004) constataram menor valor de AACPL (área abaixo da curva de progresso da lesão) causada por *X. vesicatoria*, para plantas tratadas com extrato de vassoura-de-lobeira.



**FIGURA 3** Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) (A) e número de lesões (AACPLP)(B). Tratamentos com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).

Observou-se que o desenvolvimento das mudas de cafeeiro, em função dos tratamentos, apresentou semelhanças nos dois experimentos realizados. Os tratamentos, além de maior eficácia no controle da doença, também favoreceram o aumento no número de folhas e o maior crescimento das plantas (Tabela 2). Neste experimento, os níveis observados foram diferentes, provavelmente, em função da idade das plantas. No experimento 1, utilizaram-se plantas mais velhas (1 ano e meio de idade) e, no experimento 2, plantas mais novas (6 meses de idade). Portanto, para o aumento no número de folhas, pode-se observar incremento para a maioria dos tratamentos, entre os quais podemos observar aqueles com Viça Café e as formulações com EFID+ASM e NEFID – 2 aplicações (Tabela 2).

Vários autores trabalham com a hipótese de que os indutores de resistência influenciam no desenvolvimento das culturas em função de doses e número de aplicações (Godard et al., 1999; Louws et al.; 2001, Redman et al., 2001). Como exemplo, no trabalho de Iriti & Faoro (2003), no qual conduziram experimentos com ASM em única dose, em casa de vegetação e telado, os autores observaram que não houve diferenças no desenvolvimento da cultura nestes ambientes. No entanto, em campo, houve sensível diferença, principalmente devido à redução no número de vagens e no peso das sementes.

**TABELA 2** Efeito da aplicação de formulações no aumento médio do número de folhas e no aumento da altura.

Tratamentos	Aumento de <b>folhas</b> /planta	Altura final – altura inicial
Test. inoculada	0,17 b*	8,72 b
ASM	1,17 b	6,49 b
Viça Café (10 g/L)	4,50 a	11,14 a
EFID	3,17a	10,53 a
CFC	2,28 a	7,58 b
NEFID	1,50 b	7,41 b
NCFC	0,11 b	5,57 b
NEFID + NCFC	2,72 a	9,72 a
EFID + ASM	4,11 a	11,61 a
CFC + ASM	3,00 a	10,5 a
EFID (2 aplicações)	2,94 a	10,44 a
NEFID (2 aplicações)	3,22 a	9,22 a
NCFC (2 aplicações)	3,11 a	10,97 a

\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (P<0,05)

Todos os tratamentos proporcionaram maior crescimento das plantas, com destaque para os tratamentos com EFID, **NEFID + NCFC**, EFID+ASM, CFC+ASM, Viça Café e EFID, NEFID e NCFC, todos com duas aplicações. Tais tratamentos foram superiores estatisticamente que os demais, como a testemunha inoculada (Tabela 2).

As formulações EFID e NEFID chamam a atenção, neste experimento, por se tratar de mesma matéria-prima, porém, com produção diferenciada, já que, para a produção de NEFID, utilizaram-se menores partículas moídas e dose 4 vezes inferior àquela utilizada em EFID. Apesar destas diferenças, os resultados comportaram-se de maneira semelhante, tanto para os parâmetros de doença quanto para os de desenvolvimento.

Acredita-se na viabilidade de utilização da formulação NEFID em detrimento da de EFID, pelo fato de a primeira ser mais econômica, da menor

dose utilizada (25 g para 100 g/L) e de manter os mesmos padrões de resultados, principalmente quando utilizada em 2 aplicações.

## **CONCLUSÃO**

As formulações com EFID, EFID (2 aplicações) e NEFID (2 aplicações) conferem proteção em mudas de cafeeiro contra *C. coffeicola*, além de proporcionarem bom desenvolvimento da cultura (maior enfolhamento e maior crescimento).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARGUIL, B.M.; RESENDE, M.L.V.; RESENDE, R.S.; BESERRA Jr., J.E.A.; SALGADO, S.L. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.5, p.535-537, 2005.

BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1991.

BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.128-134, 2004.

CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M. **O cafezal**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

CAVALCANTI, F.R.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; PEREIRA, R.B.; ZACARONI, A.B.; VILLAS BOAS, C.H.; RESENDE, M.L.V. Natural extracts induce lignification on cocoa and tomato leaves In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras, MG: Ufla, 2004. p.107.

CUNHA, R.L.; MENDES, A.N.G.; CHALFOUN, S.M. Controle químico da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.990-996, set./out. 2004.

GODARD, J.F.; ZIADI, S.; MONOT, C.; CORRE, D.L.; SILUÉ, D. Benzothiadiazole (ASM) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**, v.18, p.397-405, 1999.

GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. de; KYDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S - methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.68, n.1, p.89-94, 2001.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular

inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.4, p.377-385, 1987.

HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC, 1997.

IRITI, M.; FAORO, F. Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 85, n. 4, p. 265-270, 2003. Special.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140p. Tese (Doutorado em fitopatologia) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

LOUWS, E.J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; JONES, J.B.; SHOEMAKER, P.B.; SAHIN, F.; MILLER, S.A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, v.85, p.481-488, 2001.

MARCHI, C.E.; BORGES, M.F.; RESENDE, M.L.V. Proteção induzida por benzotiadiazole contra a ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, p.1103-1106, 2002.

MARTIN, R.A.; JOHNSTON, H.W. Effects and control of fusarium diseases of cereal grains in the Atlantic Provinces. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.4, p.210-216, 1982.

MARTINS, E.M.; GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M.; KYDA, K. Ação protetora do acibenzolar S-metil (Bion) em plantas de cafeeiro contra ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 24., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas, MG: Consócio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, 1998. p.177-178.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S.M.C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, v.8, p.185-190, 1985.

NOJOSA, G.B.A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. e *Phoma costarricensis* Echandi.** 2003. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, C.A.; POZZA, E.A.; OLIVEIRA, V.B.; SANTOS, R.C.; CHAVES, Z.M. Escala diagramática para avaliação da severidade de cercosporiose em folhas de cafeeiro. In.: SIMPÓSIO DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória, SP: Embrapa Café, 2001. p.80.

PANISSON, E.; REIS, E.M.; BOLLER, W. Efeito da época, do número de aplicações e de doses de fungicida no controle da giberela em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.5, p.495-499, 2002.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 4.ed. São Paulo SP. Agronômica Ceres, 1995. v.1.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos.** 1998. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

PEREIRA, R.B.; ZACCARONI, A. B.; RIBEIRO-JUNIOR, P.M.; CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V. Produtos comerciais e extratos naturais no controle da mancha bacteriana causada por *Xanthomona campestris* pv. *vesicatoria* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.260, 2004. Suplemento.

RESENDE, M.L.V.; BARGUIL, B.M.; RESENDE, R.S.; BESERRA JÚNIOR, J.E.A.; SALGADO, S.M.L. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE. 2007, Elsinore. **Proceeding...** Elsinore, Dinamarca, 2004. p. 79.

SANTOS, F.S.; SOUZA, P.E.; RESENDE, M.L.V.; POZZA, E.A.; MIRANDA, J.C.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; MANERBA, F.C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.59-63, 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R.F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.67, p.1051-1056, 1977.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.34-42, 1994.

## ARTIGO 2

### **Formulações à base de extratos vegetais, cobre e manganês, na proteção de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola***

(Preparado de acordo com as normas da revista “Pesquisa Agropecuária Brasileira - PAB” exceto as citações (NBR 10520) e as referências bibliográficas (NBR 6023).

**Daniel Rufino Amaral<sup>1,\*</sup>, Mário Lúcio Vilela Resende<sup>1</sup>, Rodrigo Estevam Oliveira Mac Leod<sup>1</sup>, Pedro Martins Ribeiro Júnior<sup>1</sup>, Jadir Borges Pinheiro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Dep. de Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. e-mail: danielrufino78@yahoo.com.br; mlucio@ufla.br; romacleod@yahoo.com.br; ribeirojuniorpm@yahoo.com.br; jadirborges@hotmail.com.

#### **Resumo**

No presente trabalho objetivou-se estudar o efeito de extratos vegetais e a mistura dos mesmos com cobre e manganês na severidade da cercosporiose e no desenvolvimento de mudas de cafeeiro em quatro experimentos. Os extratos provenientes de folhas de café infectadas com ferrugem (EFID) e cascas de frutos de café (CFC) foram misturados com sulfato de cobre e com sulfato e cloreto de manganês. Estes extratos e suas misturas, além do indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM), Viça Café<sup>®</sup> e fosfito de cobre, foram aplicados, via foliar, sete dias antes da inoculação de *Cercospora coffeicola*. Nos experimentos 1 e 2, utilizando formulações à base de extrato isoladamente e em mistura com cobre, observou-se que os tratamentos com fosfito de cobre, a mistura de EFID com cobre e EFID, isoladamente, proporcionaram maior proteção contra a doença, quando comparados com a testemunha inoculada. Para os experimentos 3 e 4 verificou-se que os tratamentos com fosfito de cobre, a formulação EFID, a mistura de EFID com sulfato de manganês (0,29 g/L) e EFID com cloreto de manganês (0,435 g/L) proporcionaram maior proteção

contra a doença em relação à testemunha inoculada. Observou-se que os tratamentos que proporcionaram os melhores resultados no controle da doença também proporcionaram aumento de folhas e maior altura das mudas.

**Termos para indexação:** controle alternativo, micronutrientes, *Coffea arabica*.

### **Abstract**

#### **Formulations based on vegetal extracts, copper and manganese, for the protection of coffee seedlings against *Cercospora coffeicola***

The present work was aimed at studying the effect of vegetal extracts and the mixture of these with copper and manganese in the severity of brown eye spot and on the development of coffee seedlings in four experiments. The extracts from coffee leaves infected with *Hemileia vastatrix* (EFID) and husks of coffee berries (ECFC) were used separately or even mixed with copper sulfate and manganese sulfate or chloride. These extracts and their mixtures, ASM, and the copper based-product Viça Café® were sprayed on coffee leaves seven days before the inoculation of *Cercospora coffeicola*. In the experiments one and two, using formulations based on vegetal extracts separately and in mixture with copper, it was observed that the treatments with copper phosphite, the mixture of EFID with copper and EFID, separately, had provided higher protection against the disease, when compared with the inoculated control. At experiments three and four, it was verified that the treatments with copper phosphite, EFID, the mixture of EFID with manganese sulfate (0,29 g/L) and EFID with manganese chloride (0,435 g/L) provided higher protection against disease in relation to the inoculated control. It was observed that the treatments that had provided the best results for the control of the disease also increased height and number of leaves, compared to the control.

**Index terms:** alternative control, micronutrients, *Coffea arabica*

## INTRODUÇÃO

A cercosporiose, conhecida também como mancha-de-olho-pardo ou olho-de-pomba, causada por *C. coffeicola* é uma das doenças mais antigas do cafeeiro, tanto na América do Sul como América Central e encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras. Nas regiões altas do estado do Espírito Santo e em Minas Gerais, a partir de 1971, ocorreram ataques intensos da doença no campo, com perdas na produção de 30% (Carvalho & Chalfon, 2001). Os prejuízos com a cercosporiose ganharam maior importância econômica com a implantação de lavouras nos cerrados ou em áreas de baixa fertilidade natural, pois existe grande relação entre incidência de cercospora e a nutrição mineral das plantas (Pozza et al., 2000; Talamini et al., 2001).

A agricultura atual busca um modelo de sustentabilidade no qual se utilize o mínimo possível de pesticidas para combater pragas e doenças. Para estar de acordo com essa tendência é preciso encontrar medidas alternativas de manejo fitossanitário compatíveis com a qualidade ambiental visada no manejo sustentável. Dentre as opções de manejo, incluindo tecnologias limpas, cita-se o uso de extratos vegetais possuidores de substâncias bioativas, capazes de atuar como indutores de resistência às doenças em plantas.

Os indutores de resistência em plantas não atuam do mesmo modo que os fungicidas, os nematicidas e os inseticidas, matando o organismo alvo do pesticida em questão, e, sim, atuam ativando os mecanismos de defesa latentes nas plantas. As plantas não possuem sistema imunológico evoluído, como nos mamíferos, mas podem também reconhecer estímulos e responder aos mesmos, se defendendo de estresses bióticos ou abióticos. A resistência induzida (RI) pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias e evita ou atrasa a entrada e ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios.

Avanços na pesquisa envolvendo RI em plantas são acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente, com melhoria na produtividade agrícola, devido à redução de perdas ocasionadas por patógenos.

Dentre esses novos produtos comerciais, destacam-se os produtos à base de nutrientes minerais. Assim, é notória a importância do estado nutricional das plantas em relação à atenuação da severidade de doenças. Os nutrientes minerais influenciam, de uma maneira ou de outra, na resistência a doenças e podem funcionar como co-fatores de enzimas que participam de diversas rotas metabólicas de defesa das plantas. Muitos compostos produzidos nessas rotas metabólicas são formados após a ocorrência da infecção e proporcionam maior resistência às doenças.

Dessa forma, objetivou-se, com o presente estudo, avaliar a eficiência de formulações à base de extratos em associação com os nutrientes cobre e manganês, na proteção de mudas de cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*.



## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção das formulações**

Folhas de café cv. Mundo Novo, naturalmente infectadas por *H. vastatrix* e caídas no solo e cascas de frutos de café coletadas após o beneficiamento dos grãos foram processadas, no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para a obtenção dos extratos vegetais. Tais extratos foram misturados entre si e com fontes de cobre (Cu) e manganês (Mn).

### **Obtenção do fungo *C. coffeicola* e inoculação**

O patógeno foi obtido de folhas, naturalmente infectadas, coletadas em lavoura no campus da UFLA. As folhas foram lavadas superficialmente em água corrente e, em seguida, transferidas para câmara úmida, por três dias. Os conídios produzidos foram retirados da superfície foliar com pincel de ponta macia. A concentração da suspensão de conídios para as inoculações foi ajustada em câmara de Newbauer, para 15.000 conídios.mL<sup>-1</sup>. A suspensão de conídios foi pulverizada sobre as folhas de mudas de cafeeiro nos diferentes tratamentos. Logo após a pulverização, as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida, por 24 horas.

### **Obtenção de mudas de cafeeiro**

As mudas de cafeeiro, cultivar Mundo Novo, foram produzidas em substrato comercial Plantmax-café, suplementadas com aplicações de Iogen<sup>®</sup> (Fertilizantes Mitsui S.A., Poços de Caldas, MG) e adubadas com 0,5 g de fertilizante de liberação lenta por muda (formulação 4-14-8 de NPK). As mudas foram mantidas em casa de vegetação, na UFLA, à temperatura de 26±2°C e umidade em torno de 60%, para a realização do experimento.

## **Instalação e condução de experimentos**

Durante o ano de 2007, foram conduzidos quatro experimentos, em casa de vegetação, do Departamento de Fitopatologia, UFLA. Estes ensaios foram conduzidos em delineamento de blocos casualizados (DBC), com quatro repetições, sendo a parcela experimental constituída por 6 plantas. Para experimentos com cobre, utilizou-se, como fonte, o sulfato de cobre (PA). (Tabela 1). Para os experimentos com manganês, as fontes utilizadas foram o cloreto e o sulfato de manganês (PA) (Tabela 2). Utilizaram-se mudas de 1 ano e de 6 meses de idade, respectivamente. Os tratamentos foram pulverizados sete dias antes da inoculação, até o ponto de escorrimento. As mudas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura de 25°C, até o final do experimento. As avaliações da severidade, número de lesões da mancha-do-olho-pardo, enfolhamento e crescimento foram realizadas quinzenalmente, totalizando seis avaliações, seguindo escala proposta por Oliveira et al. (2001).

Após as avaliações, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença para cada tratamento, de acordo com Shaner & Finney (1977).

**TABELA 1** Tratamentos com formulações à base de extratos e cobre, avaliados nos experimentos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia. UFLA, 2008.

<b>Experimento 1</b>	
Tratamentos	Dosagens
1) Testemunha inoculada	-
2) ASM	0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
3) Viça Café (10 g/L)	10 g.L <sup>-1</sup>
4) EFID	100 g.L <sup>-1</sup>
5) CFC	100 g.L <sup>-1</sup>
6) EFID + CFC	100 g.L <sup>-1</sup> + 100 g.L <sup>-1</sup>
7) EFID + Cobre;	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
8) CFC + Cobre	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
9) EFID + CFC + cobre	100 g.L <sup>-1</sup> + 100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
10) Sulfato de cobre	0,29 g.L <sup>-1</sup>
11) fosfito de cobre (Fulland)	5 mL.L <sup>-1</sup>
<b>Experimento 2</b>	
Tratamentos	Dosagens
1) Testemunha inoculada	-
2) ASM	0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
3) Viça Café (10 g/L)	10 g.L <sup>-1</sup>
4) EFID	100 g.L <sup>-1</sup>
5) CFC	100 g.L <sup>-1</sup>
6) EFID + cobre;	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
7) CFC + cobre	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
8) Sulfato de cobre	0,29 g.L <sup>-1</sup>
9) fosfito de cobre	5 mL.L <sup>-1</sup>

**TABELA 2** Tratamentos com formulações à base de extratos e manganês, avaliados nos experimentos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia. UFLA, 2008.

<b>Experimento 1</b>	
Tratamentos	Dosagens
1) Testemunha inoculada	-
2) ASM	0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
3) Viça Café (10 g/L)	10 g.L <sup>-1</sup>
4) EFID	1 g.L <sup>-1</sup>
5) CFC	1 g.L <sup>-1</sup>
6) EFID + sulfato de manganês	1 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
7) CFC + sulfato de manganês	1 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
8) Sulfato de manganês	0,29 g.L <sup>-1</sup>
9) EFID + sulfato de manganês	1 g.L <sup>-1</sup> + 0,435 g.L <sup>-1</sup>
10) CFC + sulfato de manganês	1 g.L <sup>-1</sup> + 0,435 g.L <sup>-1</sup>
11) Sulfato de manganês	0,435 g.L <sup>-1</sup>
12) Fosfito de cobre	5 mL.L <sup>-1</sup>
<b>Experimento 2</b>	
Tratamentos	Dosagens
1) Testemunha inoculada	-
2) ASM	0,2 g. i.a.L <sup>-1</sup>
3) Viça Café (10 g/L)	10 g.L <sup>-1</sup>
4) EFID	100 g.L <sup>-1</sup>
5) CFC	100 g.L <sup>-1</sup>
6) EFID + sulfato de manganês	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
7) CFC + sulfato de manganês	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
8) Sulfato de manganês	0,29 g.L <sup>-1</sup>
9) EFID + cloreto de manganês	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
10) CFC + cloreto de manganês	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,29 g.L <sup>-1</sup>
11) Cloreto de manganês	0,29 g.L <sup>-1</sup>
12) EFID + cloreto de manganês	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,435 g.L <sup>-1</sup>
13) CFC + cloreto de manganês	100 g.L <sup>-1</sup> + 0,435 g.L <sup>-1</sup>
14) Cloreto de manganês	0,435 g.L <sup>-1</sup>
15) Fosfito de cobre	5 mL.L <sup>-1</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

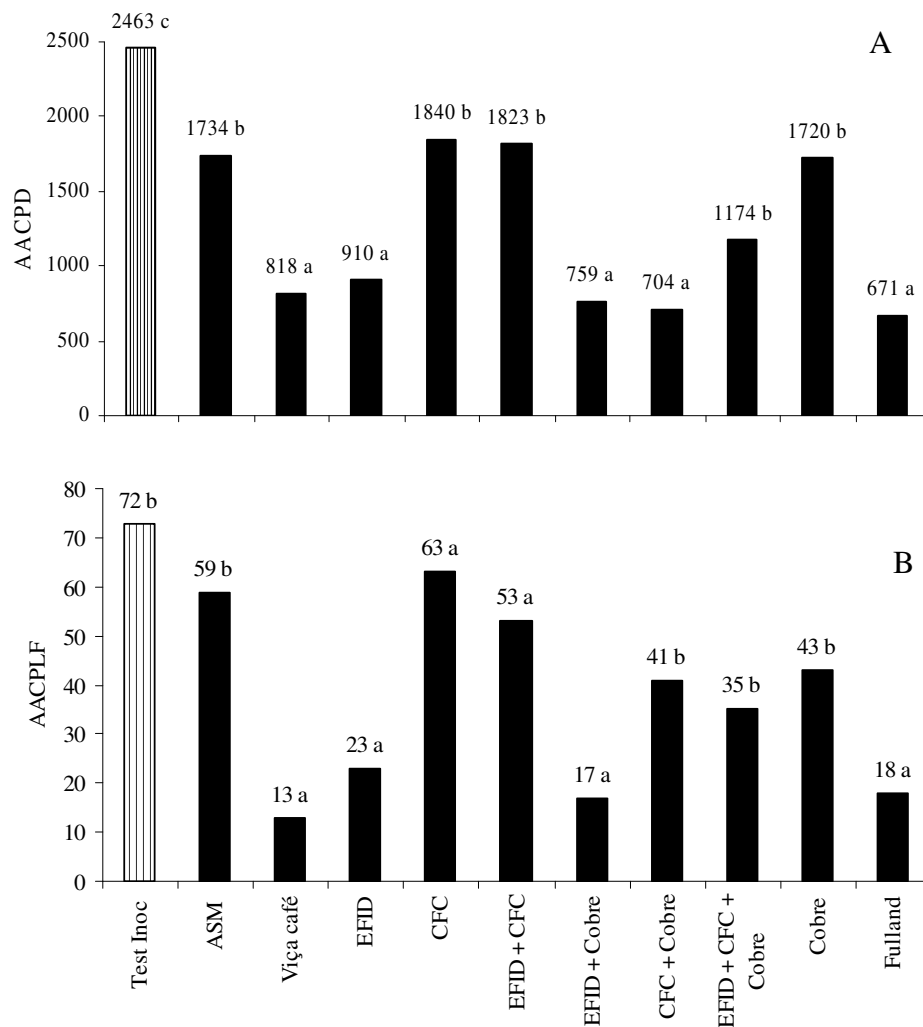
### Proteção de cafeeiro contra *C. coffeicola* por formulações à base de extratos e cobre

#### Experimento 1

As formulações EFID, EFID+cobre e CFC+cobre apresentaram área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) semelhante estatisticamente ao Viça Café e ao Fulland (fosfito de cobre), e menores que a testemunha inoculada, ASM (indutor de resistência padrão) e demais tratamentos (Figura 1A). Os melhores resultados foram alcançados com a utilização do Fosfito de cobre, o qual apresentou proteção de 73%, quando comparado à testemunha inoculada com *C. coffeicola*. Estatisticamente semelhantes ao Fosfito de cobre, os tratamentos com CFC + cobre, EFID + cobre, Viça Café e EFID, apresentaram proteção de 72%, 70%, 67% e 64%, respectivamente (Figura 1A).

O produto Viça Café é largamente utilizado na cafeicultura, devido à sua capacidade de atuar como fertilizante e também como fungicida protetor. Segundo o fabricante (Café Brasil), o produto é composto por: 10%  $K_2O$ ; 10% S; 10% Cu; 6% Zn; 3% B; 2% Mn; 1% Mg. Parte de seu desempenho pode ser atribuída à presença de cobre em sua constituição, porém, devido à presença de vários outros nutrientes, não se pode afirmar que esse resultado seja exclusivamente pela presença de tal nutriente.

Santos et al. (2007), em estudo sobre o efeito de extratos vegetais contra patógenos fúngicos na cafeicultura orgânica, observaram que os extratos EFID e CFC proporcionaram redução na incidência da cercosporiose, da ferrugem e da mancha-de-phoma do cafeeiro comparativamente aos percentuais de doença observados nas testemunhas pulverizadas com água e com Viça Café.



**FIGURA 1** Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD)(A) e de lesões (AACPL)(B), dos tratamentos à base de extratos e cobre. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).

O cobre se encontra no solo, basicamente, na forma divalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e possui grande capacidade de ligar-se a ácidos húmico e fúlvico. Mais de 98% do cobre na solução do solo está complexado como quelato com compostos

orgânicos como aminoácidos, compostos fenólicos e outros quelantes. O cobre participa de várias reações nas plantas, mas também pode atuar como fungicida (protetor) contra vários patógenos em diversas culturas. Internamente na planta, este micronutriente pode participar de diversos processos como fotossíntese, respiração, regulação hormonal, fixação do nitrogênio, de forma indireta e no metabolismo de compostos secundários que podem participar da defesa das plantas contra patógenos. Externamente, como fungicida, pode ser dividido em calda bordaleza e cobres fixos, além de sua associação com ditiocarbamatos (maneb, zineb, mancozeb).

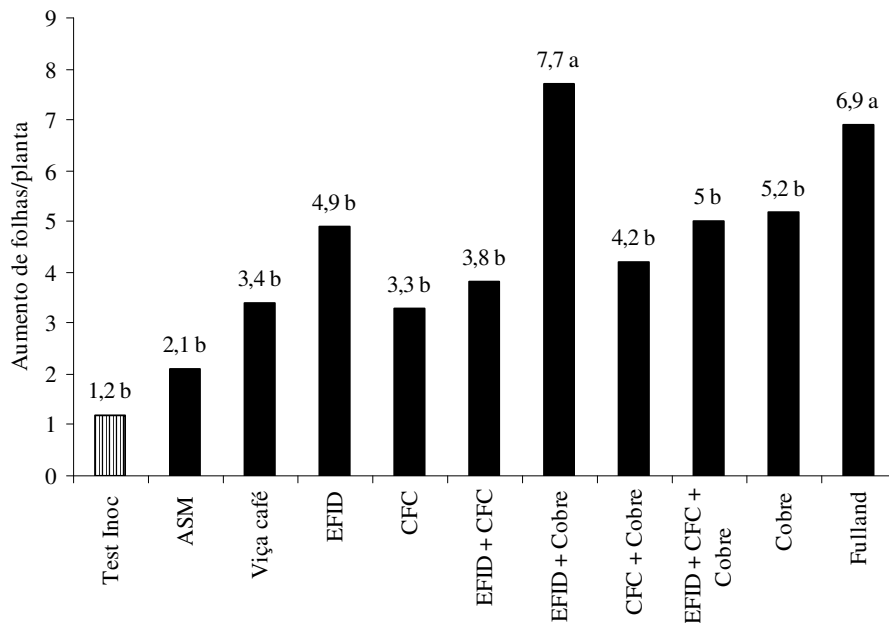
Para a área abaixo da curva de progresso de lesões por folha (AACPLP), pode-se constatar que alguns dos tratamentos que proporcionaram menor AACPD também proporcionaram menor AACPLP, principalmente o Viça Café, fosfito de cobre e as formulações EFID+cobre e EFID (Figura 1 B).

Cunha et al. (2004), avaliando o efeito de fungicidas cúpricos e ou sistêmicos, observaram redução na incidência de ferrugem (porcentagem de folhas doentes), no período avaliado, abaixo de 35%, enquanto a testemunha atingiu valores superiores a 80%, nos meses de maior incidência, que foram de maio a agosto.

Segundo os mesmos autores, os cúpricos aplicados preventivamente, isoladamente ou associados ao epoxiconazole foram eficientes no controle da ferrugem, quando a incidência da doença era baixa, com preservação do enfolhamento e boa produtividade. Já Chalfoun & Carvalho (1999) observaram que a aplicação de fungicidas cúpricos com base em datas pré-determinadas não apresentou níveis de controle satisfatórios, devido ao fato de a doença, no ano de 1999, ter ocorrido mais tardiamente.

Na avaliação do desenvolvimento da cultura, observou-se efeito sinérgico entre o extrato EFID e o cobre, devido ao aumento no número de folhas, superior estatisticamente aos demais tratamentos, a exceção do

tratamento com fosfito de cobre – Fulland, semelhante estatisticamente ao supracitado tratamento (Figura 2).



**FIGURA 2** Aumento médio no número de folhas, em função dos tratamentos com formulações à base de extratos e cobre, 110 dias após a aplicação dos tratamentos, ao final do experimento. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).

Cunha et al. (2004), na avaliação da desfolha na safra de 2001/2002, verificaram os efeitos benéficos na preservação do enfolhamento das plantas nos tratamentos que continham, em sua formulação, o micronutriente cobre. Este resultado é superior aos tratamentos com produtos sistêmicos aplicados, com 5% de incidência de ferrugem. Os produtos à base de cobre também proporcionam maiores produções, principalmente em associação com outros produtos – fungicidas e inseticidas (Chalfoun & Carvalho, 1999). Além da ação fungicida, o nutriente pode atuar como co-fator na síntese de enzimas, inclusive aquelas

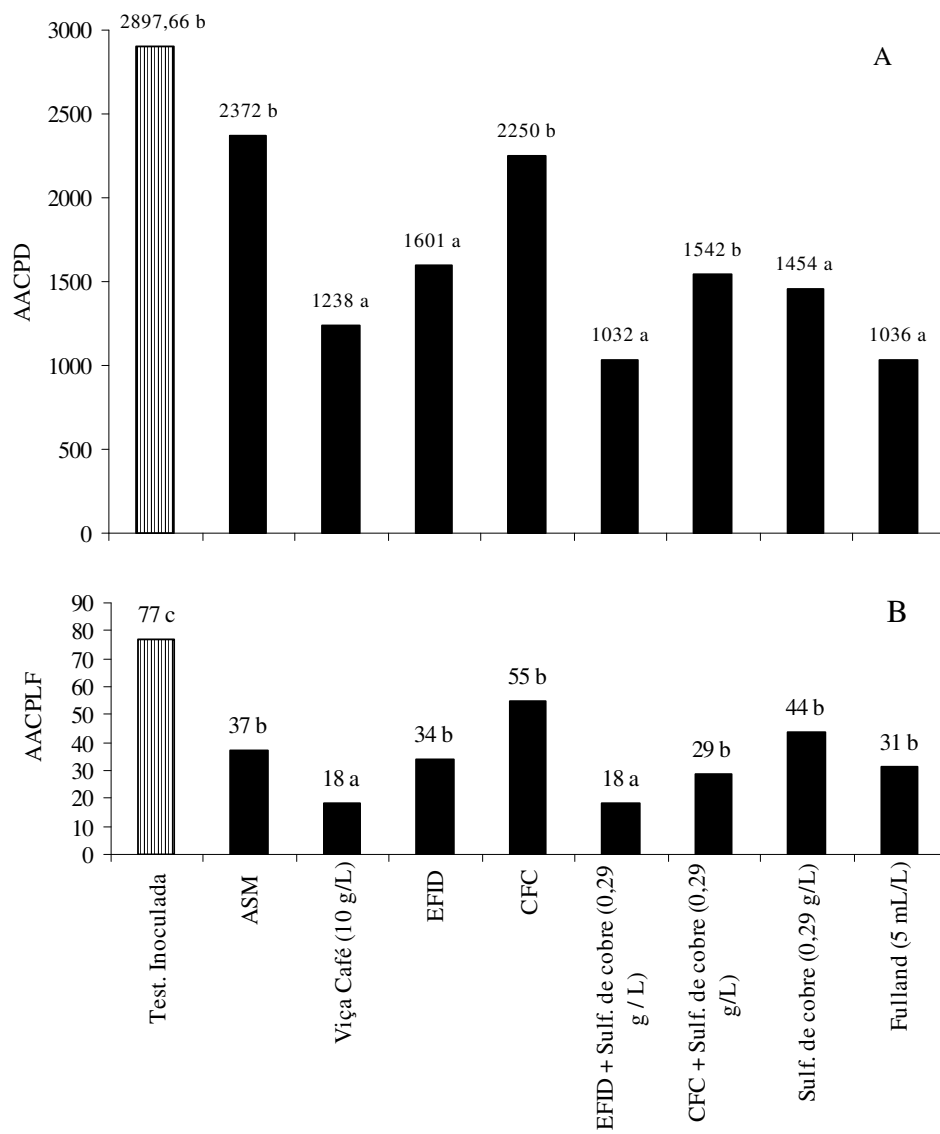


ligadas à patogênese, com evidência da atuação destas substâncias no processo de defesa das plantas. O Cu está também envolvido na enzima Cu-Zn superóxido dismutase (CuZnSOD), que está diretamente envolvida no mecanismo de detoxificação do superóxido gerado na fotossíntese. Esta enzima está localizada, além dos cloroplastos, na mitocôndria e nos glioxissomos. Neste último, a CuZnSOD possui a função de controlar a peroxidação dos lipídios na membrana e, portanto, na senescência. Outras enzimas importantes em que o Cu participa são a ascorbato oxidase, a lacase (responsável pela síntese de plastoquinonas) e a fenolase (responsável pela síntese de lignina, alcalóides e outras) (Marschner, 1995).

## **Experimento 2**

No experimento 2, foram avaliados os mesmos tratamentos do experimento 1, com exceção daqueles que não apresentaram bons resultados. Observou-se que a formulação EFID+cobre e os produtos fosfito de cobre e Viça Café apresentaram os melhores resultados, com proteção em relação à testemunha de 65%, 64% e 58 %, respectivamente (Figura 3 A).

Para a AACPLF, pôde-se observar, novamente, que o tratamento com a formulação EFID+cobre apresentou maior eficiência no controle da cercosporiose do cafeeiro. Os resultados obtidos pela formulação EFID+cobre, comparados à formulação de EFID e ao tratamento com cobre isoladamente, sugerem que houve efeito sinérgico entre o extrato EFID e cobre (Figura 3 B).



**FIGURA 3** Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) (A) e número de lesões (AACPL)(B). Tratamentos com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).

Cunha et al. (2004) já haviam observado que a mistura de cobre com epoxiconazole apresentava resultados superiores àqueles observados pelos produtos isoladamente. Segundo Maringoni & Kimati (1987), a combinação de fungicida cúpricos e etilenobisditiocarbamatos (maneb, mancozeb e zineb) apresenta efeito sinérgico. Goes et al. (2004) verificaram que os fungicidas cúpricos, aplicados isoladamente, foram eficientes no controle da ferrugem da goiabeira, apresentando eficiência comparável à do tratamento-padrão representado por tebuconazole. Esta eficiência foi também observada mediante o emprego da combinação mancozeb e óxido cuproso ou hidróxido de cobre.

Para os parâmetros de desenvolvimento, observou-se que o produto Viça Café proporcionou o maior aumento de folhas, seguido da formulação EFID + Cobre (Tabela 3).

**TABELA 3** Efeito de formulações à base de extratos e cobre no aumento de folhas por planta e no aumento da altura.

Tratamentos	Aumento de folhas/planta	Altura final – altura inicial
Test. inoculada	0,17 b*	8,72 b
Bion	1,17 b	6,49 b
Viça Café (10 g/L)	4,50 a	11,14 a
EFID	3,17 a	10,53 a
CFC	2,28 a	7,58 b
EFID + sulf. de cobre (0,29 g / L)	3,22 a	12,98 a
CFC + sulf. de cobre (0,29 g/L)	2,89 a	8,35 b
Sulf. de cobre (0,29 g/L)	2,11 b	13,3 a
fosfito de cobre (5 mL/L)	2,61 a	10,44 b

\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (P<0,05)

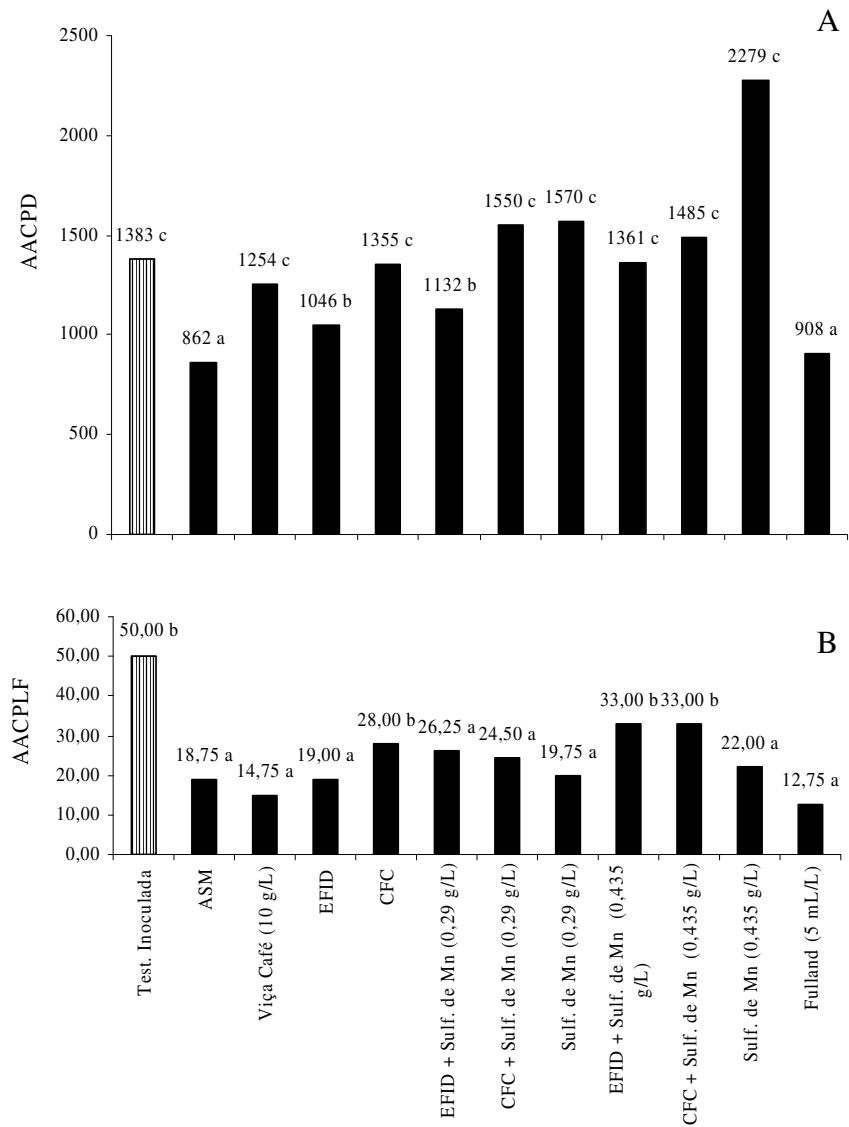
Ao final do experimento (90 dias), observou-se que o tratamento com sulfato de cobre proporcionou maior altura de plantas, seguido, muito próximo, pela formulação EFID+cobre (Tabela 3). Estes resultados de desenvolvimento confirmam os obtidos por Cunha et al. (2004), que observaram maiores índices de crescimento para tratamentos com cobre.

## **Proteção de cafeeiro contra *C. coffeicola* por formulações à base de extratos e manganês**

### **Experimento 1**

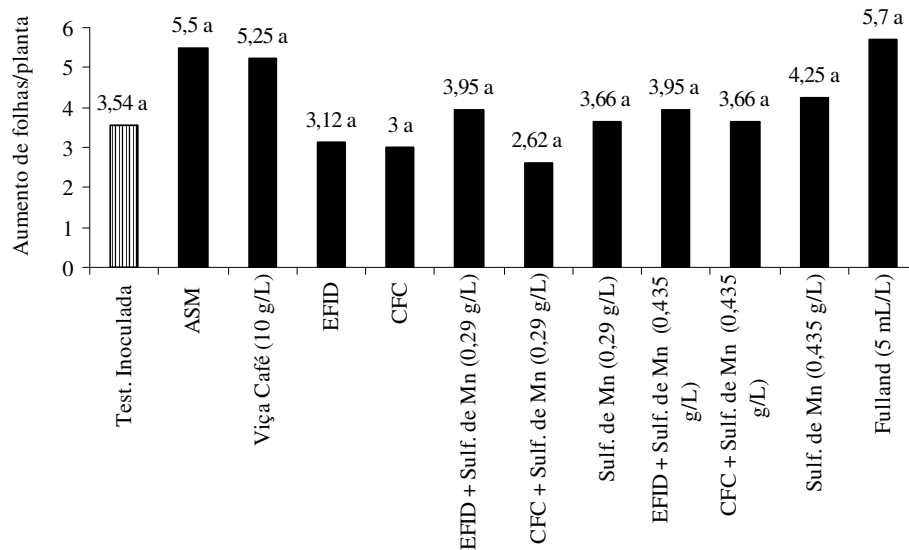
Na avaliação do efeito de formulações à base de extrato misturadas com o micronutriente manganês na AACPD, pode-se observar que as misturas não apresentaram efeito sinérgico para nenhuma das doses testadas. A formulação de EFID utilizada isoladamente somente não foi melhor que os tratamentos com ASM e fosfito de cobre (Figura 4 A). Os melhores tratamentos, ASM, fosfito de cobre e EFID, proporcionaram proteção de 38%, 35% e 25%, respectivamente, quando comparados à testemunha. A maior AACPD ocorreu em plantas pulverizadas com a maior dose de manganês. Segundo Graham & Webb (1991), o aumento nos teores de Mn reduz os teores de Cu, Fe e Zn que participam de rotas metabólicas na formação de compostos de defesa, o que pode prejudicar a defesa das plantas.

Entretanto, para AACPLF pode-se observar que a formulação EFID + Manganês foi estatisticamente semelhante ao melhor tratamento, o produto fosfito de cobre (Figura 4 B). No entanto, este efeito positivo pode ser atribuído ao extrato EFID, pois esta formulação apresentou desempenho superior àquela observada por EFID + manganês. A maior AACPLF foi observada para a testemunha inoculada e não mais para a maior dose de sulfato de manganês como observado para AACPD.



**FIGURA 4** Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) (A) e número de lesões (AACPLP)(B) dos tratamentos à base de extratos e manganês com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).

O baixo rendimento das formulações combinadas com manganês pode ser devido à fonte deste nutriente. Segundo alguns autores, os sulfatos são as fontes de micronutrientes mais comuns, porém, nem sempre são eficientes. Assim, as fontes com cloreto são mais eficientes que aquelas com sulfatos. Como exemplos de fontes com cloreto e sulfatos têm-se: sulfato de cobre, sulfato de manganês, oxiclreto de cobre, cloreto de manganês, entre outras (Abrahão et al., 1991; Malavolta, 1981; Cordeiro et al., 1990). Para o aumento no número de folhas, verificou-se que os tratamentos com os melhores resultados para AACPD e AACPLF também proporcionaram maior aumento no número médio de folhas (Figura 5). Os melhores tratamentos em relação a esta variável foram Fosfito de cobre, ASM E Viça Café.



**FIGURA 5** Aumento médio no número de folhas em função dos tratamentos à base de extratos de manganês, 110 dias após a aplicação dos tratamentos, ao final do experimento. Médias com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).

Entre as formulações, observou-se que o EFID+manganês proporcionou o maior ganho no número de folhas, maior que o tratamento com EFID isoladamente.

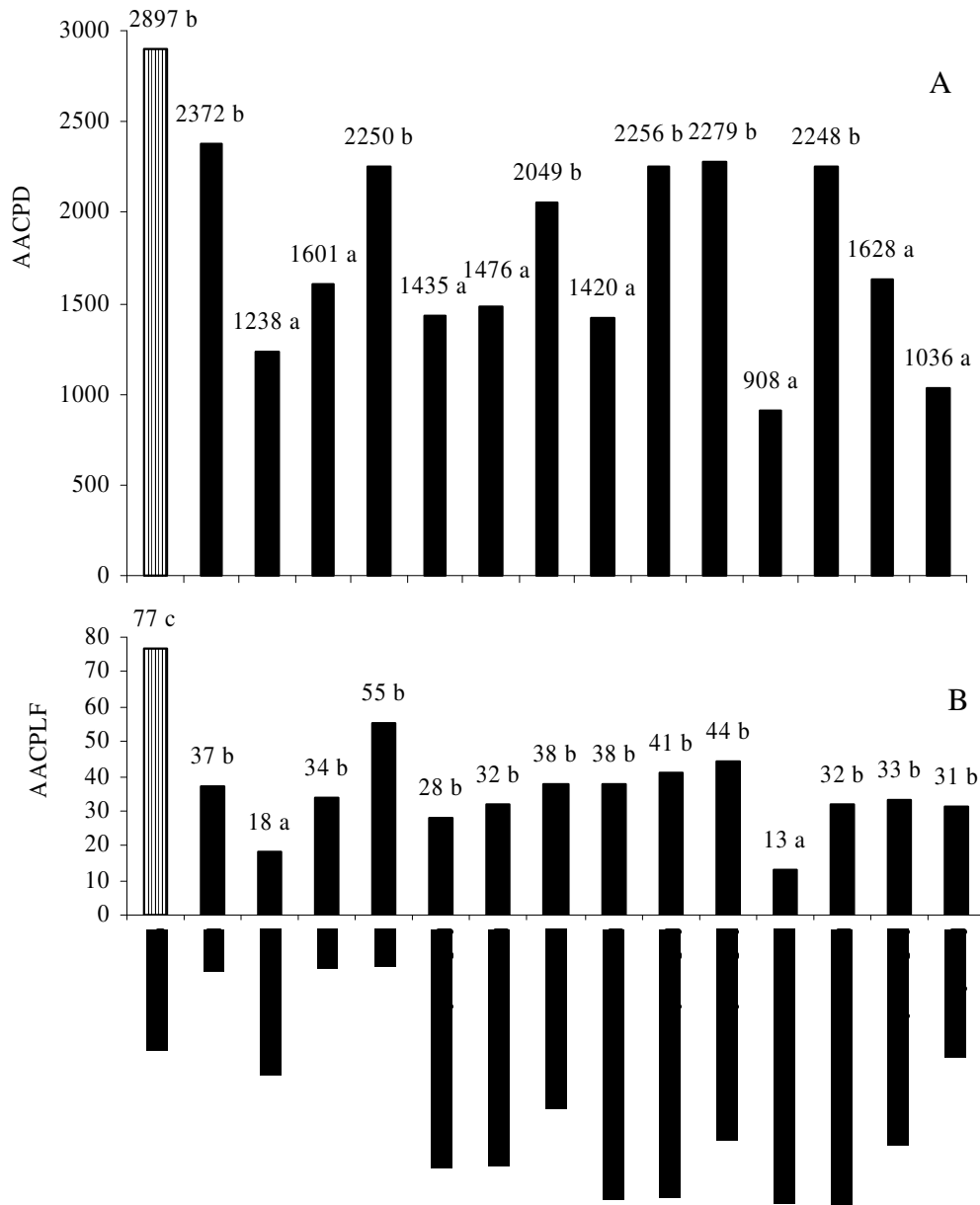
## **Experimento 2**

Para o segundo experimento, realizado com combinações de extratos com manganês, foram acrescentados tratamentos com duas doses de cloreto de manganês, fonte que não foi avaliada no primeiro experimento e retirou-se o tratamento com a maior dose de manganês, a qual não apresentou bons resultados.

Para AACPD, o melhor resultado foi observado para plantas tratadas com a formulação de EFID+cloreto de manganês ( $0,435 \text{ g.L}^{-1}$ ). Esta formulação proporcionou proteção de 69%, quando comparada com a testemunha. Outro tratamento que se destacou foi o Fosfito de cobre, o qual apresentou controle de 65%, comparado com a testemunha (Figura 6 A).

A formulação EFID+cloreto de Mn ( $0,435 \text{ g.L}^{-1}$ ), comparada com os tratamentos isolados de EFID e cloreto de Mn ( $0,435 \text{ g.L}^{-1}$ ), apresentou diferença na proteção de, aproximadamente, 25%. De acordo com estes resultados, pode-se inferir que houve efeito sinérgico entre os produtos testados em mistura.

Para a AACPLF, os melhores resultados obtidos também foram proporcionados pela formulação EFID+cloreto de Mn ( $0,435 \text{ g.L}^{-1}$ ). Observou-se diferença significativa deste tratamento em relação aos demais, sendo estatisticamente semelhante apenas ao tratamento com Viça Café (Figura 6 B).



**FIGURA 6** Área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) (A) e número de lesões (AACPLF)(B) dos tratamentos à base de extrato e manganês. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P < 0,05$ ).



Segundo Huber & Wilhelm, (1988), plantas de trigo deficientes em Mn são mais susceptíveis à infecção do mal-do-pé e ao aumento da disponibilidade deste nutriente e sua absorção pelas plantas levam à redução da severidade da doença. Em trabalho semelhante, Rengel et al. (1993), avaliando o efeito de doses de Mn e as diferenças varietais em trigo infectado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Walker, observaram que, com o incremento de doses de Mn, a redução na severidade da doença expressa em comprimento das lesões nas raízes.

Simoglou & Dordas (2006), no estudo sobre o efeito de aplicações foliares de Mn, B e Zn em trigo, concluíram que a aplicação dos micronutrientes reduziu a severidade de mancha-amarela em trigo (*Pyrenophora tritici-repentis*). Reduções da severidade de doenças têm sido reportadas com aplicações foliares simples de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) ou cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ) (Reuveni et al., 1997; Reuveni, 1998). Estes autores sugerem que a ação do B, Cu e Mn não é por efeito direto no patógeno e, sim, porque os micronutrientes participam de diversas rotas para a produção de compostos de defesa das plantas.

Na proteção contra a entrada de patógenos, o Mn atua, principalmente, na síntese de lignina (barreira física a entrada de patógenos) e de compostos fenólicos (substâncias tóxicas aos patógenos). A presença de Mn inibe a aminopeptidase (enzima que hidrolisa proteínas, dando aminoácidos essenciais ao desenvolvimento de fungos) e metilesterase da pectina (exoenzima de fungos que degrada parede celular do hospedeiro) (Marschner, 1995).

Na avaliação dos parâmetros de desenvolvimento da cultura, aumento no número de folhas e altura das plantas, plantas tratadas com a formulação EFID + cloreto de Mn apresentaram resultados superiores aos demais tratamentos (Tabela 4).

**TABELA 4** Efeito de formulações à base de extratos vegetais e manganês no aumento de folhas por planta e no aumento da altura.

Tratamentos	Aumento de folhas/planta	Altura final – Altura inicial
Test. inoculada	0,17 b*	8,72 b
Bion	1,17 b	6,49 b
Viça Café (10 g/L)	4,50 a	11,14 a
EFID	3,17 a	10,53 a
CFC	2,28 a	7,58 b
EFID + sulf. de Mn (0,29 g/L)	3,67 a	10,83 a
CFC + sulf. de Mn (0,29 g/L)	3,89 a	11,3 a
Sulf. de Mn (0,29 g/L)	3,61 a	11,13 a
EFID + cloreto de Mn (0,29 g/L)	2,89 a	10,63 a
CFC + cloreto de Mn (0,29 g/L)	2,06 a	9,27 a
Cloreto de Mn (0,29 g/L)	1,67 b	8,94 a
EFID + cloreto de Mn (0,435 g/L)	4,72 a	11,8 a
CFC + cloreto de Mn (0,435 g/L)	2,94 a	9,39 a
Cloreto de Mn (0,435 g/L)	3,33 a	9,97 a
fosfito de cobre (5 mL/L)	2,61 a	10,44 a

\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (P<0,05).

O Mn está envolvido em diversos processos fisiológicos, como absorção iônica, fotossíntese, redução do nitrogênio, respiração, regulação hormonal, síntese de proteínas e proteção contra a entrada de patógenos. Além disso, este micronutriente atua na ativação das enzimas ATPase, na sintetase de glutathione e na ativação de metionina, entre outras.

A maior eficiência das formulações com cloreto pode ser explicada pelo fato da fonte cloreto ter elevada permeabilidade cuticular por meio da qual estabelece uma diferença de potencial de difusão negativa entre os dois lados da cutícula. Este potencial favorece a penetração dos cátions presentes na solução, neste caso  $Mn^{2+}$ , através da cutícula.

Portanto, pode-se concluir que, entre as combinações testadas nas formulações de EFID, aquelas com sulfato de cobre ( $0,29 \text{ g.L}^{-1}$ ) e com cloreto de potássio ( $0,435 \text{ g.L}^{-1}$ ) apresentam potencial no controle da cercosporiose do cafeeiro, além de proporcionarem bom desenvolvimento da cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, E.J.; CARVALHO, M.M. de; CARVALHO, J.G.; GUIMARÃES, P.T.G. Efeitos da aplicação foliar de sulfato de zinco, na presença e ausência de cloreto de potássio, no teor de zinco nas folhas e na produção do cafeeiro (*Coffea arabica*, L.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16. Pinhal. **Anais...** Espírito Santo do Pinhal: IBC, p.116-117. 1991.

CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M. **Cercospora**: doença do cafeeiro também chamada de "olho pardo" ou "olho de pomba. 2001, Lavras, Ed. UFLA. Informe tecnológico, 026).

CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.L. Controle químico da ferrugem (*Hemileia Vastatrix* Berk & Br.) do cafeeiro através de diferentes esquemas de aplicação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.3, p.363-367, 1999.

CUNHA, R.L.; MENDES, A.N.G.; CHALFOUN, S.M. Controle químico da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n.5, p.990-996, set./out. 2004.

GRAHAM, R.D.; WEBB, M.J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J.J.; COX, F.R.; SHUMAN, L.M.; WELCH, R.M. (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. 2.ed. Madison: Soil Science Society of America, 1991. p.329-370.

HUBER, D.M.; WILHELM, N.S. Manganese in soils and plants. In: GRAHAM, R.D.; HANNANM, R.J.; UREN, N.C. (Ed.). 1988. p.155-173.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola**: adubos e adubação. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 596p.

MARINGONI, A.C.; KIMATI, H. Sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de pimentão e de tomateiro a drogas. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.13, p. 60-172, 1987.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic, 1995. 889p.

OLIVEIRA, C.A.; POZZA, E.A.; OLINEIRA, V.B.; SANTOS, R.C.; CHAVES, Z.M. Escala diagramática para avaliação da severidade de cercosporiose em

folhas de cafeeiro. In. SIMPÓSIO DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos.....** Vitória, ES: Embrapa Café, 2001. p.80.

POZZA, A.A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; POZZA, E.A.; CAIXETA, S.L.; ZAMBOLIM, L. Intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro em função de doses de N e K em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.29–33, 2000.

RENGEL, Z.; GRAHAM, R.D.; PEDLER, J.F. Manganese and accumulation of phenolics and lignin as related to differential resistance of wheat genotypes to the take all fungus. **Plant and Soil**, v.151, n.2, p.255-263, 1993.

REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery mildew (*Sphaerotheca fugilinea*) in cucumber plants. **European. Journal. Plant Pathology**, v.103, p.581-588, 1997.

REUVENI, M.; REUVENI, R. Foliar-fertilizer therapy – a concept in integrated pest management. **Crop Protection**, v.17, p.11-118, 1998.

SANTOS, F.S.; SOUZA, P.E.; RESENDE, M.L.V.; POZZA, E.A.; MIRANDA, J.C.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; MANERBA, F.C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.59-63, 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R.F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.67, p.1051-1056, 1977.

SIMOGLOU, K.B.; DORDAS, C. Effect of foliar applied boron, manganese and zinco on tan spot in winter durum wheat. **Crop protection**, v.25, p.657-663, 2006.

TALAMINI, V.; SOUZA, P.E.; POZZA, E.A.; SILVA, A.M.; BUENO FILHO, J.S.S. Progresso da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro (*coffea arabica* l.) em diferentes lâminas de irrigação e diferentes parcelamentos de adubação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.55-62, 2001.

### ARTIGO 3

**Estudo dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa  
ativada por formulações à base de folhas de cafeeiro contra *Cercospora  
coffeicola* em plantas de cafeeiro**

(Preparado de acordo com as normas da revista “Fitopatologia Brasileira” exceto as citações (NBR 10520) e as referências bibliográficas (NBR 6023)

**Daniel R. Amaral<sup>1,2\*</sup>, Mário Lúcio V. Resende<sup>2</sup>, Pedro Martins R. Júnior<sup>2</sup>  
Márcia Toyota<sup>1</sup>, Jadir B. Pinheiro<sup>1</sup>**

**Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras,**

**Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG,**

**Fax (0xx35)38291283.**

E-mail: mlucio@ufla.br

(Aceito para publicação em / / )

Autor para correspondência: Mário Lúcio Vilela de Resende

---

AMARAL, D.R.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M. TOYOTA, M.; PINHEIRO, J.B.. Estudo dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa contra *Cercospora coffeicola* em plantas de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das formulações EFID e NEFID, e do ASM sobre as atividades de proteínas relacionadas à patogênese (PR), peroxidases, quitinase e beta-1,3-glucanase, e no conteúdo de fenóis totais e lignina solúvel, em folhas de cafeeiro. Plantas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo foram pulverizadas com: acibenzolar-S-metil (ASM; 0,2 g L<sup>-1</sup>), extrato de folhas de café infectadas com ferrugem (EFID; 100 g L<sup>-1</sup>) e extrato de folhas de café infectadas com ferrugem obtido de partículas mais finas (30 micras) (NEFID 2,5 g L<sup>-1</sup>), ambos tratamentos com e sem inoculação de *Cercospora coffeicola*, além de testemunha inoculada e testemunha pulverizada com água.

As atividades de peroxidase, quitinase e  $\beta$  1,3-glucanase foram maiores nas últimas coletas, a partir de 7 até 21 dias. A exceção foi para a enzima  $\beta$  1, 3-glucanase, que a atividade aumentou nas primeiras horas para os tratamentos com ASM e NEFID. Para o conteúdo de fenóis totais, observaram-se maiores atividades aos 11 dias de tratamento. A área abaixo da curva do conteúdo de fenóis totais foi significativamente maior para os tratamentos com EFID e NEFID em relação ao ASM e às testemunhas inoculada e absoluta.

**Palavras chaves adicionais:** PR proteínas, fenóis, extratos vegetais, cercosporiose

### **Abstract**

#### **Study of the biochemical mechanisms involved in defense response against *Cercospora coffeicola* in coffee seedlings**

The objective of this work was to assess the influence of the formulations EFID and NEFID, and ASM on the activation of plant pathogenesis-related (PR) proteins, peroxidase, chitinase and  $\beta$  1,3-glucanase, and on the content of total phenolics and soluble lignin, in leaves of coffee seedlings. Coffee seedlings of cultivar Mundo Novo were sprayed with: acibenzolar-S-metil (ASM; 0,2 g L<sup>-1</sup>), extracts from coffee leaves infected with *Hemileia vastatrix* (EFID; 100 g L<sup>-1</sup>) and extracts from coffee leaves infected with *Hemileia vastatrix* (EFID) with smaller particles (30 micra) (NEFID 2,5 g L<sup>-1</sup>), with or without inoculation of *Cercospora coffeicola*, inoculated control and absolute control sprayed with water. The activities of peroxidase, quitinase and  $\beta$  -1,3-glucanase were higher for samples collected later in time, from 7 to 21 days after spraying. The exception was for  $\beta$  1, 3-glucanase, which activity increased in the first hours, for the treatments with ASM and NEFID. The highest content of total phenolics was detected 11 days after spraying. The area under total phenolic content curve was significantly higher for treatments with EFID and NEFID in relation to ASM and controls.

**Additional Keywords:** PR proteins, phenolics, vegetal extracts, brown eye spot.

## INTRODUÇÃO

A cercosporiose, ou mancha-de-olho-pardo, causada por *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, é uma das principais doenças da fase de viveiro da cultura do café (*Coffea arabica* L.) e possui como características a desfolha, a redução no desenvolvimento e o raquitismo, tornando-se impróprias para o plantio.

O principal método de controle da cercosporiose é o químico, no entanto, o uso indiscriminado de fungicidas causa danos ao meio ambiente, aos seres vivos e favorece a seleção de raças resistentes de patógenos. Entre as estratégias para o controle de doenças de plantas, em geral, destaca-se a ativação das defesas naturais das mesmas, por meio da indução de resistência sistêmica adquirida (RSA) (Louws et al., 2001), em que moléculas eliciadoras podem proteger os tecidos contra o ataque de ampla variedade de patógenos (Hammond-Kosack & Parker, 2003). A RSA é expressa tanto local quanto sistemicamente, em resposta a patógenos que causam lesões necróticas. A resistência expressa está associada ao aumento de atividade de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e é mediada por processo dependente do ácido salicílico.

Outros processos de defesa podem ser incluídos, como explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas, lignificação e enrijecimento de parede (Durrant & Dong, 2004). Embora as proteínas PR estejam envolvidas na defesa de plantas, elas não são necessariamente identificadas por sua ação antipatogênica, mas sim por seu simples acúmulo em plantas submetidas à situação de patogênese (Loon, 1997). Entre as PR, encontram-se hidrolases como as beta-1,3-glucanases (PR-2; EC 3.2.1.39) e quitinases (PR-3; EC 3.2.1.14), que têm sido relatadas, principalmente, como inibidoras do crescimento fúngico (Van Loon & Van Strien, 1999). Essas proteínas,



especificamente as quitinases, apresentam ação antibacteriana, em razão de sua ação lisozímica sobre a parede celular (Stintzi et al., 1993). Elicidores sintéticos, como o ASM (éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico), parecem atuar similarmente ao ácido salicílico e também induzem RSA contra bactérias, fungos e vírus (Cole, 1999; Resende et al., 2002).

Os extratos vegetais são considerados como eliciadores bióticos (Pascholati & Leite, 1995), cuja eficiência no controle de fitopatógenos foi observada em diversos patossistemas (Bonaldo et al., 2004; Guzzo et al, 1987; Maxemiuc–Naccache & Dietrich, 1985). Tais extratos podem liberar eliciadores derivados da superfície celular, os quais induzem respostas de defesa tanto em plantas hospedeiras como em não hospedeiras. Estes incluem peptídeos, carboidratos, glicoproteínas e ácidos (Nürnbergger & Brunner, 2002).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de eliciadores biológicos e químicos sobre as atividades de proteínas PR, quitinase, peroxidase e beta-1,3-glucanase, além de fenóis totais e a deposição de lignina em folhas de musas de cafeeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das formulações

Folhas de café cv. Mundo Novo, naturalmente infectadas por *H. vastatrix* e caídas no solo, foram utilizadas para a obtenção do EFID – partículas mais grosseiras e NEFID - partículas extremamente finas (30 micras) foram processados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para a obtenção dos extratos vegetais. O produto ASM, utilizado como indutor de resistência padrão, foi obtido junto à Syngenta Proteção de Cultivos Ltda..

### Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa

Para a determinação dos mecanismos, foi realizado experimento em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia visando fornecer material foliar para as análises bioquímicas.

Utilizaram-se mudas de cafeeiro com 90 dias de idade. Os tempos de coleta das amostras foliares foram: 0 hora, 6 horas (0,25 dia), 12 horas (0,5 dia), 24 horas (1 dia), 72 horas (3 dias), 168 horas (7 dias), 264 horas (11 dias), 336 horas (14 dias) e 504 horas (21 dias), após a aplicação do eliciador. Foram utilizadas 3 repetições de 3 plantas cada, por tempo de coleta por tratamento. A inoculação do patógeno foi realizada com 144 horas (6 dias). Os seguintes tratamentos foram avaliados: EFID, NEFID e ASM ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ), inoculados e não inoculados com *C. coffeicola*, além de duas testemunhas: uma inoculada com *C. coffeicola* e não pulverizada com os tratamentos e outra absoluta (plantas pulverizadas somente com água), em que foram analisadas as atividades das enzimas peroxidase de guaicol (POX; EC 1.11.1.7), quitinase (CHI; EC

3.2.1.14),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6), além da deposição de lignina solúvel e fenóis solúveis totais.

As amostras coletadas foram protegidas com papel alumínio, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o preparo dos extratos para as análises bioquímicas descritas nos próximos itens.

### **Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e atividade de peroxidase de guaiacol, quitinase e $\beta$ -1,3-glucanase**

Os tecidos vegetais foliares foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, adicionou-se o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, durante 3 minutos (10mL de tampão para cada grama de amostra) sobre banho de gelo. Após a filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 12.000 g, por 15 minutos e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. Todos os procedimentos para a obtenção do extrato enzimático foram executados em  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

#### **Proteínas totais**

O nível de proteína total solúvel foi aferido com a utilização de um padrão de albumina sérica bovina (BSA) ajustado para 100 $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, conforme ensaio de Bradford (1976).

#### **Peroxidase de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7)**

A atividade de peroxidases de guaiacol (POX) foi determinada pela adição de 100 $\mu\text{L}$  do extrato enzimático ajustado para 2 mL de solução contendo 900 $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 500 $\mu\text{L}$  de guaiacol 20mM e 500 $\mu\text{L}$  peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação em  $30^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 480 nm (Urbanek et al., 1991). Uma unidade POX foi expressa como variação de 1 OD<sub>480</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta_{480\text{nm}} \text{mgP}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

#### **Quitinase (CHI; EC 3.2.1.14)**

Atividade de quitinases foi determinada pela adição de 100 $\mu$ L do extrato enzimático ajustado para 320 $\mu$ L de uma solução com acetato de sódio 50mM pH 5,2 e 70 $\mu$ L de CM-Chitin-RBV (2mg mL<sup>-1</sup>), um substrato específico para quitinases fornecido por Loewe Biochemica GmbH, em microplacas de 96 cavidades, com volume de 350 $\mu$ L por cavidade. Após incubação a 35°C por 80 minutos, as amostras foram acidificadas com 50 $\mu$ L de HCl 0,5N, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas (1.450g, por 10 minutos) a 4°C.

Uma alíquota de 200 $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova microplaca, para leitura em 492nm, em um leitor EIA-compatível (Wirth & Wolf, 1990). A atividade CHI foi expressa pela variação de 1 OD<sub>492</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta$  <sub>492nm</sub> mgP<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>).

#### **$\beta$ -1,3-glucanase (GLU; EC 3.2.1.6)**

A atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase foi medida de modo análogo ao da quitinase, apenas com substituição do substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg mL<sup>-1</sup>; Loewe Biochemica GmbH). Para promover ação hidrolítica de  $\beta$ -1,3-glucanase, foi adotado tempo de incubação de 35°C por 80 minutos. As amostras foram submetidas a um mix de 5" e, posteriormente, medidas fotometricamente em filtro de 620 nm de um leitor EIA (Wirth & Wolf, 1990). A atividade GLU foi expressa pela variação de 1 OD<sub>620</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta$  <sub>620nm</sub> mgP<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>).

Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas.

### **Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais**

Os tecidos vegetais foliares foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 12 horas (liofilizador condensador L101, marca LIOBRAS). Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para micro tubo de 2 mL e homogeneizadas com 1,5 mL de metanol a 80% e mantidas sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada, a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para a determinação de lignina solúvel.

### **Determinação de lignina solúvel**

Foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol 80%, homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco, a 65°C, por 15 horas. Posteriormente, acrescentou-se 1,5mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10). Em seguida, agitaram-se suavemente os microtubos para hidratar o resíduo e estes foram colocados em banho-maria, a 100°C, por 4 horas.

Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, a 10.000g, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5mL de água ultrapura e novamente centrifugados a 10.000g por 10 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5M e mantido em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada, a 10.000g, por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em

câmara fria (4°C), por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

A seguir, a mistura foi centrifugada, a 10.000g, por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em 2 mL de NaOH 0,5M.

A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expresso em µg de lignina solúvel, por miligrama de matéria seca (adaptado de Doster & Bostock, 1988).

#### **Determinação de fenóis solúveis totais**

Alíquota de 150µL do extrato metanólico foi misturada a 150µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N, por 5 minutos, homogeneizada com 150µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M, por 10 minutos e diluída com 1 mL de água ultrapura à temperatura ambiente, por uma hora.

Os valores de absorbância desta reação foram determinados a 725 nm em espectrofotômetro e calculados com base na curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente µg de catecol por miligrama de matéria seca (Spanos & Wrolstad, 1990).

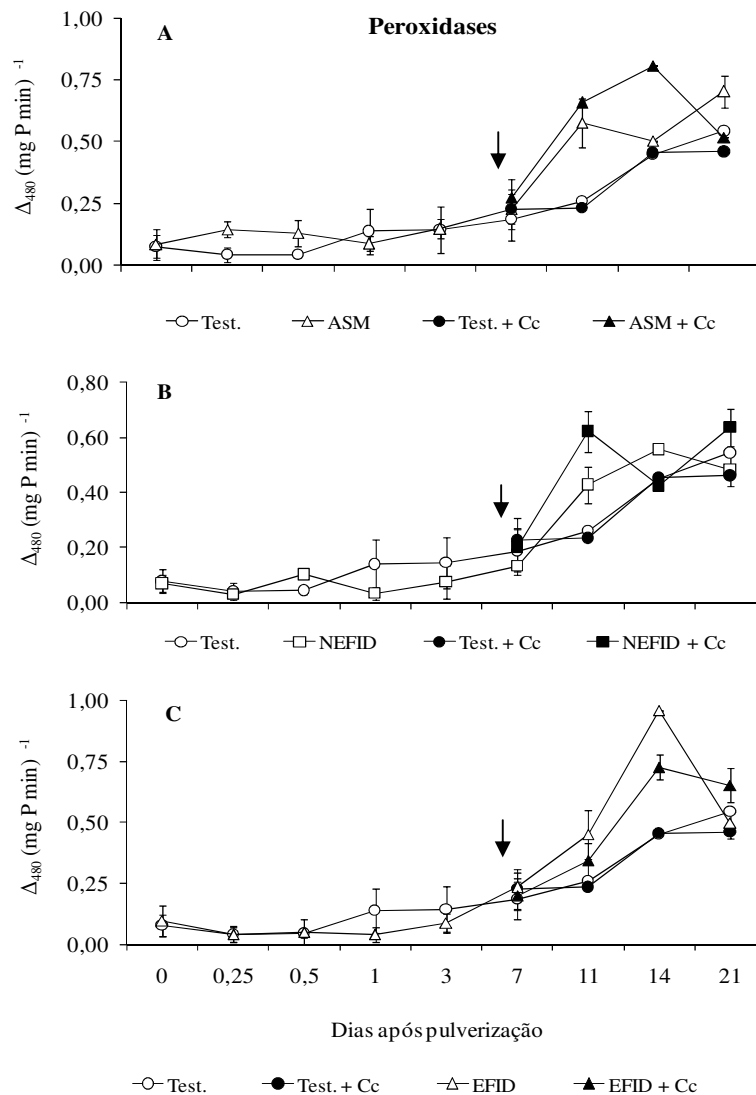
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Peroxidase

A atividade de peroxidase de todos os tratamentos manteve-se constante e semelhante entre si, até sete dias após a pulverização (Figura 1 A-C). A partir dos sete dias após a aplicação dos tratamentos, observou-se aumento na atividade da enzima, com exceção das testemunhas, inoculada com *C. coffeicola* (Cc) e absoluta, que mantiveram a tendência constante, com ligeiro aumento a partir deste período (Figura 1 A-C). A atividade de peroxidases em plantas tratadas com ASM + Cc foi maior aos 14 dias após aplicação dos tratamentos e 8 dias após a inoculação, com redução até aos 21 dias, enquanto o tratamento com ASM apresentou maior atividade aos 21 dias (Figura 1 A).

Em plantas de tomate tratadas com ASM, sem inoculação ou inoculadas, o pico de produção dessa enzima ocorreu aos nove dias após a pulverização (Ribeiro Júnior et al., 2004). No patossistema tomate X *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, o pico de produção de peroxidases foi observado aos 14 dias (Soylu et al., 2003).

Plantas tratadas com EFID, com e sem inoculação, tiveram pico de produção de peroxidases no 14º dia após a aplicação do extrato, porém, para o tratamento inoculado, essa atividade foi menor que aquela observada no tratamento sem inoculação (Figura 1 C). Mazzafera et al. (1989) observaram resultado inverso em cultivares de Catuaí e Mundo Novo infectadas com *Meloidogyne incognita*. Estes autores observaram que a atividade de peroxidase foi maior em tecidos infectados do que em tecidos não infectados. Pereira (2006) observou pico de atividade dessa enzima em plantas tratadas com extrato de casca de café ( $150 \text{ g.L}^{-1}$ ), aos 11 dias, com ou sem a inoculação de *C. coffeicola*.



**FIGURA 1** Atividade de peroxidases de guaiacol (POX), A, B e C, em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, NEFID e EFID, comparadas com a testemunha. Setas indicam inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc) 6 dias após pulverização. Barras de erros indicam desvio padrão da média.



Plantas de cafeeiro tratadas com NEFID e inoculadas tiveram pico de produção de peroxidases aos 11 dias após aplicação do tratamento e 5 dias após a inoculação. Sem inoculação, este tratamento apresentou maior atividade aos 14 dias após aplicação do tratamento (Figura 1 B).

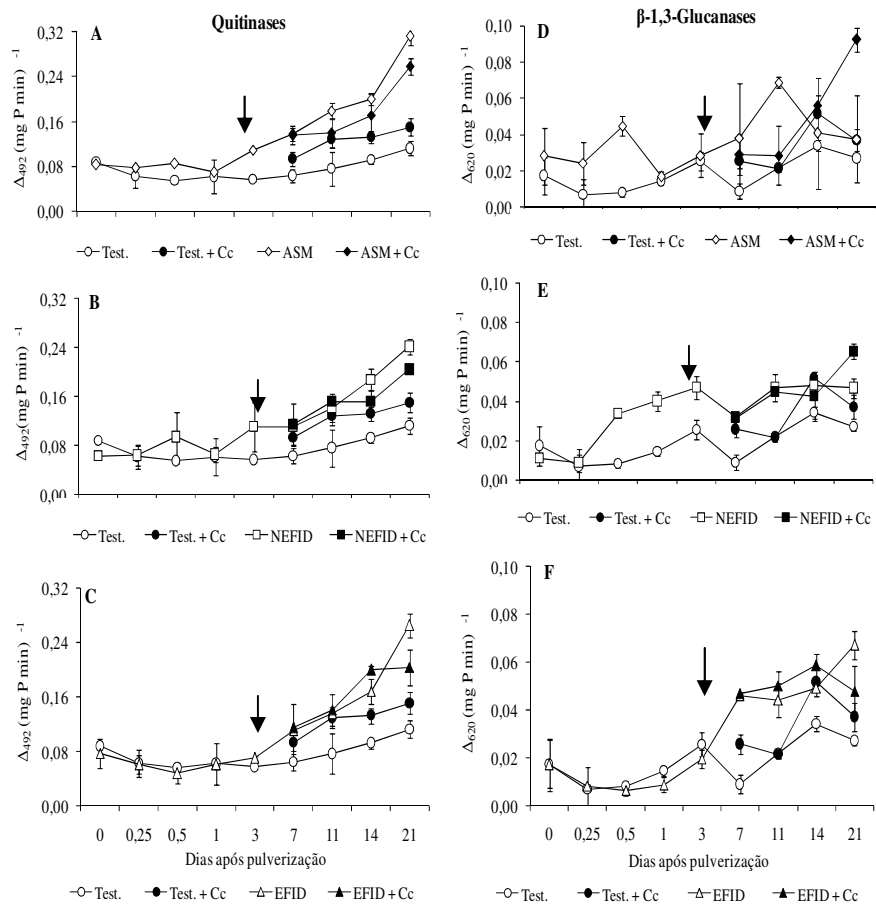
As peroxidases de plantas participam de diversos processos fisiológicos, dentre eles a formação de lignina. A atividade desta enzima é freqüentemente aumentada em resposta aos estresses, ao ataque de patógenos e aos tratamentos com indutores. A proteção celular contra reações oxidativas também é uma das principais funções das enzimas (Anterola & Lewis, 2002).

### **Quitinase e $\beta$ 1, 3 glucanase**

Plantas de cafeeiro pulverizadas com os tratamentos, sem inoculação de *C. coffeicola* (Figura 2 D-E), mostraram aumento significativo na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases em folhas, logo à primeira coleta, seis horas após a pulverização, em relação a plantas pulverizadas com água e sem inoculação, à exceção de plantas tratadas com EFID. Essa diferença permaneceu relativamente constante até 21 dias após a pulverização para o tratamento com NEFID. Para plantas pulverizadas com EFID, observou-se aumento na atividade a partir de 3 dias após a pulverização. Os tratamentos após a inoculação apresentaram aumento na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases até 21 dias após a pulverização dos tratamentos ou 15 dias após a inoculação, à exceção do tratamento com EFID inoculado, o qual apresentou maior atividade desta enzima aos 14 dias da pulverização e aos 8 dias da inoculação (Figura 2 D, E e F). No caso deste tratamento sem inoculação, a maior atividade foi observada aos 21 dias da pulverização (Figura 2 F). Esses resultados sugerem que as atividades incrementadas de  $\beta$ -1,3-glucanases, promovidas pelos eliciadores testados, acontecem principalmente nos primeiros dias após as pulverizações, sustentando-se, em alguns casos, até 21 dias.

Mecanismos de defesa podem ser induzidos em plantas nas quais faltam genes de resistência, por meio de inoculação de microrganismos não patogênicos, inoculações de patógenos restritos e compostos químicos (Kessman et al., 1994). Muitos oligossacarídeos, proteínas e glicoproteínas, originados de fungos e bactérias, podem funcionar como eliciadores não específicos, para induzir respostas de defesa em plantas que carreguem genes R não específicos (Nürnberger & Brunner, 2002).

As substâncias biológicas utilizadas neste trabalho foram preparadas com o intuito de se obter eliciadores heterogêneos a partir da fragmentação de folhas de cafeeiro infectado por *H. vastatrix* (EFID e NEFID), de forma semelhante à pesquisa de Cavalcanti et al. (2007) e Resende et al. (2007). Estes autores utilizaram extratos da fragmentação do caule de *Solanum lycocarpum* infectado pelo fungo causador da vassoura-de-bruxa *C. pernicioso* (VLA) e obtiveram respostas de proteínas PR em tomateiro e cacaueteiro inoculados com *X. vesicatoria* e *C. pernicioso*, respectivamente. A quitina é um polissacarídeo linear, composto de resíduos de 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosose (GlcNAc), em ligações  $\beta$ (1-4), e a quitosana é um polissacarídeo parcialmente N-acetilado derivado da quitina, composto por ligações  $\beta$ (1-4) de GlcNAc e 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -glucopiranosose (GlcN), são componentes de parede celular fúngica e são relatados como supressores de muitas doenças de planta, por induzir-lhes resistência (Benhamou et al., 1998; Ben-Shalon et al., 2002).



**FIGURA 2** Atividade de quitinases (CHI), A, B e C, e de β-1,3-glucanases (GLU), D, E e F, em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, NEFID e EFID, comparados com a testemunha. Setas indicam inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc) 6 dias após pulverização. Barras de erros indicam desvio padrão da média.

Plantas de cafeeiro pulverizadas com NEFID e EFID também mostraram aumento na atividade de quitinases em folhas. No entanto, para esta enzima, o aumento da atividade foi mais discreto que aquele observado para beta-1,3-glucanases. Não houve diferenças significativas da atividade da enzima,

proporcionada pelos tratamentos, NEFID e EFID, para as testemunhas, até 14 dias após a pulverização e 8 dias de inoculação. A partir deste dia, houve aumento significativo da enzima até 21 dias após a pulverização, tanto em tratamentos com inoculação quanto para tratamentos sem inoculação, culminando com a maior atividade em relação às testemunhas (Figuras 2 A-C).

Para plantas pulverizadas com ASM, observou-se que a atividade desta enzima se sobressaiu em relação às testemunhas, do 1º ao 21º dia de avaliação. Comportamento semelhante foi observado para plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com *C. coffeicola*. Observou-se aumento desde o 5º dia após a inoculação até o 15º (Figura 2 D). A participação de enzimas relacionadas à resistência foi evidenciada por Baysal et al. (2003), que relataram que plantas de tomate tratadas com ASM e inoculadas com *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* exibiram maior atividade de peroxidase aos 5 dias e de quitinase aos 2, 3, 5 e 7 dias após a inoculação com a bactéria. Esse aumento foi correlacionado com a resistência induzida nas plantas de tomate tratadas com ASM.

### **Lignina e fenóis totais**

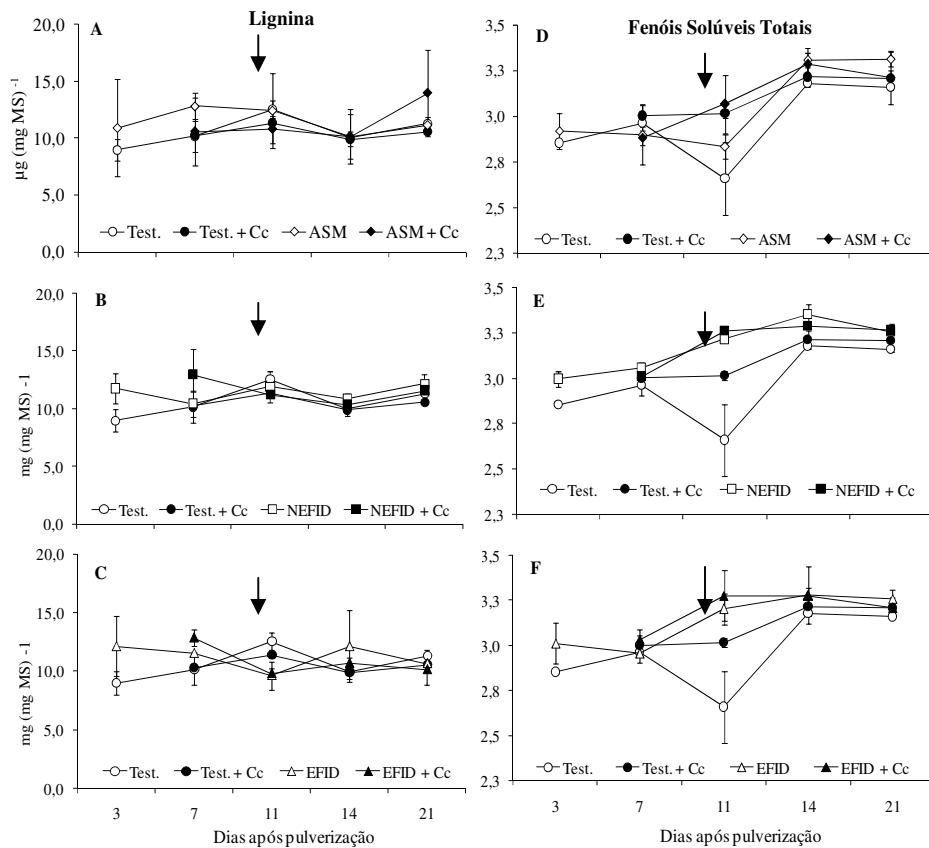
A lignina é uma macromolécula fenólica, altamente complexa, sendo o segundo composto mais abundante nos tecidos vegetais. Sua estrutura ainda não é totalmente conhecida, em função das dificuldades no processo de extração, mas acredita-se que ela seja originada da polimerização enzimática de monômeros de coniferil, sinapil e  $\rho$ -cumaril álcoois (Dence & Lin, 1992; Taiz & Zeiger, 1998).

Os compostos testados não proporcionaram diferença significativa para o teor de lignina solúvel em ácido em nenhuma das datas em que foram realizadas as coletas de tecidos (Figura 3), à exceção de uma leve tendência de

aumento na última coleta analisada, aos 21 dias, para o tratamento de ASM inoculado com *C. coffeicola* (Figura 3 A).

A lignina é acumulativa, por isso, quanto maior o estágio de desenvolvimento das plantas, maiores são os teores de lignina, principalmente em plantas lenhosas e perenes, como o café. Este composto, geralmente, é encontrado nos tecidos vegetais entre a parede celular e as células adjacentes. Estruturas lignificadas podem interromper o desenvolvimento fúngico em tecidos vegetais e atuar como barreira com resistência à penetração ou ao desenvolvimento destes organismos (Nicholson & Wood, 2001; Agrios, 1997; Pascholati & Leite, 1995; Misaghi, 1982; Hammerschmidt & Kuc, 1982; Ride, 1975).

Para fenóis totais, pode-se observar que os tratamentos com EFID e NEFID, inoculados e não inoculados com *C. coffeicola*, apresentaram maior atividade que as testemunhas inoculada e absoluta. Esta maior atividade ficou evidente aos 7 e 11 dias, para a formulação NEFID e aos 11 dias, para a formulação EFID (Figura 3 E, F). Os tratamentos com ASM não diferiram significativamente das testemunhas (Figura 3 C).



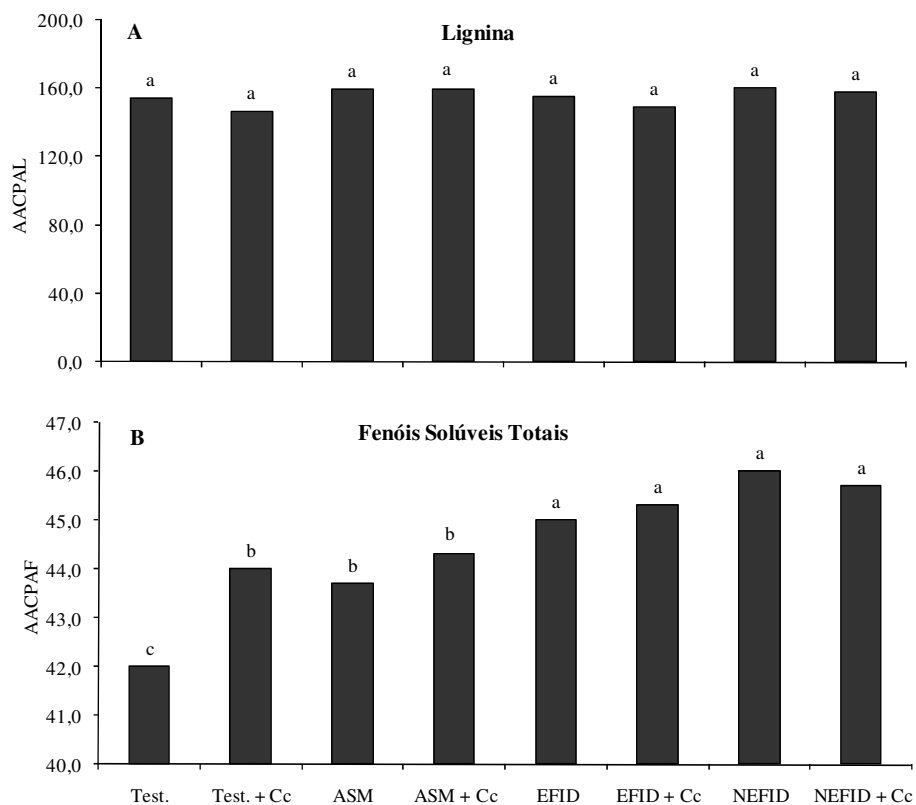
**FIGURA 3** Acúmulo de lignina solúvel em ácido tioglicólico ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$ ), A, B e C, e de fenóis solúveis totais ( $\mu\text{g de catecol mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$ ), D, E e F, em folhas de mudas de café, após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, EFID e NEFID, comparadas com a testemunha. Setas indicam inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc) 6 dias após pulverização. Barras de erros indicam desvio padrão da média.

Substâncias extraídas de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome inativados por autoclavagem e preparados em forma de filtrado aquoso induziram proteção contra o mesmo fungo em cafeteiros, com aumento dos níveis de compostos fenólicos e atividades de peroxidases e polifenoloxidasas (Maxemiuc-Naccache & Dietrich, 1985; Guzzo et al., 1987). Seguindo princípio semelhante, Cavalcanti et al. (2007) e Resende et al. (2007) utilizaram filtrado

aquoso de micélio de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer e extrato aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.) infectados por *C. perniciosa* e observaram a eficácia destes produtos na proteção de tomateiro e de cacauero infectado por *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin *et al.* e *Verticillium dahliae* Kleb., respectivamente.

Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para avaliação do acúmulo de lignina, ao final de 21 dias de experimento, entretanto, observou-se discreta tendência no aumento da macromolécula para os tratamentos com ASM e NEFID. Aos 21 dias, o teor de lignina foi cerca de 10% superior aos tratamentos com ASM e NEFID, em relação à testemunha absoluta e 15% em relação à testemunha inoculada (Figura 4 A).

Iriti & Faoro (2003) também observaram maior formação de lignina em função do tratamento com ASM, o que pode ser, juntamente com maior atividade das proteínas-PR, um dos principais mecanismos responsáveis pela resistência do feijoeiro contra *U. Appendiculatus*. Kuhn (2007) observou que a aplicação de ASM em feijoeiro causou aumento na síntese de lignina. Segundo o autor, este fato pode estar associado à redução da severidade de *X. axonopodis* pv *phaseoli*, em casa de vegetação e *Sclerotinia sclerotiorum* no campo.



**FIGURA 4** Área abaixo da curva do progresso do acúmulo de lignina - AACPAL (A) e da produção de fenóis – AACPPF (B) em folhas de mudas de cafeeiro, após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, EFID e NEFID comparadas com a testemunha. “Cc” indica inoculação com *Cercospora coffeicola* 7 dias após pulverização. Médias com mesma letra não diferem, pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

Para o acúmulo de fenóis totais, ao final do experimento, observou-se que os tratamentos com as formulações EFID e NEFID foram superiores aos demais tratamentos, não apresentando diferenças significativas entre si (Figura 4 B). As plantas tratadas com ASM, com e sem inoculação, foram estatisticamente semelhantes à testemunha inoculada e deferiram da testemunha absoluta (Figura 4 B).



O maior acúmulo de fenóis em folhas de mudas de cafeeiro pulverizadas com as formulações EFID e NEFID e inoculadas com *C. coffeicola* pode ser explicado pelo fato de os extratos de tecidos do cafeeiro serem ricos em compostos fenólicos (Ramirez, 1987), substâncias bioativas capazes de disparar reações de defesa do vegetal contra fatores externos. Compostos fenólicos são conhecidos como substâncias fungitóxicas e, em alta concentração nas células, podem ser oxidados a quinonas, constituindo-se em componentes de defesa do vegetal contra fatores externos (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Pascholati & Leite, 1994). Extratos aquosos de folhas de café infectadas por ferrugem e de casca de frutos de café (endocarpo, mesocarpo e exocarpo) demonstraram efeito protetor também contra mancha-de-phoma (Barguil et al., 2005). Por sua vez, extratos aquosos de lobeira demonstraram ser promissores na indução de resistência, em experimentos realizados com cacaueiro, tomate e cafeeiro (Ribeiro Júnior et al., 2004; Barguil et al., 2005; Amaral, 2005; Cavalcanti, 2006).

A partir dos resultados, pode-se concluir que as substâncias estudadas são capazes de promover o aumento na atividade das proteínas PR, peroxidase, quitinase e  $\beta$  1, 3 glucanase, além de aumentar os teores de fenóis totais em folhas de cafeeiros. Os resultados alcançados pela formulação NEFID a credenciam para utilização em trabalhos futuros em substituição ao EFID.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. 4<sup>th</sup>.ed. San Diego: Academic, 1997.
- AMARAL, D.R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ANTEROLA, A.M.; LEWIS, N.G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/ mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, v.61, p.221-294, 2002.
- BARGUIL, B.M.; RESENDE, M.L.V.; RESENDE, R.S.; BESERRA JÚNIOR, J.E.A.; SALGADO, S.M.L. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.535-537, 2005.
- BAYSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. **Plant Pathology**, v.52, p.747-753, 2003.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, v.204, p.153-168, 1998.
- BEN-SHALON, N.; AKI, C.; ARDI, R.; PINTO, R. Elicitation effects of chitin oligomers and chitosan sprayed on the leaves of cucumber (*Cucumis sativus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Israel Journal of Plant Sciences**, v.50, p.199-206, 2002.
- BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.128-134, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; OLIVEIRA, J.T.; SILVEIRA, J.A.; CARVALHO, C.P. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicioso* mycelium activates tomato defence response against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v.26, p.729-738, 2007.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; COSTA, J.B.C.; CARVALHO, C.P.S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1721-1730, 2006.

COLE, D. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection**, v.18, p.267-273, 1999.

DENCE, C.W.; LIN, S.Y. Introduction. In: LIN, S.Y.; DENCE, C.W. (Ed.). **Methods in lignin chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p.1-19.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.185-209, 2004.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.377-385, 1987.

HAMMERSCHMIDT, D.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v.20, n.1, p.61-71, 1982.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; PARKER, J.E. Deciphering plantpathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.177-193, 2003.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.151, p.171-180, 2003.

KESSMAN, H.T.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.439-459, 1994.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** 2007. 140p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

LOON, L.C. van. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.

LOON, L.C. van; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant**, 1999.

LOUWS, E.J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; JONES, J.B.; SHOEMAKER, P.B.; SAHIN, F.; MILLER, S.A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, v.85, p.481-488, 2001.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S.M.C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, v.8, p.185-190, 1985.

MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, W.; FERNANDES, J.A.R. Fenóis, peroxidases e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. **Bragantia**, v.48, p.131-142, 1989.

MISAGHI, I.J. Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions. Tucson. **University of Arizon**. 1982.

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

NICHOLSON, R.L.; WOOD, K.V. Phytoalexins and secondary products, where are they and how can we measure them? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, p.63-69, 2001.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.1-7, 2002.

- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.1-51, 1994.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap. 22, p.417-454.
- PEREIRA, R.B. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro**. 2006. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.
- RAMIREZ, J. Compuestos fenólicos em la pulpa de café. Cromatografia de papel da pulpa fresca de 12 cultivares de *Coffea arabica* L. **Turrialba**, v.37, p.317-323, 1987.
- RESENDE, M.L.V.; COSTA, J.C.B.; CAVALCANTI, F.R.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; CAMILO, F.R. Seleção de Extratos Vegetais para Indução de Resistência e Ativação de Respostas de Defesa em Cacaueiro contra a Vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.3, p.213-221, 2007.
- RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v.51, p.621-628, 2002.
- RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; PEREIRA, R.B.; ZACCARONI, A.B.; CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V. Lignificação induzida por extratos naturais e produtos comerciais em tomateiro infectado por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.261, 2004.
- RIDE, J.P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. **Physiological Plant Pathology**, London, v.5, n.2, p.125-128, 1975.
- SOYLU, S.; BAYSAL, O.; SOYLU, E.M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, v.165, p.1069-1075, 2003.

SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 38, n.7, p.1565-1571, July 1990.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDERMANNMERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. **Plant 'pathogenesis-related' proteins** 1993.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Plant physiology**. California: The Benjamin/Cummings, 1998. 559p.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase 1991.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.12, n.3/4, p.197-205, Dec. 1990.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, busca-se um modelo de sustentabilidade para a agricultura, no qual se utilize o mínimo de pesticidas possível para combater pragas e doenças. Assim, é necessário encontrar medidas alternativas de manejo fitossanitário compatíveis com a qualidade ambiental visada no manejo sustentável. Dentre as opções de manejo, incluindo tecnologias limpas, cita-se o uso de extratos vegetais possuidores de substâncias bioativas, capazes de atuar como indutores de resistência às doenças em plantas.

O grupo de pesquisa liderado pelo Prof. PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende busca alternativas baseadas em diversas formulações à base de extratos, em diferentes patossistemas, com o objetivo de potencializar os efeitos de extratos com efeito comprovado, como o caso da formulação EFID. Esta mesma formulação obteve, neste trabalho, uma mudança avaliada, granulometria reduzida, em que partículas extremamente finas deram origem ao NEFID ou a novo EFID, para obter melhores resultados, menores custos e a tornar cada vez mais comercial. Outra ação desenvolvida foi promover a mistura de formulações à base de extratos com produtos comerciais, como o ASM e micronutrientes, com vistas a obter produtos mais eficientes e ampliar seus efeitos em diferentes culturas. Com a realização deste trabalho, demonstrou-se que a nova formulação de EFID, NEFID, proporcionou resultados semelhantes aos obtidos por EFID, porém, com a utilização de menor quantidade de matéria-prima. Observou-se que algumas misturas apresentaram efeito sinérgico, como a mistura de EFID com sulfato de cobre ( $0,29 \text{ g.L}^{-1}$ ) e EFID com cloreto de Mn ( $0,435 \text{ g.L}^{-1}$ ).

No presente trabalho, a formulação com EFID demonstrou efeito protetor contra *Cercospora coffeicola* do cafeeiro e os mecanismos responsáveis por este efeito protetor basearam-se no aumento das atividades de proteínas PR

(peroxidase, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanases), além de aumento no teor de fenóis totais.

Apesar dos resultados promissores, torna-se necessária a realização de novos experimentos, variando as misturas com as formulações já disponíveis, como, por exemplo, outras fontes de cobre e manganês, além de maior número de aplicações e doses, outros nutrientes e testes em campo com plantas adultas.