



ANA CRISTINA ANDRADE MONTEIRO

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO MANEJO
DA FERRUGEM E CERCOSPORIOSE DO
CAFEIEIRO (*Coffea arabica*): ANÁLISES
BIOQUÍMICAS E MOLECULARES**

LAVRAS - MG

2014

ANA CRISTINA ANDRADE MONTEIRO

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA FERRUGEM E
CERCOSPORIOSE DO CAFEEIRO (*Coffea arabica*): ANÁLISES
BIOQUÍMICAS E MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Monteiro, Ana Cristina Andrade.

Indutores de resistência no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*) : análises bioquímicas e moleculares / Ana Cristina Andrade Monteiro. – Lavras : UFLA, 2014.

132 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. *Hemileia vastatrix*. 2. *Cercospora coffeicola*. 3. Controle alternativo. 4. qRT-PCR. 5. Atividade enzimática. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.73944

ANA CRISTINA ANDRADE MONTEIRO

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DA FERRUGEM E
CERCOSPORIOSE DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica*): ANÁLISES
BIOQUÍMICAS E MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 10 de outubro de 2014.

Ph.D. Sérgio Florentino Pascholati	USP- ESALQ
Dr. Rubens José Guimarães	UFLA
Dra. Maria Alves Ferreira	UFLA
Dr. Flávio H. Vasconcelos de Medeiros	UFLA

Ph.D. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

LAVRAS - MG

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força para dar mais um passo em minha caminhada.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização do doutorado, ao CNPq e a CAPES pela concessão de bolsa de estudos e ao INCT-Café por financiar a realização deste trabalho.

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

Aos meus pais, irmãos e sobrinha, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de participar e pelas valiosas sugestões.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela agradável convivência e atenção, durante o transcorrer do curso.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Pedro, Deila, Sandra Mathioni, Claudio, Adriene, Ingridy, Dario, Moisés, Bruno, Joyce, Stéfanny, Vanessa, Thaís, Camila Lage, Manoel, Sandra, Kátia, Josi, Eliane, Francislaine, Dayana, Marie, Camila, Marcelo, Rodolpho, Victor, Alexandre Vidal, Alexandre Ribeiro, Rosseane, Túlio, Roberto, Lucas e Aquilles, pela convivência e auxílio nos ensaios. Meu agradecimento especial ao Pedro, Deila e Sandra Mathioni, pelas orientações, ensinamentos e paciência.

A Agrichem, nas pessoas do Luís Yabase, Bruno e Heitor Daniel, pela parceria no experimento de campo.

Aos colegas Dario e Moisés e aos funcionários da InovaCafé, Sr. José Maurício, Alexandre e Agrimar (*in memoriam*), pela ajuda e ensinamentos no experimento de campo.

Ao professor Luciano Vilela Paiva, pelo uso do Laboratório Central de Biologia Molecular. Em especial aos funcionários Fabrício e Eliete, pela disponibilidade.

Aos demais colegas do departamento de Fitopatologia, pela convivência e amizade.

Meu agradecimento especial a todas as pessoas cujos nomes foram omitidos, mas que contribuíram para a realização deste trabalho. Afinal, não somos nada sozinhos.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

A ferrugem e a cercosporiose, causadas por *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*, respectivamente, são as principais doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil. Considerando-se a necessidade do desenvolvimento de produtos alternativos para o seu controle, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de fontes de fosfitos e de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica no controle destas doenças, em condições de casa-de-vegetação e de campo. Após isso, selecionaram-se o Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio) e o fosfito de manganês para estudar seus efeitos na interação cafeeiro-*H. vastatrix* e cafeeiro-*C. coffeicola*, respectivamente. Verificou-se que fontes de fosfitos e formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica proporcionaram controle da ferrugem e cercosporiose tanto em plantas de cafeeiro adultas quanto em mudas. Em condições de campo, observou-se que as associações de fontes de fosfitos e de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica com fungicida controlaram a ferrugem e cercosporiose, sendo mais eficaz quando comparado à aplicação dos produtos isoladamente, além de proporcionarem maior retenção foliar e maior produção. Nas análises bioquímica e molecular, comprovou-se que Greenforce CuCa induziu o aumento da transcrição dos genes *CaPRI*, *CaGT*, *LOX* e *PAL* e, também, proporcionou um incremento na atividade das enzimas peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônialiase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) em mudas de cafeeiro inoculadas e não inoculadas com *C. coffeicola*. Já o fosfito de manganês induziu respostas de defesa nas mudas de cafeeiro, pois aumentou a transcrição dos genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL* em plantas não inoculadas com o patógeno e, também, proporcionou um incremento na atividade das enzimas APX, SOD e PPO em plantas não inoculadas e inoculadas com *H. vastatrix*. Pelos resultados observados indica-se que o uso de fosfitos ou de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica pode ser utilizado no manejo de doenças do cafeeiro.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*. *Cercospora coffeicola*. Controle alternativo. qRT-PCR. Atividade enzimática.

GENERAL ABSTRACT

Rust and brown eye spot, caused by *Hemileia vastatrix* and *Cercospora coffeicola*, respectively, are the main fungal diseases of coffee plants in Brazil. Considering the necessity of developing alternative products for its control, we aimed in this work at evaluating the effect of phosphite sources and formulations based on by-products of coffee and citrus industry in the control of these diseases, under greenhouse and field conditions. Subsequently, we selected the Greenforce CuCa (formulation based on a by-product of the coffee industry) and manganese phosphite in order to study its effects over the coffee plant/ *C. coffeicola* and coffee plant/ *H. vastatrix* interactions, respectively. We verified that phosphite sources and formulations based on by-products of coffee and citrus industry provided control over rust and brown eye spot on adult coffee plants or on seedlings. Under field conditions, we observed that the associations of phosphite sources and formulation based on a by-product of the coffee industry with fungicide controlled rust and brown eye spot, being more effective when compared to the separate application of the products, in addition to providing higher foliar retention and higher yield. In the biochemical and molecular analyses, we proved that the Greenforce CuCa induced the increase in the transcription of *CaPRI*, *CaGT*, *LOX* and *PAL* genes and, also, provided an increment in the activity of enzymes peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO) in coffee seedlings inoculated and not inoculated with *C. coffeicola*. The manganese phosphite induced defense responses on the coffee seedlings, since it increased the transcription of *POX*, *CAT*, *GLU* and *PAL* genes in plants not inoculated with the pathogen and, also, provided an increment in the activity of enzymes APX, SOD and PPO in plants inoculated and not inoculated with *H. vastatrix*. With the results observed, we indicate that the use of phosphites or formulation based on a by-product of the coffee industry can be used in management coffee plant diseases.

Keywords: *Hemileia vastatrix*. *Cercospora coffeicola*. Alternative control. q-RT-PCR. Enzyme activity.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	A cultura do cafeeiro	11
2.2	Ferrugem do cafeeiro	12
2.3	Cercosporiose do cafeeiro	14
2.4	Mecanismos de Defesa Vegetal	15
2.5	Indução de Resistência	22
	REFERÊNCIAS	29
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	40
	ARTIGO 1 Produtos alternativos no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro	40
	ARTIGO 2 Formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira na indução de resistência do cafeeiro à cercosporiose... 69	
	ARTIGO 3 Fosfito de manganês na defesa do cafeeiro contra <i>Hemileia vastatrix</i> : análises bioquímica e molecular	106
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	132

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As espécies de cafeeiro *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* P. são as mais relevantes no Brasil, sendo de significativa importância para a economia nacional. Entretanto, a presença de algumas doenças como a ferrugem e a cercosporiose são fatores que limitam a produção de café.

A ferrugem alaranjada é causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., um parasita biotrófico exclusivo do gênero *Coffea*. Estima-se que as perdas na produção de café, em virtude desta doença, variem de 35% a 50% na ausência de medidas de controle. A cercosporiose ou "mancha-de-olho-pardo" é causada pelo fungo necrotrófico *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, sendo esta doença importante, por causar danos desde em mudas no viveiro até em plantios no campo (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Até o momento, não há cultivares de cafeeiro com resistência à *C. coffeicola*. Com relação à *H. vastatrix*, existem cultivares com resistência, porém essa é facilmente quebrada em razão do surgimento e alternância de raças do patógeno (MAIA et al., 2013). O principal método de controle dessas doenças no campo é o químico. Todavia, existem considerações sobre o uso de fungicidas na agricultura que, além de onerarem o custo de produção e serem prejudiciais ao homem e ao ambiente, podem levar ao surgimento de raças resistentes dos fungos (ZAMBOLIM; VALE, 2003). Dessa forma, há a necessidade de intensificar a investigação e o desenvolvimento de alternativas efetivas e soluções sustentáveis no controle de fitopatógenos (DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010).

Diante disso, a indução de resistência em plantas pode ser uma medida promissora de controle, pois envolve a ativação de mecanismos de defesa

latentes existentes nas mesmas, representados por barreiras bioquímicas ou estruturais, que aumentam a resistência geral em resposta a tratamentos com agentes bióticos ou abióticos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A utilização de fertilizantes foliares, como os fosfitos, tem ganhado importância no controle de doenças de plantas, uma vez que podem, além de atuar na nutrição, agir diretamente sobre o patógeno e, também, ativar a defesa natural das plantas (DALIO et al., 2012; JACKSON et al., 2000; NOJOSA et al., 2009). Outra opção que pode ser utilizada no manejo de doenças de plantas e vem despertando o interesse dos especialistas da área é o uso de formulações à base de extratos vegetais possuidores de substâncias bioativas, capazes de atuar como indutores de resistência (TOYOTA, 2008).

Dessa forma, objetivou-se avaliar formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira, formulações à base de subprodutos da indústria cítrica e fosfitos no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro, em condições de campo e em casa-de-vegetação, além de estudar seus efeitos na ativação de mecanismos envolvidos na resposta de defesa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do cafeeiro

O cafeeiro (*Coffea* sp.) pertence à família Rubiaceae e é amplamente cultivado em países tropicais. Dentre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* P. são as mais importantes economicamente. Acredita-se que as primeiras sementes de café foram introduzidas no Brasil, durante as primeiras décadas do século XVII, das Guianas Francesas para o norte do país, seguindo, então, para as regiões localizadas ao sul (ECCARDI; SANDALJ, 2003).

O Brasil destaca-se como principal produtor e exportador de café, sendo esta cultura importante fonte de divisas para o país. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2014), a estimativa para a produção nacional de café beneficiado é de 45,1 milhões de sacas de 60 quilos, na safra de 2014. Este resultado representa uma redução de 8,16% quando comparado com a produção obtida na safra anterior. Tal redução se deve à forte estiagem verificada nos primeiros meses de 2014 e à inversão da bienalidade em algumas regiões produtoras.

Para que o Brasil continue a liderar a produção e a exportação do café, é necessário o uso de cultivares melhoradas, a modernização das técnicas de cultivo, além do controle fitossanitário. Com relação aos problemas fitossanitários, as principais doenças são a ferrugem, a cercosporiose, a antracnose dos frutos, ainda não presente no Brasil, e a mancha de Phoma, doenças cujos agentes etiológicos são os fungos *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge e *Phoma* spp., respectivamente, além da mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e as galhas nas raízes, ocasionada pelos

nematoides do gênero *Meloidogyne* (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

2.2 Ferrugem do cafeeiro

A ferrugem alaranjada é considerada uma das doenças mais impactantes do cafeeiro, cuja ocorrência é verificada em todas as regiões produtoras de café do mundo. Pode levar a perdas de 30 a 50% na produtividade de café, se nenhuma medida de controle for aplicada. Seu agente patogênico, o fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, estabelece uma interação biotrófica com o hospedeiro e é totalmente dependente de células vivas das plantas para crescer e se reproduzir (AZINHEIRA et al., 2010; NUNES et al., 2009; RAMIRO et al., 2009).

O fungo se desenvolve na superfície abaxial foliar, quando há condições de umidade e temperatura propícias para a germinação dos urediniósporos (SILVA; GUERRA-GUIMARÃES; NICOLE, 2005). O início do estágio uredinial de *H. vastatrix* em folhas de café envolve eventos específicos, incluindo formação de apressório, hifa de penetração e haustórios (DINIZ et al., 2012; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Os sintomas da doença se iniciam na forma de manchas cloróticas translúcidas com 1 a 3 mm de diâmetro na face abaxial do limbo foliar que podem atingir até 2 cm de diâmetro. Na face abaxial, desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração amarelo-alaranjada, formadas por urediniósporos do patógeno (COSTA; ZAMBOLIM; RODRIGUES, 2007). Uma única folha pode conter centenas de pústulas que podem coalescer, cobrindo completamente a folha. As lesões, com o progresso da doença, aumentam de tamanho, formando uma área necrótica central com reduzida produção de esporos (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

Os principais prejuízos ocasionados pela ferrugem alaranjada consistem na redução da área foliar, em virtude da formação de lesões e queda precoce das folhas, causando a seca dos ramos e provocando, gradualmente, a deformação das plantas. A desfolha acarreta em redução do florescimento, da frutificação e perda de vigor das plantas, reduzindo, conseqüentemente, a produtividade e a qualidade dos frutos (MATIELLO et al., 2002).

Para minimizar os prejuízos causados por esse fungo, o controle químico, por meio do uso de fungicidas cúpricos e sistêmicos, tem se mostrado eficiente. Entretanto, o elevado custo da aplicação dos fungicidas e os danos causados ao meio ambiente têm motivado a busca de novas medidas de controle, como a obtenção de cultivares resistentes (WALLER; BIGGER; HILLOCKS, 2007; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

O desenvolvimento de cultivares de cafeeiros com resistência durável representa um desafio para os pesquisadores da área de melhoramento genético, em função do surgimento e alternância de raças do patógeno, assim como a ocorrência de raças complexas que ilustram o potencial evolutivo da população de *H. vastatrix* (CABRAL et al., 2009; MAIA et al., 2013). Os mecanismos que conduzem ao surgimento de raças de *H. vastatrix* ainda não foram completamente elucidados. Como a fase sexual do fungo, ainda, não foi encontrada, considera-se que a mutação seja o principal mecanismo responsável pela criação de variabilidade no fungo e a pressão de seleção exercida pelos genes de resistência do hospedeiro responsável pelo aumento de mutantes virulentos na população (VÁRZEA; MARQUES, 2005).

Assim, frente aos prejuízos provocados pela ferrugem à lavoura cafeeira, além do controle por meio do melhoramento genético, é necessário buscar outras formas alternativas do controle da ferrugem, como a indução de resistência.

2.3 Cercosporiose do cafeeiro

A cercosporiose, conhecida por “mancha-de-olho-pardo” ou “olho-de-pomba”, causada pelo fungo necrotrófico *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke, é uma das doenças mais antigas do cafeeiro. Atualmente, sua ocorrência está presente em quase todas as regiões cafeeiras do Brasil e do mundo, ocasionando perdas na produtividade, além de afetar o tipo e a qualidade do café produzido (CARVALHO; CHALFOUN, 1998; CARVALHO; CUNHA; MOURA, 2008; GARCIA JÚNIOR et al., 2003).

Os sintomas da cercosporiose ocorrem nas folhas e nos frutos. Nas folhas, é caracterizado por manchas circulares, de coloração castanho-claro a escuro, com centro branco-acinzentado, quase sempre envolvidas por um halo amarelo, dando à lesão aspecto de olho. No centro das lesões, em estágio mais avançado, geralmente, são observadas pequenas pontuações pretas, que constituem as estruturas de frutificação do fungo. Nos frutos, as lesões surgem próximo à maturação, caracterizadas por lesões deprimidas, de coloração marrom ou arroxeadas. Tais lesões tornam-se escuras e ressecam a polpa, dificultando o processo de despulpamento. Também, a maturação do fruto é acelerada, aumentando o número de grãos chochos e sua queda prematura (MATIELLO et al., 2002; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

As condições ideais para o desenvolvimento de *C. coffeicola* são alta umidade relativa e temperaturas amenas. Além disso, alta luminosidade e alta carga pendente, também, contribuem para o progresso da doença. Quando a planta tem alta carga pendente, os frutos drenam grande parte dos nutrientes das folhas para completar seu desenvolvimento e, assim, a folha fica mais suscetível à doença (ZAMBOLIM; VALE, 2003). Em condições de viveiro, a incidência do fungo é favorecida por excesso de irrigação ou por deficiência hídrica, desequilíbrio nutricional e insolação. Por conseguinte, as plantas apresentam

desfolha intensa, tornando-se raquíticas e impróprias ao plantio (BOTELHO et al., 2005; GARCIA JÚNIOR et al., 2003; POZZA et al., 2001).

A alta luminosidade tem importância no desenvolvimento da doença, pois na presença de luz, a cercosporina, toxina produzida por espécies do gênero *Cercospora*, torna-se ativa e capaz de reagir com outras moléculas. O principal alvo de reação é o oxigênio, que, ao reagir com a cercosporina, é convertido em espécies ativas de oxigênio, altamente tóxicas, podendo interagir e degradar, em uma “cascata bioquímica”, moléculas como DNA e proteínas e, também, danificarem as membranas celulares do hospedeiro (BERESTETSKIY, 2008; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005).

As medidas de controle da doença de caráter preventivo incluem cuidados na formação das mudas, procurando-se controlar a irrigação, a luminosidade e a utilização de substratos nutricionalmente equilibrados, com boas propriedades físicas. O controle químico da doença é realizado por meio de aplicações de fungicidas protetores cúpricos alternados com fungicidas sistêmicos. São bastante utilizados os fungicidas dos grupos químicos triazóis e estrobirulinas, visando ao controle simultâneo da cercosporiose e ferrugem alaranjada (MATIELLO et al., 2002; PEREIRA, 2006). Porém, outras formas de controle vêm sendo testadas, como a indução de resistência, que tem despontado como uma prática promissora no controle de *C. coffeicola* (PATRÍCIO et al., 2007; RIBEIRO JÚNIOR, 2008; TOYOTA, 2008).

2.4 Mecanismos de Defesa Vegetal

Para se defenderem contra o ataque de patógenos e insetos, as plantas são equipadas com barreiras estruturais e bioquímicas constitutivas, bem como um sistema de defesa induzível (JONES; DANGL, 2006; MONTESANO; BRADER; PALVA, 2003).

A percepção de patógenos pelas plantas envolve o reconhecimento de moléculas eliciadoras patogênicas ou originadas da injúria na planta (DURRANT; DONG, 2004). Com isso, ocorrem numerosas mudanças celulares e a ativação de cascatas de sinalização na membrana plasmática, que leva à indução de redes interligadas de moléculas sinalizadoras, tais como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico, etileno e óxido nítrico, para a rápida formação de respostas de defesa com o objetivo de limitar ou inibir a dispersão do patógeno na planta (HARRISON; BALDWIN, 2004).

Os principais tipos de resistência em plantas são a resistência local e a resistência induzida, que pode ser dividida em resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR). A resistência local, ou resposta de hipersensibilidade (HR), apresenta-se como um sistema de defesa localizado, caracterizado pela rápida necrose das células nas proximidades do local de invasão dos patógenos. As células vegetais necróticas não são as únicas responsáveis pela contenção do desenvolvimento do patógeno. Nelas ocorre o acúmulo de metabólitos tóxicos, como as fitoalexinas. Além disso, as células necróticas fornecem eliciadores secundários, os quais estimulam mecanismos de defesa nas células vegetais nas proximidades do local de infecção, como maior produção de calose, deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular na célula infectada (KEEN, 1990; SILVA et al., 2002).

As plantas são capazes de ativar diferentes tipos de resistência induzida, dependendo do organismo ou indutor que interage com a planta. Assim, SAR e ISR são fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes. Na SAR, a resistência se desenvolve de forma sistêmica em resposta a patógenos que causam reação de hipersensibilidade ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico. Nesta, a resistência expressada é mediada pelo AS, sendo efetiva contra um amplo espectro de patógenos, e está associada com a

produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRs). Na ISR, a sinalização é mediada pelo ácido jasmônico e etileno, sem envolver a produção de proteínas PRs (DURRANT; DONG, 2004; LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; MÉTRAUX, 2007).

Após o reconhecimento do patógeno, a primeira resposta de defesa da planta é a explosão oxidativa, que corresponde à geração de espécies ativas de oxigênio (EAOs) (H_2O_2 , $O^{\cdot -}$, OH^{\cdot}). As EAOs ocorrem, normalmente, no metabolismo celular, porém, quando acumuladas, tornam-se tóxicas à célula. Plantas sob estresse, geralmente, usam um complexo sistema de defesa constituído de antioxidantes e um diversificado leque de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutathione-redutase e ascorbato peroxidase (APX). Estas enzimas são utilizadas para estabilizar as EAOs e proteger as células dos danos oxidativos (HOSSAIN; UDDIN, 2011; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

O aumento dos níveis de EAOs ativa a síntese de ácido salicílico. Ao mesmo tempo, o ácido salicílico potencializa a produção de EAOs. Portanto, a explosão oxidativa não está confinada somente à HR macroscópica local, uma vez que explosões oxidativas secundárias podem ocorrer nos tecidos distantes, causando micro-HR's e conduzindo à resistência sistêmica adquirida, que irá ativar a expressão de genes de defesa. Assim, a ocorrência de HR e SAR é dependente da cascata de sinalização derivada da explosão oxidativa, que, por sua vez, é um evento inicial na resposta da planta contra a invasão do patógeno (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009; ZURBRIGGEN; CARRILLO; HAJIREZAEI, 2010).

O papel de fitormônios na regulação da defesa induzida está bem estabelecido. O ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno são reconhecidos como chaves para a regulação das vias de sinalização de defesa (GRANT; LAMB, 2006; POZO; LOON; PIETERSE, 2004). Embora haja exceções, pode-

se afirmar que patógenos biotróficos ou hemibiotróficos são mais sensíveis às defesas induzidas, mediadas pelo ácido salicílico, enquanto patógenos necrotróficos e insetos são mais sensíveis às defesas mediadas pelo ácido jasmônico e etileno (GLAZEBROOK, 2005; PARK et al., 2007).

Em relação às proteínas PRs, estas se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou em resposta ao tratamento com determinados compostos químicos ou a outros tipos de estresse. São classificadas em 17 famílias diferentes e muitas delas possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (LOON; REP; PIETERSE, 2006).

A proteína PR-1 desempenha papel central na regulação da SAR, pois ativa a sinalização da via do AS, que irá induzir a expressão de genes de defesa, inclusive, outras proteínas PRs (FU; DONG, 2013; LOON; REP; PIETERSE, 2006). Dentre as proteínas PRs, encontram-se hidrolases, como as β -1,3-glucanases (PR-3, PR-8 e PR-11) e quitinases (PR-2), que têm sido relatadas, principalmente, como inibidoras do crescimento fúngico, pois são capazes de degradar componentes das paredes celulares de muitos fungos (LOON; REP; PIETERSE, 2006).

As peroxidases são outra importante classe de proteínas PRs, que pertencem à família PR-9 e participam de vários processos fisiológicos importantes. Catalisam a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina (LOON; STRIEN, 1999). Essas enzimas, também, estão envolvidas na limpeza de EAOs e na oxirredução de vários substratos, usando peróxido de hidrogênio (KAWAOKA et al., 2003).

Quanto à formação de lignina e compostos fenólicos, estes são formados a partir do metabolismo dos fenilpropanoides. Este metabolismo inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas diversas

combinações (BOATRIGT et al., 2004). A biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas, dentre elas a fenilalanina amônia-ase (PAL), que catalisa a conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico, resultando em fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina, que podem conferir maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001).

A partir do ácido transcinâmico são produzidos diversos fenilpropanoides simples, por meio de uma série de reações de hidroxilação, metilação e desidratação, tais como os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e as cumarinas simples, além dos ácidos benzoico, β -hidroxibenzoico e salicílico (DIXON; PAIVA, 1995; VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009).

A conversão do ácido transcinâmico a ácido benzoico pode envolver a β -oxidação, sintetizando substâncias intermediárias antes de formar o ácido benzoico. O ácido benzoico, por meio da enzima ácido benzoico-2-hidroxilase, é convertido em ácido salicílico, que pode ser conjugado à glicose pela ação da salicilato glucosil transferase, formando o ácido salicílico glicosilado (VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009).

Outra importante enzima de defesa é a polifenol oxidase (PPO), que está relacionada à oxidação de compostos fenólicos, gerando quinonas, que são tóxicas aos organismos invasores. Além disso, esta enzima tem sido associada à lignificação, pois forma ligações cruzadas entre grupos fenólicos e proteínas de parede, pectinas e outros polímeros (MAYER; STAPLES, 2002; MENDONÇA; GUERRA, 2003).

Na via do ácido jasmônico, o primeiro substrato é o ácido linoleico. Por meio da via do octadecanoide, o ácido linoleico é, então, convertido a ácido jasmônico pela ação de diversas enzimas, como a lipoxigenase (LOX) e a aleno óxido sintase (PROST et al., 2005; VELLOSILO et al., 2007).

Na natureza, as plantas lidam com a simultânea ou a subsequente invasão por diferentes patógenos ou insetos, que podem influenciar na resposta

de defesa induzida da hospedeira (STOUT; THALER; THOMMA, 2006). Assim, as plantas precisam de mecanismos de regulação para se adaptar de forma eficaz às mudanças em seu ambiente. Este mecanismo de regulação é conhecido como *cross talk* entre as vias de sinalização de defesa, que permite que a planta ajuste sua resposta de defesa aos invasores. Interações de sinalização podem ser mutuamente antagônica ou sinérgica, resultando em resultados funcionais negativos ou positivos (BARI; JONES, 2009; BOSTOCK, 2005; KOORNNEEF; PIETERSE, 2008).

Estudos têm mostrado que, para um número de genótipos de café, a resistência a *H. vastatrix* é expressa por uma grande liberação de peróxido de hidrogênio, uma rápida e localizada morte da célula vegetal associada com a restrição do crescimento dos fungos, além do aumento de compostos fenólicos e da atividade de enzimas de defesa (DINIZ et al., 2012; GUERRA-GUIMARÃES et al., 2009; RAMIRO et al., 2009; SILVA et al., 2002, 2008).

Durante a resistência local na interação cafeeiro-*H. vastatrix*, foi observada a ocorrência de HR, além do aumento da atividade da PAL, do acúmulo de compostos fenólicos e da lignificação da parede celular (SILVA et al., 2002). Guzzo e Martins (1996) observaram o aumento da atividade de quitinases e β -1,3-glucanases. Silva et al. (2008) demonstraram que, na interação incompatível entre cafeeiro e *H. vastatrix*, ocorreram dois picos da atividade da peroxidase. O primeiro pico ocorreu antes ou no início da morte celular, sugerindo o envolvimento desta enzima na HR. O segundo pico pode estar relacionado com a lignificação do tecido hospedeiro, que ocorreu por volta do quinto ao sétimo dia após a inoculação.

Ramiro et al. (2009) observaram na interação incompatível entre cafeeiro e *H. vastatrix* uma elevada geração de peróxido de hidrogênio e aumento da transcrição de genes relacionados à patogênese. Enquanto, também, em interação incompatível, Diniz et al. (2012) observaram que o crescimento do

patógeno parou, após sua penetração pelo estômato, formando poucos haustórios, resultando em indução de HR, acúmulo de fenóis e formação de calose. Além disso, foi observada a expressão de genes envolvidos nas vias do ácido salicílico e do ácido jasmônico.

Em estudo realizado por Guzzo, Harakava e Tsai (2009), por meio da técnica de hibridização subtrativa por supressão, foram detectados genes expressos em cafeeiro resistente à *H. vastatrix*. Foram encontrados genes envolvidos em diversos processos relacionados à resistência de plantas contra fitopatógenos, como: formação de EAOs, HR, morte celular programada, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese e metabolismo de lipídeos. Pelos estudos realizados possibilitou-se obter um perfil dos mecanismos e respostas de defesa associadas à SAR.

Recentemente foi publicado um estudo sobre as rotas de defesa ativadas em cafeeiro resistente ao bicho-mineiro. Foi observado, por meio da técnica de microarranjo, que plantas resistentes diferem no perfil de expressão gênica antes mesmo do ataque do inseto, indicando que a defesa já está ativada como um mecanismo tipo *priming*. Foram observados, também, genes envolvidos na limpeza de EAOs e no metabolismo do ácido linoleico e dos fenilpropanoides (CARDOSO et al., 2014). Até o momento, não há cultivares de cafeeiro com resistência à *C. coffeicola*. Entretanto, verifica-se que patógenos necrotróficos e insetos são mais sensíveis às defesas mediadas pelo ácido jasmônico e etileno, e como *C. coffeicola* é um patógeno necrotrófico, acredita-se que, possivelmente, cafeeiro resistente à cercosporiose apresentaria respostas semelhantes às encontradas nas rotas de defesa ativadas em cafeeiro resistente ao bicho-mineiro.

Assim, após o esclarecimento dos aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos na resistência de plantas, torna-se promissor o controle de doenças,

por meio da ativação dos mecanismos de defesa, utilizando-se de produtos bióticos ou abióticos que ativem a defesa da planta.

2.5 Indução de Resistência

Certos compostos naturais ou sintéticos estimulam respostas de defesa semelhantes às observadas em interações incompatíveis (DANIEL; GUEST, 2006). Estes compostos são conhecidos como indutores de resistência. Desse modo, o uso de substâncias ou organismos indutores de resistência é uma alternativa no controle de doenças de plantas. A resistência induzida consiste na ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta, que pode ser um fenômeno local ou sistêmico e é efetivo contra uma ampla gama de patógenos (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Os indutores de resistência, na maioria das vezes, não apresentam ou apresentam baixa toxidez direta sobre patógenos, mas atuam como moléculas sinalizadoras de respostas de defesa (DURRANT; DONG, 2004). Ao serem reconhecidas pelas células vegetais induzem a expressão de genes que codificam a síntese de compostos de resistência, impedindo ou dificultando o estabelecimento e/ou desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, reduzindo os sintomas da doença (MÉTRAUX, 2001).

Cavalcanti et al. (2006) e Resende et al. (2004) mencionaram que a resistência induzida em plantas pode ocorrer por meio do tratamento com eliciadores de origem biótica (extratos vegetais, microrganismos ou parte desses) ou abiótica (substâncias químicas). Assim, avanços nas pesquisas envolvendo indução de resistência em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente (RESENDE et al., 2006b).

O acibenzolar-S-metil (ASM) é um indutor de resistência abiótico, disponível comercialmente, pertencente ao grupo benzotriazolozole, sendo um protetor de plantas eficiente na indução de resistência e comercializado como Bion[®] (CAVALCANTI et al., 2006). Age como ativador dos mecanismos de defesa de plantas, conferindo proteção sistêmica contra diferentes patógenos, em diversas culturas, dentre elas o cafeeiro (GUZZO et al., 2001; MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002; PATRÍCIO et al., 2007).

Em cafeeiro, o produto ASM induziu resistência local e sistêmica à ferrugem e aumentou a atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase nos tecidos foliares (GUZZO et al., 2001, 2004). Marchi, Borges e Resende (2002) observaram a eficácia do ASM em reduzir os sintomas da ferrugem alaranjada em cafeeiro 'Catuaí Vermelho'. Na interação *Coffea arabica* - *Cercospora coffeicola*, a SAR, também, pôde ser ativada pelo tratamento prévio das plantas suscetíveis com o indutor ASM, acarretando uma diminuição dos sintomas da doença em 55 % (PATRÍCIO et al., 2007).

Esse efeito indutor do ASM contra a ferrugem, também, foi confirmado por Nojosa (2003), quando o tratamento com ASM proporcionou uma percentagem de controle da ferrugem de 56,82% em folhas destacadas e de 52% em mudas de cafeeiro. Além disso, plantas tratadas com ASM apresentaram um aumento nos teores de clorofila *a* e *b*, nos teores de lignina e na atividade de peroxidase.

Nardi et al. (2006), utilizando-se das técnicas de PCR quantitativo em tempo real e de microarranjo, observaram que a pulverização com ASM em cafeeiro induziu a expressão de genes de defesa, típicos da resistência sistêmica adquirida. A principal resposta nas folhas foi a expressão de genes relacionados à explosão oxidativa e ao aumento de barreiras físicas e químicas. Guzzo, Harakava e Tsai (2009), utilizando a técnica de hibridização subtrativa por supressão, também, identificaram genes relacionados à SAR em plantas de

cafeeiro suscetíveis após o tratamento com ASM. Os genes encontrados estavam envolvidos em diversos processos relacionados à resistência contra fitopatógenos como: formação de EAOs, HR, morte celular programada, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese e metabolismo de lipídios.

Outra forma de controle de doenças de plantas que demonstra potencial para induzir resistência é a utilização de extratos vegetais e óleos (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012). Produtos naturais, como formulações à base de subprodutos da cadeia produtiva do café, extratos de folhas ou de casca dos frutos de café, vêm despertando o interesse de especialistas (AMARAL, 2005; RESENDE et al., 2004). Elicidores presentes nas formulações indutoras de resistência fazem com que ocorram alterações bioquímicas que ativam o sistema de defesa, com consequente resposta protetora nas plantas (PESSOA et al., 2007).

Resende et al. (2006a, 2007) solicitaram o depósito de patente para formulações de produtos à base de extratos de folhas de cafeeiro e cascas de frutos de cafeeiro. Tais formulações têm como principal matéria-prima folhas de cafeeiro que caem no solo (por causa de doenças, colheita de frutos, podas e outros estresses) e subprodutos do beneficiamento dos grãos (endocarpo, mesocarpo e exocarpo). Estas podem ser utilizadas para o controle de doenças no cafeeiro, cacaueteiro, algodoeiro, tomateiro e em eucalipto (AMARAL, 2005; BARGUIL et al., 2005; COSTA et al., 2014; MEDEIROS et al., 2009; RESENDE et al., 2004; SILVA et al., 2013).

A utilização de formulações à base de casca de café e de folhas de cafeeiro infectadas com *H. vastatrix* proporcionou proteção de mudas de café contra os patógenos *Phoma costarricensis* e *Cercospora coffeicola*. 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 (BARGUIL et al., 2005; RESENDE et al., 2004). Santos et al. (2007) observaram, 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, quando comparada à testemunha. Para a 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. Esses indutores, também, promoveram aumentos na atividade de peroxidases e no teor de lignina (AMARAL, 2005). Costa et al. (2014) observaram que formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira proporcionaram 50% e 60% de controle da ferrugem e cercosporiose em cafeeiro adulto.

Em estudos com formulação à base de extrato de folha de café foi observado controle eficaz da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro. Alterações transcricionais em folhas de tomateiro eliciados com este indutor foram avaliadas, por meio da técnica de microarranjo, na qual se observou aumento de genes associados aos processos de defesa de plantas. Foi observado, também, que a aplicação da formulação proporcionou o aumento na atividade de peroxidase, β -1,3-glucanase e quitinase em folhas de tomateiro (MEDEIROS et al., 2009).

Formulações à base de subprodutos da indústria cítrica, também, vêm sendo utilizadas no controle de doenças em cafeeiro. Santos et al. (2007) observaram que extrato comercial de biomassa cítrica proporcionou 43% de controle da incidência da mancha-de-Phoma. Já, Costa et al. (2014) observaram que formulação à base de subprodutos da indústria cítrica adicionado de fosfito de potássio proporcionou, em média, 61% e 49% de controle da ferrugem e cercosporiose em cafeeiro adulto, durante dois anos de experimento.

Os nutrientes minerais influenciam na severidade de doenças. Vários micronutrientes são cofatores de enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanoides, principal rota de síntese de lignina e fitoalexinas (GRAHAM;

WEBB, 1991). Entre os produtos comercializados como fertilizantes foliares ricos em micronutrientes, os fosfitos (Phi) são aqueles mais frequentemente relatados na literatura como indutores de respostas de defesa em plantas (DANIEL; GUEST, 2006; ESHRAGHI et al., 2011; JACKSON et al., 2000; NOJOSA et al., 2009; PILBEAM et al., 2011).

Os Phi são sais inorgânicos originados do ácido fosforoso (H_3PO_3), que têm sido formulados com sais de manganês, cobre ou zinco. Nos EUA, os Phi são registrados para o controle de oomicetos, enquanto no Brasil são registrados como fertilizantes foliares, apresentando efeito na redução da intensidade de doenças em diversas culturas (DALIO et al., 2012; KING et al., 2010; RESENDE et al., 2008).

Estudos sugerem que os Phi apresentam complexo modo de ação, incluindo efeito direto sobre o patógeno e efeito indireto, estimulando respostas de defesa do hospedeiro (DALIO et al., 2013). Os efeitos diretos incluem a inibição do crescimento do patógeno e a redução ou alteração do seu metabolismo (KING et al., 2010). O efeito indireto envolve o estímulo de mecanismos de defesa da planta, tais como o aumento da produção de fitoalexinas e EAO's, a indução de proteínas PRs e o reforço da parede celular (DELIPOULOS et al., 2010; ESHRAGHI et al., 2011; PILBEAM et al., 2011).

Existem relatos que comprovam a eficácia de produtos à base de Phi no manejo de doenças em cafeeiro. Nojosa et al. (2009) observaram redução da severidade da mancha-de-Phoma em mudas de cafeeiro pulverizadas com fosfito de potássio, assemelhando-se ao controle proporcionado pelo fungicida padrão. Foi observado, também, que a aplicação de fosfitos nas mudas de cafeeiro proporcionou acúmulo de lignina e de fenóis solúveis (NOJOSA, 2003).

Mudas de cafeeiro pulverizadas com Phi de potássio, de manganês e de cobre e inoculadas com *C. coffeicola* apresentaram maiores atividades das enzimas de defesa peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases, além do

incremento nos teores de fenóis solúveis totais (RIBEIRO JÚNIOR, 2008; TOYOTA, 2008).

Em condições de campo, foi observado que pulverizações de Phi de potássio, manganês e zinco em cafeeiros adultos por dois anos consecutivos proporcionaram, em ano de alta produção, reduções de 30% e 25%, respectivamente, na severidade da ferrugem e cercosporiose, enquanto no ano de baixa produção, reduções respectivas de 53% e 32% na severidade da ferrugem e cercosporiose foram alcançadas (RIBEIRO JÚNIOR, 2008). Pulverizações com fosfito de cobre, em ano de baixa produção, proporcionaram redução de 81% na severidade da ferrugem, semelhante ao controle obtido com pulverizações com o fungicida epoxiconazol + piraclostrobin (TOYOTA, 2008). Pulverizações com fosfito de manganês reduziu em média 60% e 45% a severidade da ferrugem e da cercosporiose em campo, por dois anos de experimento, além de reter 60 a 70% do enfolhamento das plantas (COSTA et al., 2014).

A aplicação de formulações à base de extratos vegetais e Phi associados a fungicidas têm sido estudadas recentemente. Costa et al. (2014) observaram que as associações de formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira, formulação à base de subprodutos da indústria cítrica e fosfito de manganês com o fungicida reduziram a severidade da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro em condições de campo.

Diante do exposto, nota-se que estudos de resistência induzida em cafeeiro apresentaram resultados preliminares promissores. A aplicação de produtos indutores de resistência, especialmente aqueles baseados em formulações à base de subprodutos da indústria cafeeira e fosfitos, representa uma alternativa sustentável para o controle de doenças que afetam diversas plantas. No entanto, os mecanismos de indução de resistência que esses produtos

ativam, bem como a natureza das respostas moleculares e bioquímicas de defesa de cafeeiro contra *H. vastatrix* e *C. coffeicola*, não estão elucidados.

REFERÊNCIAS

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

AZINHEIRA, H. G. et al. Non-host resistance responses of *Arabidopsis thaliana* to the coffee leaf rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Botany**, Ottawa, v. 88, n. 7, p. 621-629, July 2010.

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.

BARI, R.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 473-488, Mar. 2009.

BERESTETSKIY, A. O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 44, n. 5, p. 453-465, Sept. 2008.

BOATRIGT, J. et al. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 4, p. 1993-2011, Aug. 2004.

BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 545-580, 2005.

BOTELHO, D. M. S. et al. Intensidade de cercosporiose em mudas de cafeeiro em função de fontes e doses de silício. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 582-588, 2005.

CABRAL, P. G. C. et al. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Melbourne, v. 4, n. 1, p. 129-130, Dec. 2009.

CARDOSO, D. C. et al. Large-scale analysis of differential gene expression in coffee genotypes resistant and susceptible to leaf miner-toward the identification of candidate genes for marker assisted-selection. **BMC Genomics**, London, v. 15, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/66>>. Acesso em: 10 out. 2014.

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 27-35, 1998.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; MOURA, P. H. A. Manejo integrado da cercosporiose do cafeeiro. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)**, Belo Horizonte, v. 16, p. 1-4, 2008.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, 2012.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 372-380, jul./ago. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: terceiro levantamento, setembro/2014**. Brasília, 2014. 62 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_16_08_47_43_boletim_setembro_2014.pdf>. Acesso em: 27 set. 2014.

COSTA, B. H. G. et al. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 635-642, Oct. 2014.

COSTA, M. J. N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 150-155, 2007.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 3/5, p. 194-201, 2006.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 197-206, Nov. 2005.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, Oct. 2010.

DINIZ, I. et al. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 141-157, May 2012.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, July 1995.

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

ECCARDI, F.; SANDALJ, V. **O café: ambientes e diversidade**. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2003. 237 p.

ESHKAGHI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 60, n. 6, p. 1086-1095, Dec. 2011.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 839-863, 2013.

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 286-291, 2003.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J. J. et al. (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. Madison: Soil Science Society of America, 1991. p. 329-370.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 414-420, Aug. 2006.

GUERRA- GUIMARÃES, L. et al. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum**, Plantarum, v. 53, n. 4, p. 702-706, 2009.

GUZZO, S. D. et al. Ação protetora de acibenzolar-S-metil em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2001.

GUZZO, S. D. et al. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e β -1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 3, p. 376-381, jul./set. 2004.

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, 2009.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of beta-1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 449-454, 1996.

HARRISON, M. J.; BALDWIN, I. T. Biotic interactions: ploy and conter-ploy in the biotic interactions of plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 353-355, Aug. 2004.

HOSSAIN, M. A.; UDDIN, S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 9, p. 1094-1101, 2011.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 147-154, Feb. 2000.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

KAWAOKA, A. et al. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1177-1185, July 2003.

KEEN, N. T. Phytoalexins and their elicitors. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 114-129.

KING, M. et al. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 284, n. 6, p. 425-435, Dec. 2010.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. Cross talk in defense signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, n. 3, p. 839-844, Mar. 2008.

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

LOON, L. C. van; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

LOON, L. C. van; STRIEN, E. A. van. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 85-97, Aug. 1999.

MAIA, T. A. et al. The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 42, n. 5, p. 533-542, Sept. 2013.

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, n. 5, p. 1103-1106, set./out. 2002.

MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendação**. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. 387 p.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 551-565, July 2002.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-183, Apr. 2009.

MENDONÇA, S. C.; GUERRA, N. B. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 113-116, 2003.

MÉTRAUX, J. P. Induced defenses in plants. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 7-24.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-18, Jan. 2001.

MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA, E. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 73-79, 2003.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 2, p. 323-328, Apr. 2001.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 1594-1605, Dec. 2006.

NOJOSA, G. B. A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. e *Phoma costarricensis* ECHANDI**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 60-62, jan./fev. 2009.

NUNES, C. C. et al. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 38, n. 5, p. 445-452, Aug. 2009.

PARK, S. W. et al. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, New York, v. 318, n. 5847, p. 113-116, Jan. 2007.

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. p. 417-453.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, 2007.

PEREIRA, R. B. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro**. 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PESSOA, W. S. et al. Efeito do tratamento hidrotérmico associado a indutores de resistência no manejo da antracnose da goiaba em pós-colheita. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 129-135, jul./set. 2007.

PILBEAM, R. A. et al. Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. **Trees-Structure and Function**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 1121-1131, Dec. 2011.

POZO, M. J.; LOON, L. C. van; PIETERSE, C. M. J. Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 23, n. 3, p. 211-222, Sept. 2004.

POZZA, A. A. A. et al. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 53-60, jan. 2001.

PROST, I. et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 139, n. 4, p. 1902-1913, Dec. 2005.

RAMIRO, D. A. et al. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 944-955, May 2009.

RESENDE, M. L. V. et al. **Composição para indução de resistência em plantas, a base de extratos de casca de frutos de café**. BR n. PI 0705598-6, 19 abr. 2007.

RESENDE, M. L. V. et al. **Formulação para indução de resistência em plantas, a base de extrato vegetal obtido de folhas do cafeeiro**. BR n. PI 0603575-2, 2 ago. 2006a.

RESENDE, M. L. V. et al. Indução de resistência na cafeicultura: perspectivas de uso. In: BLUN, L. E. B. et al. (Ed.). **Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro**. Lavras: UFLA, 2008. p. 25-35.

RESENDE, M. L. V. et al. 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, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: Denmark, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V. et al. Produtos comerciais à base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, p. 361-380, 2006b.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 123-130, jan./fev. 2003.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. **Fosfitos na proteção e na indução de resistência do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola***. 2008. 107 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SILVA, A. C. et al. Coffee-leaf extract and phosphites on the curative control of powdery mildew in eucalyptus mini-stumps. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 43, n. 4, p. 297-305, Aug. 2013.

SILVA, M. C. et al. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 169-183, 2002.

SILVA, M. C. et al. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, n. 1/3, p. 29-38, 2008.

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; NICOLE, M. Cytological and biochemical mechanisms involved in coffee leaf rust resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.; VÁRZEA, V. M. P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 249-283.

STOUT, M. J.; THALER, J. S.; THOMMA, B. P. H. J. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 663-689, 2006.

TOYOTA, M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no manejo da ferrugem e nos mecanismos de defesa do cafeeiro à cercosporiose**. 2008. 66 P. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VÁRZEA, V. M. P.; MARQUES, D. V. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; VÁRZEA, V. M. P. (Ed.). **Durable resistance to coffee leaf rust**. Viçosa, MG: DFT/UFV, 2005. p. 53-74.

VELLOSILLO, T. et al. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. **Plant Cell**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 831-846, Mar. 2007.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. M. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 177-206, 2009.

WALLER, J. M.; BIGGER, M.; HILLOCKS, R. J. **Coffee pests, diseases and their management**. Oxfordshire: CAB International, 2007. 400 p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. Estratégias múltiplas no manejo integrado de doenças do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 137-153, jan./fev. 2003.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*C. arabica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.

ZURBRIGGEN, M. D.; CARRILLO, N.; HAJIREZAEI, M. R. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 5, n. 4, p. 393-396, Apr. 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Produtos alternativos no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro

Ana Cristina Andrade Monteiro*

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003),
conforme instrução do Manual de Normalização da UFLA.**

* Doutora em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, UFLA. E-mail: monteiroaca@yahoo.com.br

RESUMO

A ferrugem e a cercosporiose, causadas por *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola*, respectivamente, são as principais doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil. Considerando-se a necessidade do desenvolvimento de produtos alternativos para o seu controle, objetivou-se avaliar o efeito de fontes de fosfitos e de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica no controle destas doenças em cafeeiro, em condições de casa-de-vegetação e de campo. Os experimentos em casa-de-vegetação visaram avaliar produtos alternativos no controle da ferrugem e cercosporiose em mudas de cafeeiro. No experimento de campo, conduzido por dois anos consecutivos, objetivou-se avaliar o efeito dos fosfitos e formulações aplicados isoladamente ou associados ao fungicida no manejo dessas doenças, além de verificar a influência da aplicação dos produtos no enfolhamento e na produtividade. Os produtos testados nos experimentos foram: Reforce[®] (fosfito de potássio), Reforce[®] Mn (fosfito de manganês), Reforce[®] Cu (fosfito de cobre), Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro + cobre e cálcio), Greenforce V (formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica), Greenfós (fosfito de potássio), Viça Café Plus[®] (fertilizante foliar padrão) e fungicida (epoxiconazol + piraclostrobina). Verificou-se que fontes de fosfitos e formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica proporcionaram controle da ferrugem e cercosporiose tanto em plantas de cafeeiro adultas quanto em mudas. Em condições de campo, observou-se que as associações de fontes de fosfitos e de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica com fungicida controlaram a ferrugem e cercosporiose, sendo mais eficaz quando comparado à aplicação destes produtos isoladamente, além de proporcionarem maior retenção foliar e maior produtividade, durante os dois anos de experimento. Pelos resultados observados indica-se que o uso de fosfitos ou de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica pode ser utilizado no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro.

Palavras-chave: Controle alternativo, Fosfitos, *Hemileia vastatrix*, *Cercospora coffeicola*, *Coffea arabica*.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma importante commodity para o Brasil, que é o maior produtor e exportador mundial. Segundo o United States Department of Agriculture - USDA (2014), o Brasil foi responsável por, aproximadamente, 33% da produção mundial, na safra de 2014. No entanto, a presença de pragas e doenças constitui um dos fatores limitantes à sua produção.

Dentre as doenças mais destrutivas do cafeeiro estão a ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. e Br., e a cercosporiose, que tem como agente etiológico o fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. A ferrugem está presente em quase todos os países produtores de café (ROZO et al., 2012) e a cercosporiose é importante por ocorrer desde o viveiro até o campo. Os danos de ambas são a redução da área foliar e a intensa desfolha, que irá reduzir a fotossíntese, comprometendo a produção futura (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

A principal medida de controle dessas duas doenças é o uso de produtos químicos. Entretanto, a utilização indiscriminada de fungicidas tem causado danos ao ambiente e aos seres vivos (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012). Além disso, muitos fungicidas que estão no mercado vêm perdendo a sua eficiência, em virtude da seleção de isolados do patógeno resistentes aos mesmos (KOLLER, 1999). Portanto, há necessidade de se intensificar a investigação e desenvolver alternativas efetivas no manejo de doenças do cafeeiro sem causar impacto ambiental.

Como medida alternativa no manejo de doenças, tem-se a utilização de indutores de resistência, que são produtos que ativam os

mecanismos de defesa latentes na planta. Dentre os compostos químicos que vêm sendo utilizados como indutores de respostas de defesa vegetal, estão os fosfitos (ESHKAGHI et al., 2011). Esses produtos exercem um triplo modo de ação, uma vez que podem, além de atuar na nutrição, agir diretamente sobre o patógeno e, também, ativar a defesa natural das plantas (DALIO et al., 2012; JACKSON et al., 2000; NOJOSA et al., 2009).

A utilização de fosfitos proporcionou efeitos benéficos no controle de doenças em plantas, apresentando efeito antibiótico (COSTA et al., 2014; DALIO et al., 2012; KING et al., 2010), induzindo respostas de defesa na planta (ESHKAGHI et al., 2011; PILBEAM et al., 2011), além de proporcionar aumento da produtividade (JUNQUEIRA et al., 2011). Alguns trabalhos comprovaram a eficácia de fosfitos no manejo de doenças em cafeeiro. Nojosa et al. (2009) observaram redução da severidade da mancha-de-Phoma em mudas de cafeeiro pulverizadas com fosfito de potássio e Costa et al. (2014) verificaram que fosfito de manganês reduziu a severidade da ferrugem e cercosporiose em campo.

Uma alternativa econômica e de baixo impacto para o ambiente é o uso de formulações à base de extratos de plantas, que podem apresentar efeito direto sobre o patógeno e aumentar a resistência das plantas (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012). Formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira vêm sendo estudadas e constantemente aprimoradas. Barguil et al. (2005) verificaram que formulações à base de extrato de folhas de café, de casca de frutos de café e da biomassa residual de cítricos proporcionaram redução da área abaixo da curva de progresso da mancha-de-Phoma em mudas de cafeeiro. Em condições de

campo, Santos et al. (2007) observaram que as formulações à base de extrato de plantas reduziu 47 e 61% a cercosporiose e mancha-de-phoma, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle. Costa et al. (2014) observaram que aplicação de formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira proporcionou 50% e 60% de controle da ferrugem e cercosporiose em cafeeiro adulto. Analisando o efeito indutor de resistência de formulação à base de extrato de folhas de café em tomateiro, Medeiros et al. (2009) observaram que este indutor proporcionou aumento da atividade das enzimas de defesa peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase, além de induzir a expressão de genes de defesa.

Diante das opções de controle alternativo, como as diferentes fontes de fosfitos, e do lançamento de novas formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica, como o Greenforce CuCa e Greenforce V, objetivou-se verificar o efeito de fontes de fosfitos e destas novas formulações no controle da ferrugem e cercosporiose em mudas de cafeeiro, a fim de se obter opções de produtos alternativos para controle dessas doenças em viveiros. E, também, foi analisado o uso destes produtos, aplicados isoladamente ou associados à fungicida, no manejo dessas doenças em condições de campo. Do mesmo modo, observaram-se seus efeitos no enfolhamento e na produtividade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em experimentos em casa-de-vegetação e experimento de campo.

2.1 Experimentos em casa-de-vegetação

Foram realizados dois experimentos distintos para se avaliar o efeito de produtos alternativos em mudas de cafeeiro: o primeiro, no controle da ferrugem, e o segundo, no controle da cercosporiose.

2.1.1 Obtenção do material vegetal

Para o preparo das mudas utilizadas nos experimentos, sementes de cafeeiro cv. Mundo Novo 376/4 foram semeadas em bandejas contendo areia lavada. Assim que atingiram a fase “orelha de onça”, estas foram transplantadas para sacos de polietileno de 0,50 L, contendo substrato composto por solo, areia e substrato comercial para hortaliças, na proporção 2:1:1 (v/v/v). Durante todo o período experimental, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil, irrigadas periodicamente e receberam adubações complementares de acordo com recomendação técnica para a cultura (GUIMARÃES et al., 1999).

2.1.2 Obtenção do inóculo de *H. vastatrix* e inoculação

Urediniósporos de *H. vastatrix* foram obtidos a partir de folhas naturalmente infectadas de plantas de cafeeiro, os quais foram coletados, por meio de raspagem das pústulas e acondicionados em microtubos. O material coletado foi armazenado em temperatura ambiente e protegido da luz por um período de 48 horas. Para a inoculação das plantas, foi preparada uma suspensão na concentração de 1×10^5 urediniósporos mL⁻¹ de ágar-água (0,2% p/v), contendo Tween 20 (0,05% v/v) (SALUSTIANO et al., 2008). Após a pulverização da suspensão de urediniósporos na face abaxial das folhas, as mudas foram submetidas a uma câmara úmida, no escuro, por um período de 72 horas.

2.1.3 Obtenção do inóculo de *C. coffeicola* e inoculação

Conídios de *C. coffeicola* foram diretamente isolados de lesões de folhas de cafeeiros infectadas. Foi realizada a cultura monospórica dos isolados em meio ágar-água 2% p/v. Os isolados foram repicados para meio de cultura V8[®] (100 mL de V8[®], 2 g de CaCO₃, 17 g de ágar e 1000 mL de água destilada). Para a obtenção dos conídios para a inoculação nas plantas, discos de micélio foram depositados em 40 mL de meio V8[®] (100 mL de V8[®] adicionado de 900 mL de água destilada), incubando-se a 25°C sob luz contínua e agitação (110 rpm). A suspensão foi vertida sobre ágar-água 2% em placas de Petri, que foram mantidas abertas a 25°C, sob luz contínua, por 48 h. Após a secagem (2-3 dias), foram adicionados 5 mL de água destilada

esterilizada com posterior raspagem e filtração da suspensão (SOUZA et al., 2011). As mudas foram inoculadas com a suspensão de conídios na concentração de $4,0 \times 10^4$ conídios mL⁻¹ e, em seguida, submetidas a uma câmara úmida, por um período de 72 horas.

2.1.4 Proteção de mudas de cafeeiro contra a ferrugem e cercosporiose

Os produtos utilizados foram Reforce[®] (fosfito de potássio), Reforce[®] Mn (fosfito de manganês), Reforce[®] Cu (fosfito de cobre), produzidos pela empresa Agrichem do Brasil SA., Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro + cobre e cálcio), Greenforce V (formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica), Greenfós (fosfito de potássio), produzidos pela empresa Agrofiness Tecnologia Agrícola LTDA., o fertilizante foliar padrão Viça Café Plus[®], produzido pela empresa Café Brasil Fertilizantes, e o fungicida padrão Opera[®] (epoxiconazol + piraclostrobina), da empresa BASF.

As mudas com sete meses de idade foram pulverizadas com os produtos e as doses descritos na Tabela 1 até o ponto de escorrimento, utilizando-se um pulverizador manual. A dose utilizada foi metade da dose recomendada pelos fabricantes dos produtos para pulverização de plantas adultas. Em ambos os experimentos, as inoculações com *H. vastatrix* e com *C. coffeicola* ocorreram sete dias após a aplicação dos tratamentos, conforme descrito anteriormente.

Tabela 1 Tratamentos e doses utilizados nos experimentos de casa-de-vegetação

Tratamentos	Doses
1) Reforce [®]	2,5 mL L ⁻¹
2) Reforce [®] Mn	2,5 mL L ⁻¹
3) Reforce [®] Cu	2,5 mL L ⁻¹
4) Greenforce CuCa	5,0 mL L ⁻¹
5) Greenforce V	5,0 mL L ⁻¹
6) Greenfós	5,0 mL L ⁻¹
7) Viça Café Plus [®]	6,25 g L ⁻¹
8) Fungicida	1,25 mL L ⁻¹
9) Testemunha inoculada	---

Reforce[®]: fosfito de potássio; Reforce[®] Mn: fosfito de manganês; Reforce[®] Cu: fosfito de cobre; Greenforce CuCa: formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro + cobre e cálcio; Greenforce V: formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica; Greenfós: fosfito de potássio; Viça Café Plus[®]: fertilizante foliar padrão; Fungicida: epoziconazol + piraclostrobina.

Tanto no experimento com ferrugem quanto no com cercosporiose, as avaliações da doença foram realizadas a cada cinco dias, com base no surgimento dos primeiros sintomas/sinais da doença, totalizando seis avaliações. Para avaliação da severidade da ferrugem utilizou-se a escala diagramática proposta por Cunha et al. (2001). Para cercosporiose, utilizou-se a escala diagramática proposta por Custódio et al. (2011). Após o término das avaliações de severidade, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPSF) e a área abaixo da curva de progresso da severidade da cercosporiose (AACPSC), conforme Shaner e Finney (1977).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos casualizados, com três repetições e nove tratamentos, sendo cada parcela experimental composta por três plantas. Os dados de AACPSF e AACPSC foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o

programa Sisvar (FERREIRA, 2011) e, quando significativo pelo teste F, realizou-se o teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

2.2 Experimento de campo

2.2.1 Condições experimentais

O experimento foi conduzido em área experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em lavoura de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4, com quatro anos de idade, suscetível à ferrugem e à cercosporiose, implantada no espaçamento de 3,5 m x 0,8 m. O experimento foi conduzido nas safras 2012/2013 e 2013/2014.

Durante o período experimental, a lavoura recebeu tratamentos culturais pertinentes ao sistema de manejo convencional e a adubação seguiu o Programa Agronômico de Monitoramento Nutricional (PAM Nutri) da Agrichem do Brasil SA., que converte os dados das análises química e de extrato de saturação do solo em recomendação necessária de adubo.

Os tratamentos, doses e épocas de pulverização estão descritos na Tabela 2. As pulverizações foram realizadas com a utilização de pulverizador costal motorizado, com volume de calda de 400 L ha⁻¹.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados (DBC), com quinze tratamentos e quatro repetições. Foram utilizadas dez plantas por parcela, das quais as seis centrais foram consideradas úteis para as avaliações.

Tabela 2 Tratamentos, épocas de pulverização e doses dos produtos que foram utilizados no experimento em cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4, em condições de campo

Tratamentos	Pulverizações	
	Épocas*	Dose
1. Fungicida	Jan., Mar., Abr.	1,0 L ha ⁻¹
2. Reforce [®]	Nov., Jan., Mar., Abr.	2,0 L ha ⁻¹
3. Reforce [®] + fungicida	Jan., Mar., Abr.	1,0 L ha ⁻¹ + 1,0 L ha ⁻¹
4. Reforce [®] Mn	Nov., Jan., Mar., Abr.	2,0 L ha ⁻¹
5. Reforce [®] Mn + fungicida	Jan., Mar., Abr.	1,0 L ha ⁻¹ + 1,0 L ha ⁻¹
6. Reforce [®] Cu	Nov., Jan., Mar., Abr.	2,0 L ha ⁻¹
7. Reforce [®] Cu + fungicida	Jan., Mar., Abr.	1,0 L ha ⁻¹ + 1,0 L ha ⁻¹
8. Greenforce CuCa	Nov., Jan., Mar., Abr.	4,0 L ha ⁻¹
9. Greenforce CuCa + fungicida	Jan., Mar., Abr.	2,0 L ha ⁻¹ + 1,0 L ha ⁻¹
10. Greenforce V	Nov., Jan., Mar., Abr.	4,0 L ha ⁻¹
11. Greenforce V + fungicida	Jan., Mar., Abr.	2,0 L ha ⁻¹ + 1,0 L ha ⁻¹
12. Greenfós	Nov., Jan., Mar., Abr.	4,0 L ha ⁻¹
13. Greenfós + fungicida	Jan., Mar., Abr.	2,0 L ha ⁻¹ + 1,0 L ha ⁻¹
14. Viça Café Plus [®]	Nov., Jan., Mar., Abr.	5,0 kg ha ⁻¹
15. Testemunha	---	---

*Épocas de pulverizações referentes às safras 2012/2013 e 2013/2014. Nov.: novembro, Jan.: janeiro, Mar.: março e Abr.: abril. Fungicida: epoziconazol + piraclostrobina; Reforce[®]: fosfito de potássio; Reforce[®] Mn: fosfito de manganês; Reforce[®] Cu: fosfito de cobre; Greenforce CuCa: formulação à base de subproduto da indústria cafeeira + cobre e cálcio; Greenforce V: formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica; Greenfós: fosfito de potássio; Viça Café Plus[®]: fertilizante foliar padrão.

A partir dos primeiros sintomas da ferrugem e da cercosporiose em plantas de cafeeiro, iniciaram-se as avaliações. No ano de 2013 foram realizadas cinco avaliações, que ocorreram quinzenalmente, a partir de meados de março. No ano de 2014, em razão da estiagem nos meses de

janeiro a abril, as doenças ocorreram de forma tardia, sendo realizada apenas uma avaliação das doenças antes da colheita. As avaliações foram realizadas em oito ramos plagiotrópicos por planta (quatro ramos de cada lado da linha de plantio, no terço médio das plantas). Em cada ramo foi avaliado o terceiro ou o quarto par de folhas, quantificando-se a severidade da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro de acordo com escalas diagramáticas propostas por Cunha et al. (2001) e Custódio et al. (2011). Os índices médios de severidade, observados em 2013, foram transformados em área abaixo da curva de progresso da ferrugem (AACPSF) e da cercosporiose (AACPSC) (SHANER; FINNEY, 1977).

A avaliação do enfolhamento dos cafeeiros ocorreu no período pré-colheita das duas safras, de acordo com a escala preconizada por Boldini (2001). A colheita foi realizada, manualmente, nos meses de junho e maio dos anos de 2013 e 2014, respectivamente. A produtividade foi determinada com base na massa dos frutos colhidos nas plantas. Posteriormente, procedeu-se a conversão para a produtividade (sacas de 60 kg de café beneficiado ha⁻¹), utilizando-se a seguinte fórmula: Produtividade = [(kg/planta x 0,2) x número de plantas/ha]/60 kg, em que se considera que 10 kg de café cereja equivalem a 2 kg de café beneficiado, ou seja, um rendimento em peso de 20% (CARVALHO et al., 2006).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2011). Quando significativas pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

Na avaliação do efeito de indutores de resistência no controle da ferrugem em mudas de cafeeiro em casa-de-vegetação, observou-se que plantas pulverizadas com o fungicida epoziconazol + piraclostrobina apresentaram menor AACPSF. Este tratamento diferiu dos demais tratamentos e foi 100% efetivo no controle da doença. Os tratamentos com os indutores de resistência, Reforce[®], Reforce[®] Mn, Reforce[®] Cu, Greenforce CuCa, Greenforce V e Greenfós, e o fertilizante foliar padrão, Viça Café Plus[®], apresentaram redução significativa na intensidade da ferrugem, proporcionando controle que variou de 42 a 67,5%, não diferindo entre si e diferindo-se da testemunha (Tabela 3).

No experimento em casa-de-vegetação, que avaliou o efeito dos tratamentos no controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro, observou-se que o fungicida e o Greenforce CuCa reduziram a intensidade da doença, diferindo-se dos demais tratamentos e proporcionando 99,6 e 83,3% de controle da cercosporiose, respectivamente. Os demais tratamentos apresentaram AACPSC intermediária, não diferindo da testemunha (Tabela 3).

Tabela 3 Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPSF) e da cercosporiose (AACPSC) em mudas de cafeeiro, em condições de casa-de-vegetação

Tratamentos	Ferrugem		Cercosporiose	
	AACPSF	% Controle	AACPSC	% Controle
Fungicida	0,0a	100,0	0,3a	99,6
Reforce [®]	80,9b	51,4	44,6b	40,7
Reforce [®] Mn	80,9b	51,4	38,4b	49,0
Reforce [®] Cu	84,5b	49,3	34,6b	54,0
Greenforce CuCa	54,1b	67,5	12,6a	83,3
Greenforce V	56,6b	66,0	52,2b	30,7
Greenfós	79,5b	52,3	33,9b	55,0
Viça Café Plus [®]	96,6b	42,0	60,5b	19,6
Testemunha inoculada	166,6c	---	75,3b	---
CV	29,5	---	42,1	---

Tratamentos: Fungicida: epoziconazol + piraclostrobina; Reforce[®]: fosfito de potássio; Reforce[®] Mn: fosfito de manganês; Reforce[®] Cu: fosfito de cobre; Greenforce CuCa: formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro + cobre e cálcio; Greenforce V: formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica; Greenfós: fosfito de potássio; Viça Café Plus[®]: fertilizante foliar padrão. % Controle: porcentagem de controle em relação à testemunha. Médias com mesma letra na coluna não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). CV: Coeficiente de variação.

No experimento de campo, conforme demonstrado nas tabelas 4 e 5, observou-se que o fungicida aplicado isoladamente e a associação de produtos alternativos com o fungicida proporcionaram redução da intensidade da ferrugem e da cercosporiose, diferindo-se dos demais tratamentos. As associações de fungicida com fosfitos ou formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica apresentaram percentual de controle da ferrugem e cercosporiose igual ou superior ao fungicida aplicado isoladamente. A aplicação de fosfitos e de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria

cítrica isoladamente proporcionou controle intermediário da ferrugem e cercosporiose em dois anos de experimento, diferindo-se do Viça Café Plus[®] e da testemunha.

Tabela 4 Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPSF) no ano de 2013 e da severidade da ferrugem em maio dos anos de 2013 e 2014 em cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4, em condições de campo

Tratamentos	2013		2013		2014	
	AACPSF	% Controle	Severidade	% Controle	Severidade	% Controle
Fungicida	9,72a	92,4	0,30a	81,4	0,08a	96,5
Reforce [®]	38,80b	69,6	0,72b	55,5	0,70b	68,9
Reforce [®] + fungicida	8,32a	93,5	0,28a	83,0	0,11a	94,9
Reforce [®] Mn	56,33b	55,8	0,86c	47,4	0,90b	60,3
Reforce [®] Mn + fungicida	11,35a	91,1	0,31a	80,9	0,18a	91,9
Reforce [®] Cu	72,76c	43,0	1,31d	19,7	0,99b	56,3
Reforce [®] Cu + fungicida	13,59a	89,3	0,39a	76,0	0,17a	92,4
Greenforce Cuca	49,70b	61,0	0,89c	45,6	0,99b	56,3
Greenforce CuCa + fungicida	4,00a	96,9	0,13a	92,2	0,09a	95,9
Greenforce V	49,69b	61,0	1,39d	14,6	0,68b	70,1
Greenforce V + fungicida	4,57a	96,4	0,06a	96,5	0,03a	98,6
Greenfós	40,48b	68,3	0,67b	58,7	0,73b	67,5
Greenfós + fungicida	5,58a	95,6	0,16a	90,4	0,06a	97,2
Viça Café Plus [®]	124,41d	2,5	1,33d	18,4	1,81c	20,1
Testemunha	127,55d	---	1,63d	---	2,26d	---
CV	26,5	---	39,7	---	46,8	---

Tratamentos: Fungicida: epoziconazol + piraclostrobina; Reforce[®]: fosfito de potássio; Reforce[®] Mn: fosfito de manganês; Reforce[®] Cu: fosfito de cobre; Greenforce CuCa: formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro + cobre e cálcio; Greenforce V: formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica; Greenfós: fosfito de potássio; Viça Café Plus[®]: fertilizante foliar padrão. % Controle: porcentagem de controle em relação à testemunha. CV: coeficiente de variação. Médias com mesma letra na coluna não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade da cercosporiose (AAPSC) no ano de 2013 e da severidade da cercosporiose em maio dos anos de 2013 e 2014 em cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4, em condições de campo

Tratamentos	2013		2013		2014	
	AACPSC	% Controle	Severidade	% Controle	Severidade	% Controle
Fungicida	10,10a	74,9	0,08a	89,1	0,24a	74,7
Reforce [®]	17,85b	55,6	0,23b	68,6	0,47b	50,8
Reforce [®] + fungicida	10,90a	72,9	0,06a	91,9	0,26a	72,6
Reforce [®] Mn	18,11b	55,0	0,52c	30,2	0,40b	58,1
Reforce [®] Mn + fungicida	6,08a	84,9	0,03a	95,9	0,24a	75,2
Reforce [®] Cu	19,76b	50,9	0,45c	39,3	0,45b	53,5
Reforce [®] Cu + fungicida	8,59a	78,6	0,17b	76,7	0,30a	68,6
Greenforce Cuca	17,11b	57,5	0,23b	68,6	0,48b	50,3
Greenforce CuCa + fungicida	4,10a	89,8	0,14a	81,7	0,16a	83,0
Greenforce V	24,08b	40,1	0,32b	57,4	0,52b	46,2
Greenforce V + fungicida	6,21a	84,6	0,02a	96,9	0,17a	82,5
Greenfós	22,34b	44,5	0,17b	77,0	0,62c	35,0
Greenfós + fungicida	4,68a	88,4	0,10a	86,0	0,09a	90,4
Viça Café Plus [®]	32,06c	20,3	0,53c	28,3	0,90d	5,6
Testemunha	40,22c	---	0,74d	---	0,96d	---
CV	39,6	---	39,6	---	34,8	---

Tratamentos: Fungicida: epoziconazol + piraclostrobina; Reforce[®]: fosfito de potássio; Reforce[®] Mn: fosfito de manganês; Reforce[®] Cu: fosfito de cobre; Greenforce CuCa: formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro + cobre e cálcio; Greenforce V: formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica; Greenfós: fosfito de potássio; Viça Café Plus[®]: fertilizante foliar padrão. % Controle: porcentagem de controle em relação à testemunha. CV: coeficiente de variação. Médias com mesma letra na coluna não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Na análise do enfolhamento das plantas de cafeeiro, em ambos os anos, nas avaliações pré-colheita, observou-se o mesmo comportamento dos tratamentos. Os tratamentos fungicida, Reforce[®], Reforce[®] Cu, Greenforce CuCa, Greenforce V, isoladamente e as associações de Reforce[®], Reforce[®] Mn, Reforce[®] Cu, Greenforce CuCa, Greenforce V e Greenfós com o fungicida proporcionaram maior retenção foliar de cafeeiros cultivar Mundo Novo 376/4, diferindo dos tratamentos Reforce[®] Mn e Greenfós, que diferiram do Viça Café Plus[®] e da testemunha (Tabela 6).

Tabela 6 Efeito dos tratamentos no enfolhamento de cafeeiros cultivar Mundo Novo 376/4, em condições de campo, na pré-colheita dos anos de 2013 e 2014

Tratamentos	Enfolhamento	
	2013	2014
Fungicida	88,0a	89,0a
Reforce [®]	81,3a	88,1a
Reforce [®] + fungicida	88,1a	84,8a
Reforce [®] Mn	68,3b	79,5b
Reforce [®] Mn + fungicida	86,1a	86,1a
Reforce [®] Cu	76,5a	81,5a
Reforce [®] Cu + fungicida	84,5a	82,9a
Greenforce CuCa	81,9a	85,1a
Greenforce CuCa + fungicida	89,8a	89,8a
Greenforce V	79,1a	81,1a
Greenforce V + fungicida	88,8a	88,8a
Greenfós	72,6b	73,9b
Greenfós + fungicida	87,8a	87,0a
Viça Café Plus [®]	62,6c	64,5c
Testemunha	53,6c	57,0c
CV	8,3	5,5

Tratamentos: Fungicida: epoziconazol + piraclostrobina; Reforce[®]: fosfito de potássio; Reforce[®] Mn: fosfito de manganês; Reforce[®] Cu: fosfito de cobre; Greenforce CuCa: formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro + cobre e cálcio; Greenforce V: formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica; Greenfós: fosfito de potássio; Viça Café Plus[®]: fertilizante foliar padrão. CV: coeficiente de variação. Médias com mesma letra na coluna não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Na avaliação do efeito dos tratamentos na produtividade, no ano de 2013 não se observou diferença entre os tratamentos. Entretanto, no ano de 2014, observou-se que o fungicida e Greenforce CuCa aplicados isoladamente e a associação de Reforce[®] Mn, Reforce[®] Cu, Greenforce

CuCa e Greenforce V com o fungicida proporcionaram maior produtividade, diferindo-se dos demais tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7 Efeito dos tratamentos na produtividade de cafeeiros cultivar Mundo Novo 376/4, em condições de campo, nos anos de 2013 e 2014

Tratamentos	Produtividade (sacas/ha)	
	2013	2014
Fungicida	24,1a	48,0a
Reforce [®]	24,0a	18,7b
Reforce [®] + fungicida	24,6a	31,6b
Reforce [®] Mn	16,7a	20,7b
Reforce [®] Mn + fungicida	17,4a	48,9a
Reforce [®] Cu	23,2a	28,0b
Reforce [®] Cu + fungicida	21,5a	45,8a
Greenforce CuCa	20,1a	37,7a
Greenforce CuCa + fungicida	22,6a	39,1a
Greenforce V	20,7a	24,5b
Greenforce V + fungicida	19,9a	39,8a
Greenfós	18,2a	30,3b
Greenfós + fungicida	16,8a	33,3b
Viça Café Plus [®]	23,4a	29,1b
Testemunha	18,3a	17,4b
CV	33,6	42,8

Tratamentos: Fungicida: epoziconazol + piraclostrobina; Reforce[®]: fosfito de potássio; Reforce[®] Mn: fosfito de manganês; Reforce[®] Cu: fosfito de cobre; Greenforce CuCa: formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro + cobre e cálcio; Greenforce V: formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica; Greenfós: fosfito de potássio; Viça Café Plus[®]: fertilizante foliar padrão. CV: coeficiente de variação. Médias com mesma letra na coluna não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho investigaram-se opções de controle alternativo para o manejo da ferrugem e cercosporiose de cafeeiro, tanto em plantas adultas em condições de campo, como em mudas em condições de casa-de-vegetação. Verificou-se que fontes de fosfitos e formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica proporcionaram controle destas duas doenças do cafeeiro, tanto em plantas adultas quanto em mudas. Em condições de campo, observou-se que as associações destas opções de controle alternativo com fungicida controlaram a ferrugem e a cercosporiose, além de proporcionarem maior retenção foliar e maior produção, durante os dois anos de experimento.

Fosfitos vêm mostrando resultados para o controle de doenças de plantas, inclusive, em cafeeiro. Existem trabalhos que relatam o uso de fosfitos controlando doenças em plantas causadas por Oomicetos (ESHRAHGI et al., 2011; JACKSON et al., 2000; MACHINANDIARENA et al., 2012; SILVA et al., 2011). Mas, também, têm apresentado bons resultados no controle de doenças causadas por patógenos não pertencentes a este grupo.

O uso de fosfito de potássio em mudas de cafeeiro proporcionou redução da severidade da mancha-de-Phoma (NOJOSA et al., 2009), enquanto fosfito de manganês reduziu a severidade da ferrugem e da cercosporiose em campo (COSTA et al., 2014). Neste trabalho foi avaliado fosfito de manganês, fosfito de cobre e duas fontes de fosfito de potássio no controle da ferrugem e da cercosporiose, em mudas e em plantas adultas de cafeeiro. Verificou-se que estas diferentes fontes de

fosfitos apresentaram controle de 49 a 52% e de 40 a 55% da ferrugem e da cercosporiose, respectivamente, em mudas de cafeeiro. Em condições de campo, estas fontes de fosfito proporcionaram controle de 43 a 69% e de 35 a 58% da ferrugem e da cercosporiose, respectivamente.

Extratos de plantas, bem como subprodutos da indústria de processamento de plantas são fontes potenciais de compostos bioativos. Formulações à base de extratos vegetais podem ser combinadas entre si ou com nutrientes para o desenvolvimento de produtos alternativos para o controle de doenças. No presente trabalho foi avaliado o Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira + cobre e cálcio) e o Greenforce V (formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira e da indústria cítrica) no controle de duas importantes doenças em cafeeiro.

As formulações avaliadas podem se tornar opções para o manejo de doenças em cafeeiro, tanto na fase de mudas, quanto plantas adultas. Greenforce CuCa controlou em média 58 e 54% da ferrugem e da cercosporiose, respectivamente, em dois anos de experimento em condições de campo. Estes resultados corroboram com Costa et al. (2014), que observaram que Fitoforce Full (formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira associada a nutrientes) proporcionou 50% e 60% de controle da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro adulto.

Apesar de fosfito ser considerado um fertilizante foliar, as plantas não o utilizam como fonte de fósforo. No entanto, os compostos que acompanham esta molécula, como o potássio, o manganês e o cobre, podem atuar na nutrição (DALIO et al., 2012). Existem relatos sobre os

efeitos dos nutrientes minerais aumentando ou reduzindo a resistência de plantas a doenças. Segundo Pozza e Pozza (2006), a nutrição mineral equilibrada está relacionada ao menor progresso de doenças, pois favorece o acúmulo de compostos inibidores ao redor do sítio de infecção e/ou barreiras mecânicas que impedem a penetração e a infecção por patógenos. Assim, os nutrientes presentes nas fontes de fosfitos e no Greenforce CuCa, possivelmente, contribuíram para aumentar a resistência do cafeeiro contra a ferrugem e a cercosporiose.

No manejo da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro a principal medida de controle utilizada é o fungicida. Entretanto, pesquisadores vêm avaliando outras medidas alternativas de controle associadas ao fungicida para integrar o manejo de doenças (COSTA et al., 2014; LOBATO et al., 2011). No presente trabalho, as associações de fosfitos e de formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica ao fungicida mostraram-se eficazes no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo, além de proporcionarem maior retenção foliar e maior produtividade. Costa et al. (2014), também, observaram que a associação de fungicida a produtos alternativos é eficaz no controle de doenças em cafeeiro, além de proporcionarem maiores produtividade e enfolhamento. Assim, compostos com diferentes mecanismos de ação, como indutores de resistência e fungicida, podem ser utilizados para ampliar o espectro de ação, aumentar a duração da atividade antifúngica ou explorar interações sinérgicas entre os compostos, potencializando suas atividades (GISI, 1996).

Assim, fosfitos e formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica são produtos menos agressivos ao homem e

ao meio ambiente e, por meio dos resultados do presente trabalho, mostraram-se como uma ferramenta complementar para auxiliar o produtor no manejo da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-CAFÉ), por financiarem este trabalho.

ALTERNATIVE PRODUCTS IN THE MANAGEMENT OF RUST AND BROWN EYE SPOT ON COFFEE PLANTS

ABSTRACT

Rust and brown eye spot, caused by *Hemileia vastatrix* and *Cercospora coffeicola*, respectively, are the main fungal diseases of coffee plants in Brazil. Considering the necessity of developing alternative products for its control, we aimed at evaluating the effect of phosphite sources and formulations based on by-products of coffee and citrus industry in the control of these diseases, under greenhouse and field conditions. The experiments in greenhouse aimed at evaluating alternative products for controlling rust and brown eye spot in coffee plant seedlings. In the field experiment, conducted for two consecutive years, we aimed at evaluating the effects of the phosphites and formulations applied separately or in association with the fungicide in the management of these diseases, in addition of verifying the influence of the application of the products on leaf retention and productivity. The products tested in the experiments were: Reforce[®] (potassium phosphite), Reforce[®] Mn (manganese phosphite), Reforce[®] Cu (copper phosphite), Greenforce CuCa (formulation based on by-product of the coffee industry + copper and calcium), Greenforce V (formulation based on by-products of the coffee and citrus industries), Greenfós (potassium phosphite), Viça Café Plus[®] (standard foliar fertilizer) and fungicide (epoxiconazole + pyraclostrobin). We verified that the sources of phosphites and the formulations based on by-products of coffee and citrus industry provided control over rust and brown eye spot for adult coffee plants or for seedlings. Under field conditions, we observed that the associations of phosphite sources and the formulations based on by-products of coffee and citrus industry controlled rust and brown eye spot, being effective when compared to the separate application of these products, in addition to providing higher foliar retention and higher productivity during the two years of experiment. With the results obtained, we indicate that the use of phosphites or of formulations based on by-products of coffee and citrus industry can be used for in the management of coffee plant rust and brown eye spot.

Keywords: Alternative control, Phosphites, *Hemileia vastatrix*, *Cercospora coffeicola*, *Coffea arabica*.

REFERÊNCIAS

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.

BOLDINI, J. M. **Epidemiologia da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro irrigado e fertirrigado**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

CARVALHO, G. R. et al. Avaliação e seleção de progênies resultantes do cruzamento de cultivares de café Catuaí com Mundo Novo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 838-843, set./out. 2006.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, 2012.

COSTA, B. H. G. et al. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 635-642, Oct. 2014.

CUNHA, R. L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos Expandidos...** Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p. 1001-1008.

CUSTÓDIO, A. A. P. et al. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1067-1076, nov./dez. 2011.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

ESHRAHGI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 60, n. 6, p. 1086-1095, Dec. 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GISI, U. Synergistic interaction of fungicides in mixtures. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 11, p. 1273-1279, Nov. 1996.

GUIMARÃES, P. T. G. et al. Cafeeiro. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VENEGA, V. H. A. (Ed.). **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. p. 289-302.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 49, n. 1, p. 147-154, Feb. 2000.

JUNQUEIRA, K. P. et al. Desempenho agronômico de maracujazeiros tratados com produtos alternativos e fertilizantes foliares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 33, n. 1, p. 40-47, mar. 2011.

KING, M. et al. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 284, n. 6, p. 425-435, Dec. 2010.

KOLLER, W. Chemical approaches to managing plant pathogens. In: RUBERSON, J. R. (Ed.). **Handbook of integrated pest management**. New York: M. Dekker, 1999. p. 337-376.

LOBATO, M. C. et al. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, n. 2, p. 155-163, 2011.

MACHINANDIARENA, M. F. et al. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 14, p. 1417-1424, 2012.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-183, Apr. 2009.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 60-62, jan./fev. 2009.

PILBEAM, R. A. et al. Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. **Trees-POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. A nutrição mineral no controle de doenças de Structure and Function**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 1121-1131, Dec. 2011.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. A nutrição mineral no controle de doenças de plantas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Ed.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2006. p. 49-80.

ROZO, Y. et al. Aggressiveness and genetic diversity of *Hemileia vastatrix* during an epidemic in Colombia. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 11/12, p. 732-740, 2012.

SALUSTIANO, M. et al. Variability in ten populations of *Hemileia vastatrix* for germination and germinative tube length under four temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1651-1656, set./out. 2008.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, Aug. 1977.

SILVA, O. C. et al. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 6, p. 598-604, 2011.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6-11, Jan. 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Coffee**: world markets and trade. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2014.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*C. arabica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.

**ARTIGO 2 Formulação à base de subprodutos da indústria cafeeira na
indução de resistência do cafeeiro à cercosporiose**

Ana Cristina Andrade Monteiro²

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003),
conforme instrução do Manual de Normalização da UFLA.**

² Doutora em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, UFLA. E-mail: monteiroaca@yahoo.com.br

RESUMO

A busca por produtos alternativos que induzem resistência em plantas contra patógenos é crescente. Assim, objetivou-se verificar o efeito de formulação à base de subproduto da indústria cafeeira (Greenforce CuCa) no controle da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), em mudas de cafeeiro, comparado com o indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil (ASM). Além disso, objetivou-se estudar seu efeito como indutor de resistência, por meio da análise da expressão de genes relacionados à rota do ácido salicílico (*CaPRI*, *CaGT*), na rota do ácido jasmônico (*LOX*) e do metabolismo dos fenilpropanoides (*PAL*) e, também, da atividade das enzimas de defesa peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia-ase (PAL) e polifenol oxidase (PPO). Foi observado que a aplicação foliar de Greenforce CuCa, em mudas de cafeeiro, proporcionou 63% de controle da severidade da cercosporiose, enquanto o ASM controlou 36% da doença. Comparando Greenforce CuCa com o ASM, comprovou-se que Greenforce CuCa possui efeito indutor de resistência, pois induziu o aumento da transcrição dos genes *CaPRI*, *CaGT*, *LOX* e *PAL* e, também, proporcionou incremento na atividade de enzimas de defesa (POX, APX, CAT, SOD, PAL e PPO) em mudas de cafeeiro inoculadas e não inoculadas com *C. coffeicola*. Por estes resultados sugere-se que Greenforce CuCa é uma alternativa promissora para integrar o manejo da cercosporiose do cafeeiro.

Palavras-chave *Coffea arabica*; *Cercospora coffeicola*; Indutor de resistência; qRT-PCR; Atividade enzimática.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do café é importante para a socioeconomia dos países produtores. Entretanto, a ocorrência de doenças é um dos fatores que contribui para a redução da produtividade e da qualidade do café, além de aumentar o custo de produção. A cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, é uma das principais doenças do cafeeiro, ocorrendo desde mudas até em plantas adultas.

Os principais prejuízos ocasionados pela cercosporiose consistem na queda de folhas e raquitismo das mudas em condições de viveiro e, em plantas adultas, acarreta queda de folhas e causa amadurecimento precoce, queda prematura e chochamento dos frutos, depreciando a qualidade do café (CARVALHO; CUNHA; MOURA, 2008). Essa doença vem sendo controlada pelo manejo das práticas culturais e nutrição do cafeeiro e/ou pela aplicação de fungicidas sistêmicos, como os triazóis e estrobirulinas. Porém, muitos fungicidas que estão no mercado vêm perdendo a sua eficiência, em virtude da seleção de isolados do patógeno resistentes aos mesmos (KOLLER, 1999). Portanto, um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido desenvolver e estabelecer métodos eficientes de controle de doenças e que sejam de baixo impacto ambiental (DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010).

Alguns compostos naturais ou sintéticos estimulam respostas de defesa semelhantes às observadas em interações entre hospedeiro resistente e patógeno (DANIEL; GUEST, 2006). Estes compostos são conhecidos como indutores de resistência. Estes, na maioria das vezes,

não apresentam ou apresentam baixa toxidez direta sobre patógenos, atuando como moléculas sinalizadoras, que, ao serem reconhecidas pelas células vegetais, induzem a expressão de genes que codificam a síntese de compostos de resistência, impedindo ou dificultando o estabelecimento e/ou desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, reduzindo os sintomas da doença (DURRANT; DONG, 2004).

O acibenzolar-S-metil (ASM) é um indutor de resistência abiótico, análogo ao ácido salicílico, disponível comercialmente. Este age como ativador dos mecanismos de defesa de plantas, conferindo proteção sistêmica contra diferentes patógenos em diversas culturas, dentre elas em cafeeiro (GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; MARCHI; BORGES; RESENDE, 2002; PATRÍCIO et al., 2007). Guzzo, Harakava e Tsai (2009), utilizando a técnica de hibridização subtrativa por supressão, identificaram genes relacionados à resistência sistêmica adquirida em plantas de cafeeiro suscetíveis à ferrugem após o tratamento com ASM. Os genes encontrados estão envolvidos em diversos processos relacionados à resistência contra fitopatógenos como: formação de espécies ativas de oxigênio (EAOs), reação de hipersensibilidade, morte celular programada, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese e metabolismo de lipídios.

Outra forma de controle de doenças de plantas que demonstra potencial para induzir resistência é a utilização de extratos vegetais (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012). Produtos naturais, como formulações à base de subprodutos da indústria cafeeira, vêm despertando o interesse de especialistas, pois eliciadores presentes nestas fazem com

que ocorram respostas de defesa nas plantas, gerando alterações bioquímicas e ativando o sistema de defesa (PESSOA et al., 2007; RESENDE et al., 2004).

Formulações à base de subprodutos da indústria cafeeira vêm sendo utilizadas, para o controle de doenças em cafeeiro, cacaueteiro, algodoeiro, tomateiro e em eucalipto (COSTA et al., 2014; MEDEIROS et al., 2009; RESENDE et al., 2007; SILVA et al., 2013). Em tomateiro, formulação à base de subproduto da indústria cafeeira induziu a expressão de genes de defesa e proporcionou maior atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase (MEDEIROS et al., 2009).

Diante disso, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a eficácia do Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio), comparado ao indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil (ASM), no controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro. Além disso, estudar seu efeito como indutor de resistência, por meio da análise da expressão de genes relacionados à rota do ácido salicílico (*CaPRI*, *CaGT*), rota do ácido jasmônico (*LOX*) e no metabolismo dos fenilpropanoides (*PAL*) e, também, a atividade das enzimas de defesa peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

Para o preparo das mudas utilizadas nos experimentos, sementes de cafeeiro cv. Mundo Novo 376/4 foram semeadas em bandejas contendo areia lavada. Assim que atingiram a fase “orelha de onça”, estas foram transplantadas para sacos de polietileno de 0,50 L, contendo substrato composto por solo, areia e substrato comercial para hortaliças, na proporção 2:1:1 (v/v/v). Durante todo o período experimental, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil, sendo irrigadas periodicamente e recebendo adubações complementares de acordo com recomendação técnica para a cultura (GUIMARÃES et al., 1999).

2.2 Obtenção do inóculo e inoculação

Conídios de *C. coffeicola* foram diretamente isolados de lesões de folhas de cafeeiros infectadas. Foi realizada a cultura monospórica dos isolados em meio ágar água 2% p/v e, em seguida, os isolados foram repicados para meio de cultura V8[®] (100 mL de V8[®], 2 g de CaCO₃, 17 g de ágar e 1000 mL de água destilada). Para a obtenção dos conídios para a inoculação nas plantas, discos de micélio foram depositados em 40 mL de meio V8[®] (100 mL de V8[®] adicionado de 900 mL de água destilada), incubando-se a 25°C, sob luz fluorescente contínua e

agitação de 110 rpm pelo período de quatro dias. Posteriormente, a suspensão foi vertida sobre ágar água 2% em placas de Petri, que foram mantidas abertas a 25°C, sob luz contínua por 48 h. Após secagem (2-3 dias), foram adicionados 5 mL de água destilada esterilizada e realizada a raspagem e filtração da suspensão (SOUZA et al., 2011). As mudas foram inoculadas com a suspensão de conídios na concentração de $5,0 \times 10^4$ conídios mL⁻¹ e, em seguida, submetidas à câmara úmida, por um período de 72 horas.

2.3 Proteção de mudas de cafeeiro contra a cercosporiose

Mudas de cafeeiro com seis meses de idade foram pulverizadas com os seguintes produtos: Greenforce CuCa (formulação à base de subproduto da indústria cafeeiro adicionada de cobre e cálcio, produzido pela empresa Agrofiness Tecnologia Agrícola Ltda.), na dose de 1,53 mL L⁻¹ e, como tratamento padrão, utilizou-se o indutor de resistência acibenzolar-S-metil - ASM (Bion[®], produzido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.), na dose 0,2 g L⁻¹, além de um controle pulverizado com água. Utilizou-se pulverizador manual para aplicação dos tratamentos e sete dias após a aplicação, as plantas foram inoculadas com *C. coffeicola*.

Considerando o surgimento dos primeiros sintomas da doença, começaram-se as avaliações da cercosporiose. Estas foram realizadas a cada sete dias, totalizando seis avaliações, utilizando-se a escala diagramática proposta por Custódio et al. (2011). Em seguida, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), conforme Shaner e Finney (1977).

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com seis repetições e três tratamentos, sendo cada parcela experimental composta por duas plantas. Os dados de AACPSD foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2011) e, quando significativo pelo teste F, realizou-se o teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$). Este experimento foi realizado duas vezes.

2.4 Preparo do material vegetal para análises bioquímica e molecular

Mudas de cafeeiro foram pulverizadas com Greenforce CuCa (1,53 mL L⁻¹), ASM (0,2 g L⁻¹) e como controle utilizaram-se plantas pulverizadas com água. A inoculação com *C. coffeicola* ocorreu 7 dias, após a aplicação dos produtos, conforme descrito anteriormente. O material vegetal para as análises molecular e bioquímica foi coletado nos tempos de 24, 48, 96, 192, 216 e 264 horas após a aplicação dos tratamentos (haa). Foram coletados o primeiro e o segundo par de folhas totalmente expandidas, do ápice para a base, em cada tempo de coleta, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com três repetições e seis plantas por repetição para cada tempo de coleta.

2.5 Análise da expressão gênica

O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e, aproximadamente, 100 mg de cada amostra macerada foi utilizado para a extração de RNA total, a qual foi realizada utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega®), seguindo o protocolo para tecidos de plantas. A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed™ e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Espectrophotometer ND-100.

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

Os *primers* para qRT-PCR dos genes *CaPRI*, *CaGT*, *LOX* e *PAL* de cafeeiro foram desenhados com o auxílio do software Integrated DNA Technologies - IDT (2014). Além desses genes, foram desenhados *primers* para amplificar genes que foram usados como controle constitutivo. Os genes escolhidos foram o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e o *Rpl 7* (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009; DINIZ et al., 2012) (Tabela 1).

Tabela 1 Sequências dos *primers* utilizados para a análise de qRT-PCR

Genes	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do fragmento	Nº acesso
<i>CaPR1</i>	F: CAAACCCATGCGATTGATGTAA R: ATTCCAAGGCTCCTCTATATTAAGT	130	DQ335594 ^a
<i>CaGT</i>	F: TGCCGCACAAGGACATATAA R: ATGGTCTCCACTGCGATTG	141	CO773975 ^a
<i>LOX</i>	F: CGGCGACTAATCCCTAATGAAA R: GTCTAACCACGGCCAAGTATT	124	DV704189 ^a
<i>PAL</i>	F: GGAGAGTGCTAGATGTGAGTTG R: TCTCACCAGTCAGGAAATTGG	128	JF838179 ^a
<i>GAPDH</i>	F: TTGAAGGGCGGTGCAAA R: AACATGGGTGCATCCTTGCT	59	SGN-U347734 ^b
<i>Rpl 7</i>	F: GACCTTGCCCATGAGATCCTGAC R: CCAGCATCGCCTCCTTCAACATAG	136	SGN-U351477 ^b

^aNúmero de acesso de acordo com o GenBank; ^bNúmero de acesso de acordo com SOL Genomics Network; F: sequência do primer forward; R: sequência do primer reverse.

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

(Ciclo *Threshold*), obtidos pela expressão do gene constitutivo *Rpl 7*. A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método CT comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.6 Análise da atividade enzimática

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas POX, APX, CAT e SOD, amostras de 200 mg de tecido foliar foram maceradas com N₂ líquido em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p), até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C, e os sobrenadantes foram utilizados para as análises enzimáticas (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do guaiacol, de acordo com a metodologia de Urbanek, Kuzniakgebarowska e Herka (1991). Adicionou-se 40 µL do extrato enzimático, ajustado para 200 µL de solução, contendo fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, guaiacol 7,5 mM e peróxido de hidrogênio 18,75 mM. Após incubação a 30°C, por 2 minutos, a absorbância foi medida a 480nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da POX (CHANCE; MAEHLEY, 1955).

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). Adicionaram-se 20 µL do extrato enzimático, ajustado para 200 µL de solução, contendo fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, ácido

ascórbico 0,5 mM, peróxido de hidrogênio 0,1 mM e água. A atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 290 nm durante 1 minuto a 25°C. O coeficiente de extinção molar de $1,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da APX.

A CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos, a 25°C. Adicionaram-se 10 μL do extrato enzimático em tampão de incubação, contendo fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, peróxido de hidrogênio 12,5 mM e água, ajustado para 200 μL de solução final. O coeficiente de extinção molar de $18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da CAT (HAVIR; MCHALE, 1987).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) em meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM , riboflavina 2 μM e extrato enzimático. Após incubação por 7 minutos, em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30 W, realizou-se leitura a 560 nm. Uma unidade da SOD correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

Para a determinação da PAL, o tecido foliar foi macerado conforme efetuado para as demais enzimas. Para cada grama de pó macerado, adicionaram-se 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, acrescido de 1 mM de PMSF e 1% de PVP. A solução foi centrifugada a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. A atividade da PAL foi determinada conforme metodologia descrita por Zucker (1965). Adicionaram-se 5 μL do extrato

enzimático, ajustado para 200 μL de solução, contendo Tris-HCl 100mMpH 8,8 e L-fenilalanina 50 mM. Após incubação a 37°C, por 20 minutos, a absorvância foi medida a 280nm. O coeficiente de extinção molar de 5000mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da PAL.

Para a obtenção do extrato para determinação enzimática da PPO, o tecido foliar foi macerado conforme descrito acima. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 30 mM, pH 7,0, EDTA 0,1 mM e água. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática. A atividade da PPO foi determinada conforme metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). Adicionaram-se 20 μL do extrato enzimático, ajustado para 200 μL de solução contendo fosfato de potássio 70 mM pH 7,0 e catecol 20 mM. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorvância foi medida a 410nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da PPO.

A proteína total do cada extrato enzimático foi mensurada, de acordo com o método de Bradford (1976), usando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com três tratamentos antes da inoculação e seis tratamentos após a inoculação com *C. coffeicola*, com três repetições, para cada tempo de coleta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Proteção de mudas de cafeeiro contra a cercosporiose

Em ambos os experimentos, o tratamento Greenforce CuCa apresentou redução significativa da severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro, diferindo-se, significativamente, do ASM, que se diferiu das plantas controle, pulverizadas com água. O tratamento Greenforce CuCa destacou-se no controle da doença, controlando em média 63%, enquanto o tratamento com ASM proporcionou em média 36% de controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro (Tabela 2).

Tabela 2 Efeito do Greenforce CuCa e do acibenzolar-S-metil (ASM) na área abaixo da curva de progresso da severidade da cercosporiose (AACPSD) em mudas de cafeeiro e porcentagem de controle da doença em relação ao controle pulverizado com água

Tratamentos	Experimento I		Experimento II	
	AACPSD	Controle (%)	AACPSD	Controle (%)
Greenforce CuCa	40,47 a	66,2	27,16 a	60,6
ASM	79,49 b	33,6	41,29 b	40,1
Controle	119,70 c	---	68,95 c	---
CV (%)	20,1		17,5	

CV = coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($P \leq 0,05$) pelo teste Scott-Knott, em cada experimento.

3.2 Análise da expressão dos genes *CaPR1b*, *CaGT*, *LOX* e *PAL*

Na análise molecular, em que se avaliou a expressão relativa de genes relacionados à defesa da planta, observou-se que Greenforce CuCa,

assim como o indutor padrão ASM, induziu a expressão dos genes *CaPRI*, *CaGT*, *LOX* e *PAL* em mudas de cafeeiro.

Na análise dos níveis de transcritos do gene *CaPRI*, observou-se que a aplicação de Greenforce CuCa e o ASM proporcionaram aumento dos transcritos deste gene, em relação às plantas controle pulverizadas com água, em plantas não inoculadas com patógeno às 96 e 264 haa. No período de 192 haa, plantas pulverizadas com ASM, com e sem inoculação com *C. coffeicola*, apresentaram aumento dos níveis de transcritos. Já, às 216 haa, plantas pulverizadas com Greenforce CuCa e ASM, inoculadas com o patógeno, apresentaram níveis de transcritos de *CaPRI* superiores aos níveis das plantas controle (Figura 1A).

Com relação aos níveis de transcritos do gene *CaGT*, observou-se que às 24 haa, apenas plantas tratadas com ASM apresentaram aumento dos níveis de transcritos. Entretanto, às 96 haa, plantas tratadas com ASM e com Greenforce CuCa apresentaram aumento dos transcritos deste gene, visto que a formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio apresentou maior aumento. Em plantas que foram inoculadas com *C. coffeicola*, apenas o Greenforce CuCa proporcionou aumento dos níveis de transcritos de *CaGT*, às 192 haa (Figura 1B).

Os níveis de transcritos de *LOX* foram semelhantes para ambos os tratamentos nos períodos avaliados. Entretanto às 96, 216 e 264 haa, a aplicação de Greenforce CuCa e ASM em mudas de cafeeiro proporcionou maiores níveis de transcritos deste gene em plantas sem inoculação com *C. coffeicola*, em relação às plantas pulverizadas com água. Estes tratamentos não proporcionaram aumentos nos níveis de

transcritos em plantas inoculadas com o patógeno em nenhum período avaliado (Figura 1C).

Na análise dos transcritos do gene *PAL*, de maneira geral, não houve diferença entre as plantas pulverizadas com os indutores e as plantas pulverizadas com água. Entretanto às 216 haa, plantas pulverizadas com Greenforce CuCa e inoculadas com *C. coffeicola* apresentaram maiores níveis de transcritos do gene *PAL* (Figura 1D).

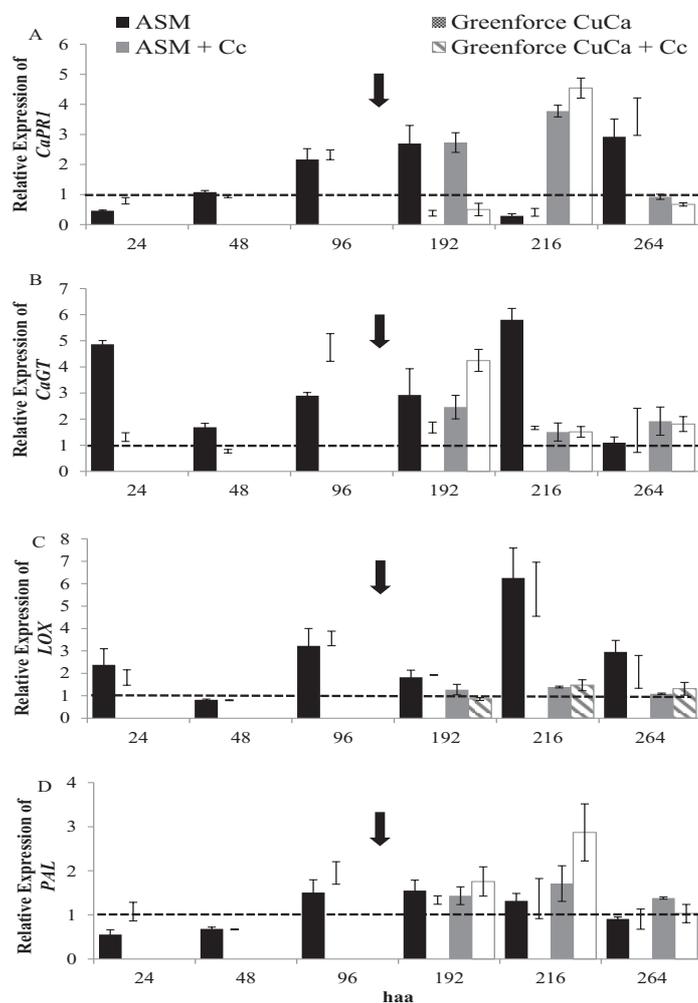


Figura 1 Expressão relativa dos genes *CaPRI* (A), *CaGT* (B), *LOX* (C) e *PAL* (D) em mudas de *Coffea arabica* após aplicação de acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa. Setas indicam inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc), a qual ocorreu às 168 horas após aplicação dos tratamentos (haa). Para cada período avaliado, a expressão relativa de cada gene representa a relação de transcritos acumulados em relação ao controle, que corresponde à linha tracejada. O gene *RPL7* foi usado como controle endógeno. Barras de erros representam o erro padrão da média de três repetições.

3.3 Atividade das enzimas POX, APX, CAT, SOD, PAL e PPO

Na avaliação da atividade da POX em mudas de cafeeiro, às 96 haa houve um aumento na atividade em plantas pulverizadas com Greenforce CuCa e com ASM, que se diferiram de plantas pulverizadas com água. Às 192 haa, plantas pulverizadas com Greenforece CuCa, com e sem inoculação com *C. coffeicola*, apresentaram aumento da atividade desta enzima, diferindo dos demais tratamentos (Figura 2A).

Na análise da atividade da APX, observou-se que plantas pulverizadas com os indutores ASM e Greenforce CuCa, com e sem inoculação com o patógeno, apresentaram maior atividade enzimática que plantas pulverizadas com água, em todos os períodos analisados, com exceção do período de 24 haa, o qual não diferiu entre os tratamentos testados (Figura 2B).

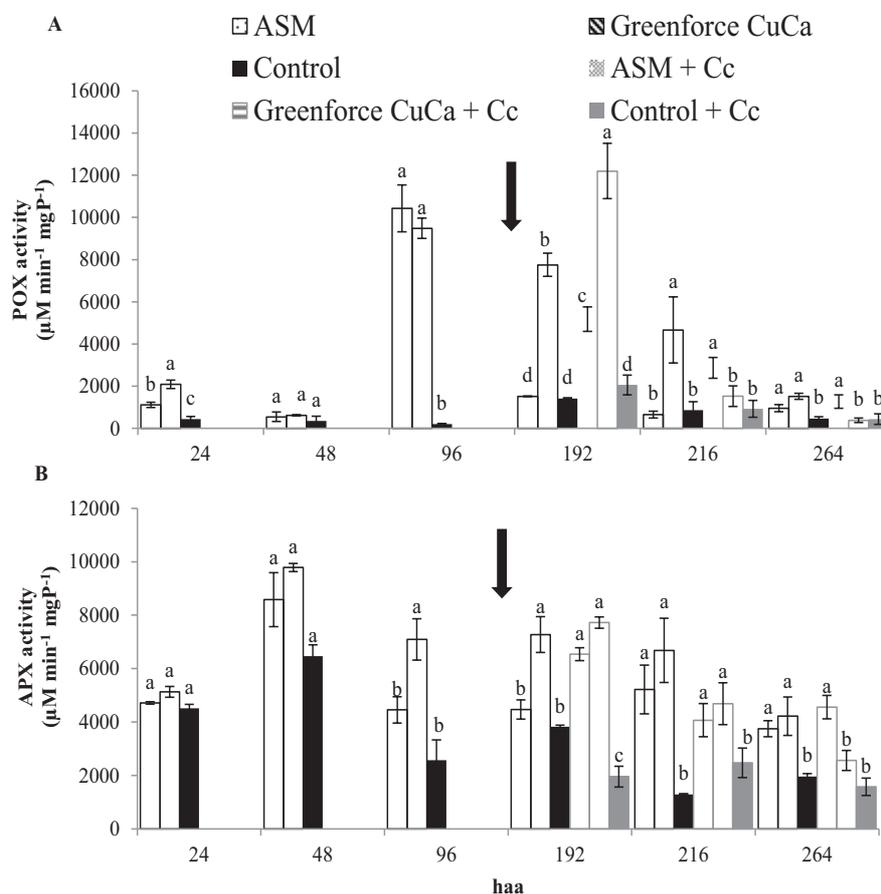


Figura 2 Atividade das enzimas peroxidase (POX) (A) e ascorbato peroxidase (APX) (B) em mudas de *Coffea arabica*. Plantas foram pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa e a testemunha foi pulverizada com água. Inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc), indicada com a seta, ocorreu às 168 horas após aplicação dos tratamentos (haa). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Barras seguidas com letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

Semelhantemente à atividade da APX, a pulverização de Greenforce CuCa e ASM proporcionou maior atividade da CAT em mudas de cafeeiro, com e sem inoculação com o *C. coffeicola*, em todos os períodos avaliados (Figura 3A).

Ao analisar a atividade da SOD, observou-se que Greenforce CuCa e ASM proporcionaram maior atividade enzimática em mudas de cafeeiro sem inoculação com o patógeno às 24, 96 e 192 haa. Nos períodos de 216 e 264 haa, plantas pulverizadas com estes indutores e inoculadas com *C. coffeicola*, apresentaram maior atividade enzimática, diferindo dos demais tratamentos (Figura3B).

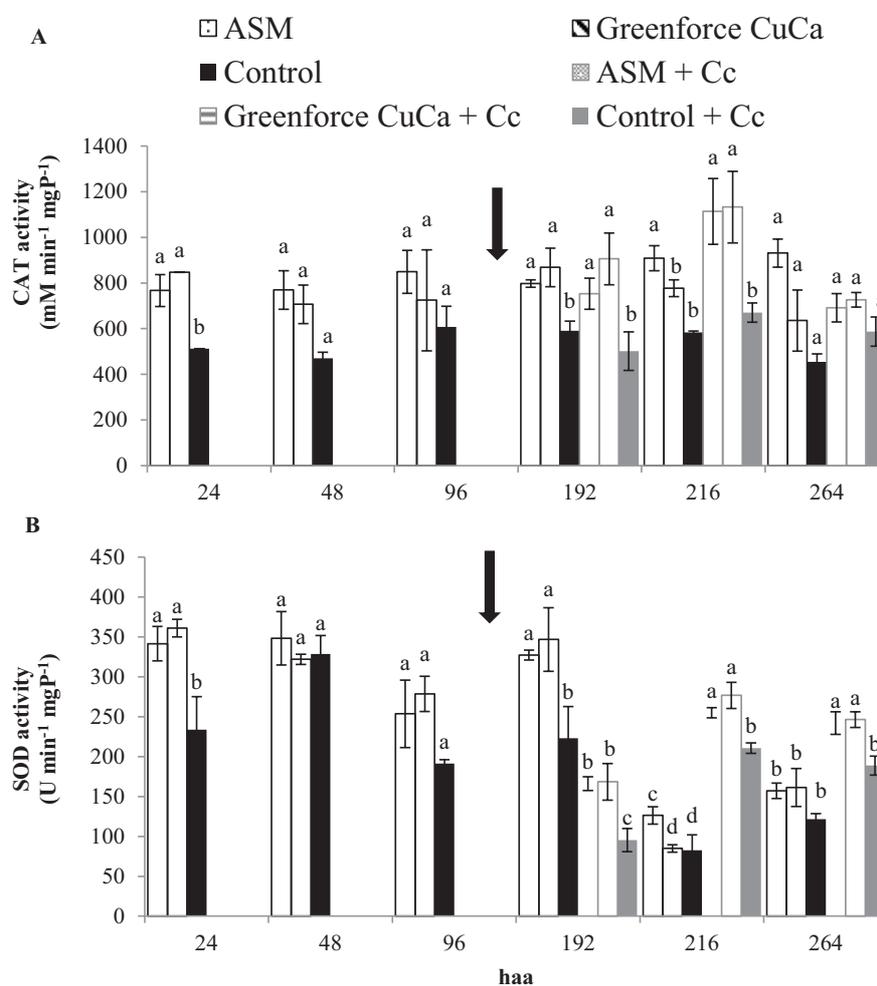


Figura 3 Atividade das enzimas catalase (CAT) (A) e superóxido dismutase (SOD) (B) em mudas de *Coffea arabica*. Plantas foram pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa e a testemunha foi pulverizada com água. Inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc), indicada com a seta, ocorreu às 168 horas após aplicação dos tratamentos (haa). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Barras seguidas com letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

Para a atividade da PAL, às 24 haa, plantas pulverizadas com Greenforce CuCa, sem inoculação do patógeno, apresentaram maior atividade desta enzima, diferindo de plantas pulverizadas com ASM e com água. Em plantas inoculadas com *C. coffeicola*, observou-se uma maior atividade da PAL para os tratamentos com Greenforce CuCa e com ASM às 216 haa (Figura 4A).

Ao analisar a atividade da PPO, foi observado que plantas pulverizadas com Greenforce CuCa e ASM apresentaram maior atividade desta enzima, com relação às plantas pulverizadas com água, às 48 haa. Já, em plantas que foram inoculadas com o patógeno, estes indutores proporcionaram aumento da atividade da PPO às 216 haa (Figura 4B).

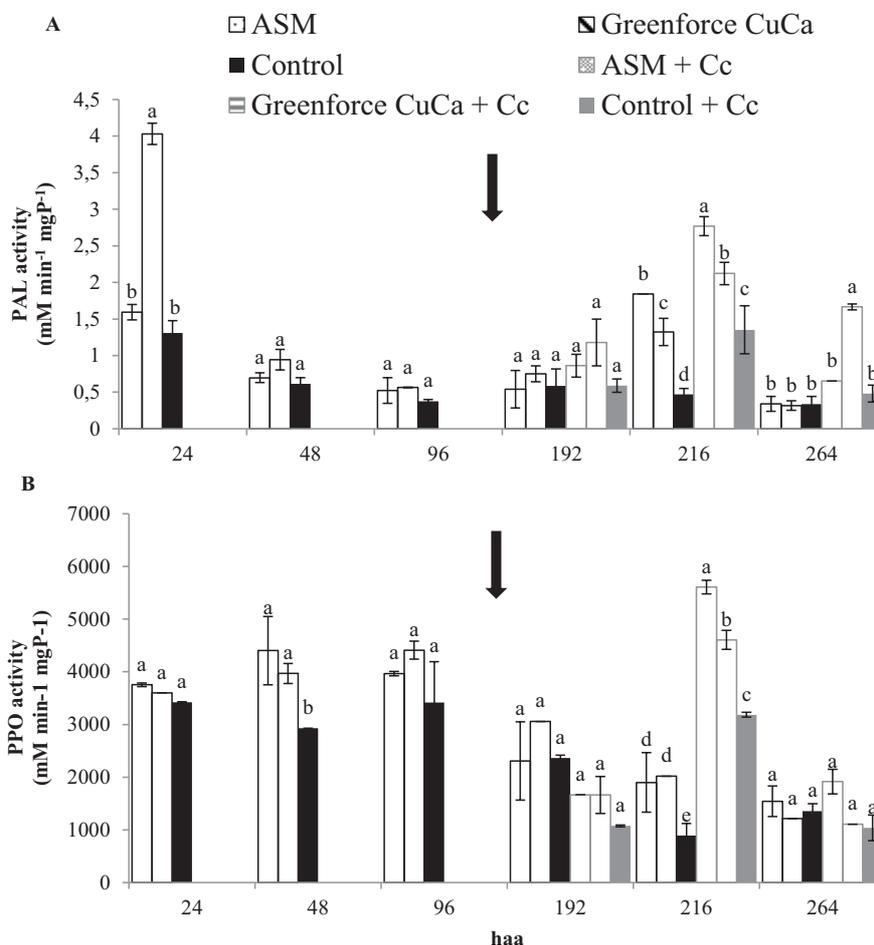


Figura 4 Atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) (A) e polifenol oxidase (PPO) (B) em mudas de *Coffea arabica*. Plantas foram pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e Greenforce CuCa e a testemunha foi pulverizada com água. Inoculação com *Cercospora coffeicola* (Cc), indicada com a seta, ocorreu às 168 horas após aplicação dos tratamentos (haa). Barras de erros representam o erro padrão da média de três blocos. Barras seguidas com letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Investigou-se o efeito de Greenforce CuCa, comparado ao indutor de resistência padrão ASM, na interação entre mudas de cafeeiro e *C. coffeicola*. Observou-se que a aplicação foliar desta formulação em mudas de cafeeiros proporcionou redução na intensidade da cercosporiose, além de induzir respostas de defesa. O Greenforce CuCa induziu o aumento da transcrição dos genes *CaPRI*, *CaGT*, *LOX* e *PAL* e, também, proporcionou um incremento na atividade das enzimas POX, APX, CAT, SOD, PAL e PPO em plantas de cafeeiro inoculadas e não inoculadas com patógeno.

Na literatura existem trabalhos que relatam o uso de formulações à base de extratos vegetais no controle de doenças em cafeeiro. Santos et al. (2007) observaram, em experimentos de campo, que extrato de folhas de café reduziu em 40% a cercosporiose do cafeeiro. Costa et al. (2014) observaram que formulação à base de subprodutos da lavoura cafeeira adicionada de nutrientes proporcionou 50% e 60% de controle da ferrugem e cercosporiose, respectivamente, em cafeeiro adulto. Pelo presente trabalho comprovou-se, por meio de dois experimentos em casa-de-vegetação, que o Greenforce CuCa proporcionou eficácia superior ao indutor de resistência padrão ASM, reduzindo em 63% a severidade da cercosporiose do cafeeiro, enquanto que ASM proporcionou controle médio de 36%.

Formulações como o Greenforce CuCa possuem eliciadores que, possivelmente, disparam respostas de defesa nas plantas. Além desses eliciadores, os nutrientes cobre e cálcio, também presentes nessa

formulação, possibilitam uma melhor nutrição da planta e, possivelmente, o aumento de sua resistência contra patógenos (DATNOFF; ELMER; HUBER, 2007). O cobre apresenta importância no sistema redox da planta, ativando várias enzimas que estão envolvidas na detoxificação de radicais superóxido e, também, no metabolismo de fenóis e lignina (MARSCHNER, 2012). A concentração de cálcio no tecido vegetal afeta a incidência de doenças por diferentes mecanismos: o cálcio desempenha um papel chave no reconhecimento de patógenos invasores na membrana plasmática, atuando como mensageiro secundário e, também, dificulta a atividade de enzimas pectolíticas que são produzidas por muitos fungos e bactérias que invadem a célula vegetal (MARSCHNER, 2012).

Espécies do gênero *Cercospora* produzem a cercosporina, uma toxina que, na presença de luz, torna-se reativa e capaz de reagir com outras moléculas. O principal alvo de reação é o oxigênio, que, ao reagir com a cercosporina, é convertido em EAOs, altamente tóxicas, podendo interagir e degradar moléculas como DNA e proteínas, além de danificarem as membranas celulares do hospedeiro (BERESTETSKIY, 2008; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005). O controle da cercosporiose proporcionado pelo Greenforce CuCa, além de uma possível indução de resistência e melhoria no estado nutricional, pode estar relacionado ao fato desse produto possuir antioxidantes em sua composição, os quais neutralizaram as EAOs, reduzindo o estresse oxidativo causado pelo patógeno e, conseqüentemente, impedindo a sua colonização.

Após o reconhecimento do patógeno, a primeira resposta de defesa da planta é a explosão oxidativa, que corresponde à geração de EAOs. As EAOs ocorrem, normalmente, no metabolismo celular, porém quando

acumuladas tornam-se tóxicas à célula. Plantas sob estresse, geralmente, usam um complexo sistema de defesa antioxidante constituído de antioxidantes não enzimáticos e um diversificado leque de enzimas, como a superóxido dismutase, catalase, peroxidase, glutathione-redutase e ascorbato peroxidase. Estas enzimas são utilizadas para limpar as EAOs e proteger as células de dano oxidativo (HOSSAIN; UDDIN, 2011). Portanto, no presente trabalho observou-se que a pulverização de Greenforce CuCa e ASM induziu mudas de cafeeiro, inoculadas ou não com *C. coffeicola*, a apresentarem maior atividade das enzimas relacionadas à limpeza de radicais livres (POX, APX, CAT e SOD).

A PPO está envolvida na oxidação de compostos fenólicos a quinonas, que são mais tóxicas aos patógenos, de maneira geral (AGRIOS, 2005). No presente trabalho, mudas de cafeeiro pulverizadas com Greenforce CuCa e com ASM apresentaram maior atividade da PPO. Este fato, provavelmente, possibilitou uma maior intensidade de defesa de mudas de cafeeiro contra a cercosporiose.

O aumento da transcrição dos genes *CaPRI*, *CaGT*, *LOX* e *PAL* serve como indicador das rotas de defesa ativadas pelo indutor de resistência e, também, pela inoculação com o patógeno. A proteína PR-1 ativa a sinalização da rota do ácido salicílico, o que irá induzir a expressão de genes de defesa, inclusive, outras proteínas relacionadas à patogênese (FU; DONG, 2013).

O gene *CaGT* codifica para a enzima salicilato glucosiltransferase, que liga a glicose ao ácido salicílico, formando o ácido salicílico glicosilado, o qual irá ativar os mecanismos de defesa dependentes do ácido salicílico (VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009; UMEMURA et

al., 2009). No presente trabalho observou-se que plantas pulverizadas com ASM apresentaram um aumento dos níveis de transcritos do gene *CaGT* às 24 haa, o que não ocorreu em plantas que foram pulverizadas com o Greenforce CuCa. Verifica-se que o ASM é análogo ao ácido salicílico, assim, plantas que receberam este tratamento certamente reconheceram este composto, levando ao aumento da expressão do gene *CaGT*. Entretanto, às 96 haa, ambos os tratamentos induziram o aumento dos níveis de transcritos deste gene.

A fenilalanina amônia-liase, codificada pelo gene *PAL*, é uma enzima chave no metabolismo dos fenilpropanoides, que resultará em compostos como fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina, conferindo maior resistência à parede celular das plantas (RAES et al., 2003).

Já a lipoxigenase, codificada pelo gene *LOX*, é uma enzima chave na rota do ácido jasmônico, que é uma das principais vias de sinalização durante respostas de defesa contra insetos e patógenos necrotróficos (PROST et al., 2005; VELLOSILO et al., 2007). Observou-se que tanto Greenfoce CuCa, quanto o ASM induziram plantas de cafeeiro a aumentarem os níveis de transcritos do gene *LOX* em plantas não inoculadas com o patógeno

Cardoso et al. (2014) observaram, por meio de técnica de microarranjo, que plantas resistentes ao bicho-mineiro diferem no perfil de expressão gênica antes mesmo do ataque do inseto, indicando que a defesa já está ativada como um mecanismo de pré-condicionamento (*priming*). Além disso, foram observados genes envolvidos na limpeza de EAOs e no metabolismo do ácido linoleico e dos fenilpropanoides. Até o momento, não há cultivares de cafeeiro com resistência à *C. coffeicola*.

Entretanto, observa-se que patógenos necrotróficos e insetos são mais sensíveis às defesas mediadas pelo ácido jasmônico e etileno, e como *C. coffeicola* é um patógeno necrotrófico, acredita-se que, possivelmente, cafeeiro resistente à cercosporiose apresentaria respostas semelhantes às encontradas nas rotas de defesa ativadas em cafeeiro resistente ao bicho-mineiro. No presente trabalho verificou-se que Greenforce CuCa induziu mudas de cafeeiro a aumentarem a atividade de enzimas do sistema antioxidante e a aumentarem os níveis de transcritos de genes envolvidos na rota do ácido salicílico (*CaPRI* e *CaGT*), ácido jasmônico (*LOX*) e na rota dos fenilpropanoides (*PAL*), em plantas com ou sem inoculação.

Na natureza, as plantas lidam com o ataque de diferentes patógenos ou insetos. Assim, as plantas precisam de mecanismos de regulação para se adaptar de forma eficaz às mudanças em seu ambiente. Este mecanismo de regulação é conhecido como *Cross talk* entre as vias de sinalização de defesa, o que permite que a planta ajuste sua resposta de defesa aos invasores (BARI; JONES, 2009; KOORNNEEF; PIETERSE, 2008).

Guzzo, Harakava e Tsai (2009) e Nardi et al. (2006) comprovaram que ASM induziu plantas de cafeeiro a expressarem genes de diversos processos relacionados à resistência contra fitopatógenos. No presente trabalho foi comparado o efeito do Greenforce CuCa com o indutor de resistência padrão, comprovando que, assim como o ASM, a formulação à base de subproduto da indústria cafeeira adicionada de cobre e cálcio ativa rotas de defesa do cafeeiro contra *C. coffeicola*, o que se pode inferir que este composto possui efeito indutor de resistência em cafeeiro.

A utilização de produtos que induzem resistência vem ganhando relevância no controle de doenças de plantas. Pelos resultados deste trabalho comprova-se que Greenforce CuCa reduz a severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro. Além disso, eles fornecem evidências de que este composto induz a transcrição de genes de defesa (*CaPRI*, *CaGT*, *LOX* e *PAL*), assim como aumenta a atividade de enzimas de limpeza após o estresse oxidativo (POX, APX, CAT, SOD e PPO) e de enzima chave na síntese de lignina e compostos fenólicos (*PAL*), comprovando que este composto é uma alternativa promissora para integrar o manejo de doenças do cafeeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luciano Vilela Paiva, por permitir o uso do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-CAFÉ), por financiar este trabalho.

**FORMULATION BASED ON BY-PRODUCTS OF THE COFFEE
INDUSTRY IN THE RESISTANCE INDUCTION OF COFFEE
PLANT TO BROWN EYE SPOT**

ABSTRACT

The search for alternative products that induce resistance in plants against pathogens is increasing. Thus, we aimed at verifying the effect of a formulation based on by-products coffee industry (Greenforce CuCa) over the control of brown eye spot (*Cercospora coffeicola*) on coffee seedlings, compared to the standard resistance inductor acibenzolar-S-methyl (ASM). In addition, we aimed at studying its effect as resistance inductor, by means of analyzing the expression of genes related to the salicylic acid pathway (*CaPRI*, *CaGT*), the jasmonic acid pathway (*LOX*) and the metabolism of the phenylpropanoids (*PAL*) and, also, the activities of defense enzymes peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO). We observed that the foliar application of Greenforce CuCa on coffee seedlings provided 63% of control over the severity of brown eye spot, while the ASM controlled 36% of the disease. Comparing Greenforce CuCa to the ASM, we proved that the Greenforce CuCa presents resistance inductor effect, since it induced the increase of the transcription of *CaPRI*, *CaGT*, *LOX* and *PAL* genes, and provided an increment in the activity of defense enzymes (POX, APX, CAT, SOD, PAL and PPO) on coffee seedling inoculated and not inoculated with *C. coffeicola*. With these results, we suggest that the Greenforce CuCa is a promising alternative to integrate brown eye spot management to coffee plants.

Keywords: *Coffea arabica*. *Cercospora coffeicola*. Resistance inductor.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic, 2005. 922 p.

BARI, R.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 473-488, Mar. 2009.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.

BERESTETSKIY, A. O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 44, n. 5, p. 453-465, Sept. 2008.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.

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**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARDOSO, D. C. et al. Large-scale analysis of differential gene expression in coffee genotypes resistant and susceptible to leaf miner-toward the identification of candidate genes for marker assisted-selection. **BMC Genomics**, London, v. 15, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/66>>. Acesso em: 10 out. 2014.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; MOURA, P. H. A. Manejo integrado da cercosporiose do cafeeiro. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)**, Belo Horizonte, v. 16, p. 1-4, 2008.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, 2012.

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

COSTA, B. H. G. et al. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 10, p. 635-642, Oct. 2014.

CUSTÓDIO, A. A. P. et al. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1067-1076, nov./dez. 2011.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 3/5, p. 194-201, 2006.

DATNOFF, L. E.; ELMER, W. E.; HUBER, D. M. **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul: APS, 2007. 278 p.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 197-206, Nov. 2005.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, Oct. 2010.

DINIZ, I. et al. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 141-157, May 2012.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 839-863, 2013.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase: I, occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, p. 309-314, 1977.

GUIMARÃES, P. T. G. et al. Cafeeiro. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; VENEGA, V. H. A. (Ed.). **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5^a aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. p. 289-302.

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, 2009.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

HOSSAIN, M. A.; UDDIN, S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 9, p. 1094-1101, 2011.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. Disponível em:
<<http://www.idtdna.com/site>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

KOLLER, W. Chemical approaches to managing plant pathogens, In: RUBERSON, J. R. (Ed.). **Handbook of integrated pest management**. New York, 1999. p. 337-376.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. Cross talk in defense signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, n. 3, p. 839-844, Mar. 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 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, n. 5, p. 1103-1106, set./out. 2002.

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. London: Academic, 2012. 651 p.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-183, Apr. 2009.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NARDI, B. et al. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 1594-1605, Dec. 2006.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, 2007.

PESSOA, W. S. et al. Efeito do tratamento hidrotérmico associado a indutores de resistência no manejo da antracnose da goiaba em pós-colheita. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 129-135, jul./set. 2007.

PROST, I. et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 139, n. 4, p. 1902-1913, Dec. 2005.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2003.

RESENDE, M. L. V. et al. 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, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: Denmark, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V. et al. Novos indutores de resistência contra doenças em cafeeiro, cacauzeiro, algodoeiro e tomateiro: perspectivas de utilização. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG: Suprema, 2007. p. 161-182.

SANTOS, F. S. et al. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, Aug. 1977.

SILVA, A. C. et al. Coffee-leaf extract and phosphites on the curative control of powdery mildew in eucalyptus mini-stumps. **Forest Pathology**, Hamburg, v. 43, n. 4, p. 297-305, Aug. 2013.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6-11, Jan. 2011.

UMEMURA, K. et al. Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically induced disease resistance in rice plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 463-472, Feb. 2009.

URBANEK, H.; KUZNIAKGEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean-leaves by botrytis-cinerea polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

VELLOSILLO, T. et al. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. **Plant Cell**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 831-846, Mar. 2007.

VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. M. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 177-206, 2009.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 40, n. 5, p. 779-784, 1965.

ARTIGO 3 Fofito de manganês na defesa do cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*: análises bioquímica e molecular

Ana Cristina Andrade Monteiro; Mário Lúcio Vilela de Resende; Thaís Cainã Teixeira Valente; Pedro Martins Ribeiro Junior; Vanessa Foresti Pereira; Josineide Rodrigues da Costa; Joyce Alves Goulart da Silva.

(Artigo submetido na European Journal of Plant Pathology)

Resumo Fosfitos (Phi) são sais inorgânicos originados do ácido fosforoso e vêm sendo utilizados como indutores de resistência, pois ativam os mecanismos de defesa latentes da planta. Objetivou-se verificar a eficácia do fosfito de manganês (MnPhi) no manejo da ferrugem (*Hemileia vastatrix*), em mudas de cafeeiro, além de elucidar seu efeito indutor de resistência, por meio da expressão de genes relacionados à defesa, como os genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL*, que codificam as enzimas peroxidase, catalase, β -1,3-glucanase e fenilalanina amônia-liase, respectivamente, e, também, por meio da atividade de enzimas de defesa, como a ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e polifenoloxidase (PPO). Foi observado que a aplicação foliar de MnPhi em mudas de cafeeiro proporcionou 63% de controle da severidade da ferrugem. Este composto induziu respostas de defesa, nas mudas de cafeeiro, pois aumentou a transcrição dos genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL* em plantas não inoculadas com o patógeno e, também, proporcionou um incremento na atividade das enzimas APX, SOD e PPO em plantas não inoculadas ou inoculadas com *H. vastatrix*. Por estes resultados sugere-se que MnPhi é uma alternativa promissora para integrar o manejo da ferrugem do cafeeiro.

Palavras-chave *Coffea arabica*; Ferrugem; Indutor de resistência; qRT-PCR; Atividade enzimática.

Abstract Phosphites (Phi) are inorganic salts of phosphorous acid which have been used as resistance elicitors, as they activate mechanisms underlying plant defense. This study assessed the effectiveness of manganese phosphite (MnPhi) in the management of rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee seedlings. We also elucidated MnPhi induction of resistance by expression of defense-related genes such as *POX*, *CAT*, *GLU* and *PAL*, encoding peroxidase, catalase, β -1.3-glucanase and phenylalanine ammonia-lyase enzymes, respectively, and by the activity of defense enzymes such as ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) and polyphenol oxidase (PPO). Foliar application of MnPhi in coffee seedlings provided 63% control of rust severity. This compound induced defense responses in seedlings with increased transcription of genes *POX*, *CAT*, *GLU* and *PAL* in non-inoculated plants and increased activity of APX, SOD, and PPO enzymes in plants inoculated with *H. vastatrix* and in non-inoculated plants. These results suggest that MnPhi is a promising alternative for the management of coffee rust.

Keywords *Coffea arabica*; Rust; Resistance elicitor; qRT-PCR; Enzymatic activity.

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura tem grande importância socioeconômica no Brasil, que é o maior produtor e exportador mundial de café. Embora a cafeicultura apresente potencial de crescimento, cafeicultores têm enfrentado problemas em razão da suscetibilidade dessa cultura a doenças. A ocorrência destas doenças é um dos fatores que contribui para a redução da produtividade e da qualidade do café, além de aumentar o custo de produção.

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. e Br., é considerada a principal doença do cafeeiro e está presente em quase todos os países produtores de café do mundo (Rozo et al. 2012). Esta doença pode reduzir a produção de 35 a 50%, quando não realizada nenhuma medida de controle (Silva et al. 2006). Estas perdas são em decorrência da formação de pústulas nas folhas, que reduzem a área fotossintética, promovem a queda precoce de folhas e a seca de ramos produtivos (Martins et al. 2004).

A maioria das cultivares de café, plantadas no Brasil, são suscetíveis à ferrugem (Carvalho et al. 2012). Assim sendo, o controle é feito, basicamente, por fungicidas que, embora eficiente, é uma medida de controle agressiva ao ambiente. Portanto, há necessidade de se intensificar a investigação e desenvolver alternativas efetivas no manejo de doenças do cafeeiro, como a ferrugem, com menor impacto ambiental.

Plantas resistentes a patógenos possuem uma elaborada rede de sinais que resultam na expressão de resposta de defesa (Daniel e Guest 2006). Uma das primeiras respostas de defesa da planta desafiada por um patógeno é a explosão oxidativa, caracterizada por uma rápida geração de espécies ativas de oxigênio (EAO's) (Thatcher et al. 2005). Posteriormente, o patógeno é confrontado com reação de hipersensibilidade, acúmulo de compostos fenólicos, como as

fitoalexinas, e a indução de barreiras estruturais e bioquímicas (Silvar et al. 2008; Goellner e Conrath 2008).

Certos compostos naturais e sintéticos estimulam respostas de defesa semelhantes às observadas em interações incompatíveis (Daniel e Guest 2006). Estes compostos são conhecidos como indutores de resistência. Desse modo, o uso de substâncias ou organismos indutores de resistência é uma alternativa no controle de doenças de plantas. A resistência induzida consiste na ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta, que pode ser um fenômeno local ou sistêmico e é efetivo contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, fungos e vírus (Van Loon et al. 1998).

Dentre os compostos químicos que vêm sendo utilizados como indutores de respostas de defesa em plantas, estão os fosfitos (Phi) (Eshraghi et al. 2011). Estes são sais inorgânicos, originados do ácido fosforoso (H_3PO_3), que têm sido formulados com sais de manganês, cobre ou zinco. Nos EUA, os Phi são registrados para o controle de Oomicetos, enquanto no Brasil são registrados como fertilizantes foliares, apresentando efeito na redução da intensidade de doenças em diversas culturas (Dalio et al. 2012; King et al. 2010).

Estudos sugerem que os Phi apresentam complexo modo de ação, incluindo efeito direto sobre o patógeno e efeito indireto, estimulando respostas de defesa do hospedeiro. Os efeitos diretos incluem a inibição do crescimento do patógeno e a redução ou alteração do seu metabolismo (King et al. 2010); enquanto o efeito indireto envolve o estímulo de mecanismos de defesa da planta, tais como o aumento da produção de fitoalexinas e EAO's, a indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR's) e o reforço da parede celular (Deliopoulos et al. 2010; Pilbeam et al. 2011; Eshraghi et al. 2011).

Existem relatos que comprovam a eficácia de produtos à base de Phi no manejo de doenças em cafeeiro. Nojosa et al. (2009) observaram redução da severidade da mancha-de-Phoma em mudas de cafeeiro pulverizadas com fosfito

de potássio e Costa et al. (2014) verificaram que MnPhi reduziu a severidade da ferrugem e cercosporiose em campo. Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a eficácia do MnPhi, comparado ao indutor de resistência padrão, no controle da ferrugem em mudas de cafeeiro. Além disso, estudar seu efeito como indutor de resistência por meio da análise da expressão de genes relacionados à defesa (*POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL*) e da atividade de enzimas de defesa (*APX*, *SOD* e *PPO*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

Para o preparo das mudas utilizadas nos experimentos, sementes de cafeeiro cv. Mundo Novo 379/19 foram semeadas em bandejas contendo areia lavada. Assim que atingiram a fase “orelha de onça”, estas foram transplantadas para sacos de polietileno de 0,50 L, contendo substrato composto por solo, areia e substrato comercial para hortaliças, na proporção 2:1:1 (v/v/v). Durante todo o período experimental, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil, sendo irrigadas periodicamente e recebendo adubações complementares, de acordo com recomendação técnica para a cultura (Guimarães et al. 1999).

2.2 Obtenção do inóculo e inoculação

Os urediniósporos de *H. vastatrix* foram obtidos a partir de folhas naturalmente infectadas de plantas de cafeeiro, os quais foram coletados, por meio de raspagem das pústulas e acondicionados em microtubos, que foram armazenados em temperatura ambiente e protegidos da luz por um período de 48 horas. Para a inoculação das plantas, foi preparada uma suspensão na concentração de 1×10^5 urediniósporos mL^{-1} de ágar-água (0,2%; p/v), contendo

Tween 20 (0,05%; v/v) (Salustiano et al. 2008). Após a pulverização da suspensão de urediniósporos na face abaxial das folhas, as mudas foram submetidas à câmara úmida, no escuro, por um período de 72 horas.

2.3 Proteção de mudas de cafeeiro contra a ferrugem

Mudas de cafeeiro com seis meses de idade foram pulverizadas com os seguintes tratamentos: MnPhi [Reforce[®] Mn (51,0% de P₂O₅ e 9,7% de Mn), produzido pela Agrichem do Brasil SA.], na dose de 5,0 mL L⁻¹ e, como tratamento padrão, utilizou-se o indutor de resistência acibenzolar-S-metil - ASM [Bion[®], produzido pela Syngenta Proteção de Cutivos Ltda], na dose 2,0 g L⁻¹, além de um controle pulverizado com água. Utilizou-se pulverizador manual para aplicação dos tratamentos e sete dias após a aplicação, as plantas foram inoculadas com *H. vastatrix*.

Quarenta dias após a inoculação, com o surgimento dos primeiros sintomas/sinais da doença, começaram-se as avaliações da ferrugem. Estas foram realizadas a cada 15 dias, totalizando seis avaliações, utilizando-se a escala diagramática proposta por Cunha et al. (2001). Em seguida, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPSD), conforme Shaner e Finney (1977).

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições e três tratamentos, sendo cada parcela experimental composta por sete plantas. Os dados de AACPSD foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira 2011) e, quando significativo pelo teste F, realizou-se o teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

2.4 Análise da expressão gênica

Mudas de cafeeiro foram pulverizadas com MnPhi (5,0 mL L⁻¹) e como controle utilizaram-se plantas pulverizadas com água. O material vegetal para

análise da expressão dos genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL* foi coletado nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos (haa). Foram coletados o primeiro e o segundo par de folhas totalmente expandidas, do ápice para a base, em cada tempo de coleta, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em freezer a -80°C . O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com três repetições e quatro plantas por repetição para cada tempo de coleta.

O RNA total dos tecidos vegetais foram extraídos, utilizando-se o protocolo Pine Tree descrito por Chang et al. (1993) e adaptado para microextração. Em cada microtubo, contendo aproximadamente 100 mg do material macerado em nitrogênio líquido, foi adicionado 1 mL de tampão de extração [CTAB (cethyltrimethylammonium bromide) 2% (p/v), PVP (polivinilpirrolidona) 2% (p/v), Tris-HCL 100 mM, EDTA 25 mM e NaCl 2 M] e 20 μL de β -mercaptoetanol. Em seguida, realizou-se homogeneização em vórtex e a mistura foi incubada por 20 minutos, a 65°C . Após esse período, foi adicionado 1 mL de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e, em seguida, agitado e centrifugado por trinta minutos a 12.000 g, a 4°C . O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo, ao qual se adicionou o mesmo volume da solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido de homogeneização e novamente centrifugação por trinta minutos, a 12.000 g, a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, e adicionado 25% deste volume de cloreto de lítio a 10 M e fez-se rápida homogeneização por inversão. As amostras foram deixadas *overnight* a -20°C , para a precipitação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, durante 30 minutos, a 12.000 g, a 4°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (v/v), seguido de uma centrifugação por 10 minutos, a 12.000 g, a 4°C . Após a lavagem, realizou-se a solubilização do RNA. O *pellet* foi ressuspenso em 20 μL de água milli-Q autoclavada e armazenado em

freezer a -80°C . A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,0%, corado com GelRedTM e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDropTM Espectrophotometer ND-100.

O RNA total foi tratado com TURBOTMDNase I (Ambion), segundo especificações do fabricante. A ausência de DNA foi verificada por meio de PCR convencional (controle negativo). As amostras contaminadas foram retratadas com o TURBOTMDNase I (Ambion), para eliminação de contaminação de DNA residual. A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,0% e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDropTM.

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

Os *primers* para qRT-PCR dos genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL* de cafeeiro, que codificam as enzimas peroxidase, catalase, β -1,3-glucanase e fenilalanina amônia-liase, respectivamente, foram desenhados utilizando-se o programa 'Primer3'. Além desses genes, foram desenhados *primers* para amplificar genes que foram usados como controle constitutivo, sendo os genes escolhidos o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e o 14-3-3 (Barsalobres-Cavallari et al. 2009) (Tabela 1).

Tabela 1 Sequências dos *primers* utilizados para a análise de qRT-PCR.

Genes	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho	
		do fragmento	Nº acesso
<i>POX</i>	F: GAAGTGAAGTCTCGGCATCC R: CAGGCAGTCTCCCCTCTTTT	151	DQ124021.1 ^a
<i>CAT</i>	F: GCAGCTGGAAACTACCCTGA R: AAGCCAAGCTGCTCATTCTC	194	DQ124022.1 ^a
<i>GLU</i>	F: ATGGCGCTCAAAATTACCAG R: ATTGGGGTATGGAAGCATGA	244	DQ124030.1 ^a
<i>PAL</i>	F: GATGGGAAAGGGCACTGATA R: GATGCCAGAGTACCCCTGAA	223	AF218454.1 ^a
<i>GAPDH</i>	F: TTGAAGGGCGGTGCAAA R: AACATGGGTGCATCCTTGCT	59	SGN- U347734 ^b
<i>14-3-3</i>	R: TGTGCTCTTTAGCTTCCAAACG CTTCACGAGACATATTGTCTTACTCAAA	75	SGN- U356404 ^b

^aNúmero de acesso de acordo com o GenBank; ^bNúmero de acesso de acordo com SOL Genomics Network; (F) sequência do primer forward; (R) sequência do primer reverse.

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

constitutivos *GAPDH* e *14-3-3*. A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método CT comparativo (Livak e Schmittgen 2001).

2.5 Análise da atividade enzimática

Neste ensaio há dois grupos de tratamentos, um corresponde às mudas de cafeeiro pulverizadas com MnPhi e água e o outro grupo corresponde a mudas pulverizadas com MnPhi e água, seguidos de inoculação com o patógeno às 168 haa. A pulverização dos tratamentos e inoculação do patógeno foi conforme descrito anteriormente. O material vegetal para análise bioquímica foi coletado nos tempos de 24, 48, 72, 192, 216 e 240 haa. Em cada tempo, foram coletados o primeiro e segundo par de folhas totalmente expandidas, do ápice para a base, de três mudas de cafeeiro por parcela. As amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise.

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas APX e SOD, amostras de 200mg de tecido foliar foram maceradas com N_2 líquido em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p), até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C , e os sobrenadantes foram utilizados para as análises enzimáticas (Biemelt et al. 1998).

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). Adicionaram-se 20 μL do extrato enzimático, ajustado para 200 μL de solução contendo fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM, peróxido de hidrogênio 0,1 mM e água. A atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 290 nm durante 1 minuto a 25°C . O coeficiente de extinção molar de $1,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da APX.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis e Ries 1977) em meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μ M, NBT 75 μ M, riboflavina 2 μ M e extrato enzimático. Após incubação por 7 minutos, em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30W, realizou-se leitura a 560 nm. Uma unidade da SOD correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

Para a obtenção do extrato para determinação enzimática da PPO, o tecido foliar foi macerado conforme descrito anteriormente. O pó obtido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 30 mM pH 7,0, EDTA 0,1 mM e água. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, por 25 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática. A atividade da PPO foi determinada conforme metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). Adicionaram-se 20 μ L do extrato enzimático, ajustado para 200 μ L de solução, contendo fosfato de potássio 70 mM pH 7,0 e catecol 20 mM. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida a 410 nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da PPO.

A proteína total de cada extrato enzimático foi mensurada, de acordo com o método de Bradford (1976), usando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, constando de dois tratamentos, no período antes da inoculação e quatro tratamentos, no período após a inoculação com *H. vastatrix*, com três repetições e parcela experimental composta por três plantas, para cada tempo de coleta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para cada período,

utilizando o software Sisvar (Ferreira 2011), e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância, para os períodos de 192, 216 e 240 haa.

3 RESULTADOS

3.1 Proteção de mudas de cafeeiro contra a ferrugem

Os tratamentos indutores de resistência, MnPhi e o ASM apresentaram redução significativa na intensidade da ferrugem, os quais diferiram estatisticamente das plantas controle, pulverizadas com água. Comparando-se os tratamentos MnPhi e o ASM, o MnPhi proporcionou maior porcentagem de controle, controlando 63% da ferrugem em mudas de cafeeiro, enquanto o ASM controlou 50% da doença (Tabela 2).

Tabela 2 Efeito dos tratamentos na área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPSD) em mudas de cafeeiro e porcentagem de controle da doença em relação ao tratamento controle.

Tratamento	AACPSD	Controle (%)
Fosfito de manganês	18,6a	63,0
Acibenzolar-S-metil	25,1a	50,0
Controle (água)	50,2b	---
CV (%)	30,2	

CV = coeficiente de variação. Tratamentos com mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

3.2 Análise da expressão dos genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL*

Na análise molecular, em que se avaliou a expressão relativa de genes de defesa, observou-se que MnPhi induziu a expressão dos genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL*. Todos estes genes apresentaram maiores níveis de expressão às 24 haa. Neste período, a expressão relativa dos genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL* foi 9, 12,

33 e 2,5 vezes superior ao tratamento controle, respectivamente. Nos demais períodos avaliados, os níveis de expressão da *PAL* e *CAT* foram semelhantes ao controle pulverizado com água ou em níveis inferiores ao controle. Entretanto, na análise da expressão dos genes *POX*, às 12 e 48 haa, e *GLU*, às 48 haa, observou-se, também, aumento dos níveis de expressão, comparados ao controle (Fig. 1).

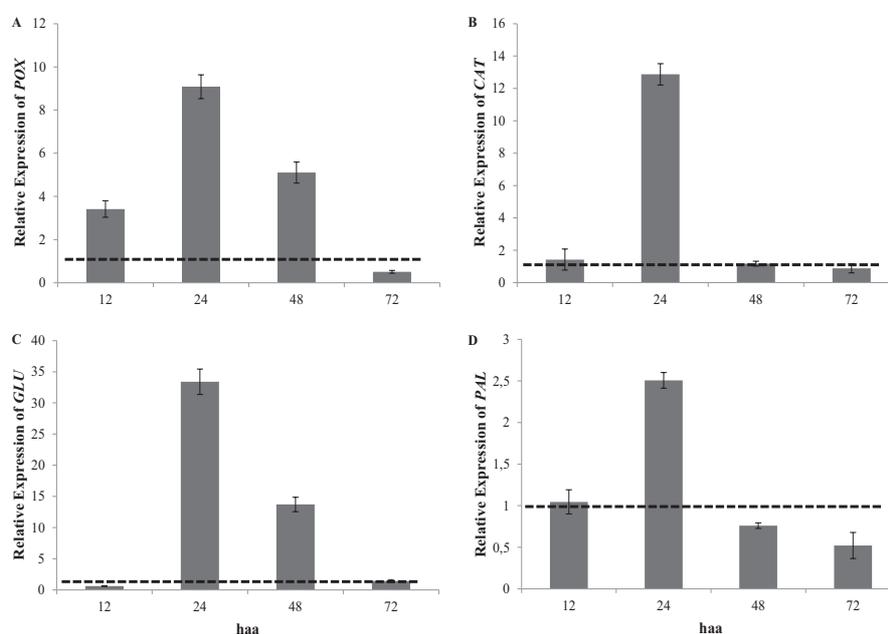


Fig. 1 Expressão relativa dos genes *POX* (A), *CAT* (B), *GLU* (C) e *PAL* (D) em mudas de *Coffea arabica* após aplicação de fosfito de manganês. haa: horas após a aplicação do tratamento. Para cada período avaliado, a expressão relativa de cada gene representa a relação de transcritos acumulados em relação ao controle, que corresponde à linha tracejada. Os genes *GAPDH* e *14-3-3* foram usados como controle constitutivo. Barras de erros representam o erro padrão da média de três repetições.

3.3 Atividade das enzimas APX, SOD e PPO

Na avaliação da atividade da APX em mudas de cafeeiro, observou-se às 24, 48 e 72 haa que plantas pulverizadas com MnPhi apresentaram maior atividade enzimática, as quais diferiram das plantas controle, pulverizadas com água. Nestes períodos, MnPhi proporcionou um incremento na atividade da APX que variou de 35 a 48%, em relação ao tratamento controle. Às 240 haa, ocorreu maior atividade da APX em plantas tratadas com MnPhi e inoculadas com *H. vastatrix* (Fig. 2A).

Ao analisar a atividade da SOD, observou-se que nos períodos antes da inoculação, nenhum dos tratamentos diferiu entre si. Entretanto, nos períodos de 24 e 48 haa, plantas pulverizadas com MnPhi apresentaram maior atividade da SOD em relação às plantas pulverizadas com água. Às 192 haa, plantas pulverizadas com MnPhi e inoculadas com *H. vastatrix* apresentaram maior atividade da SOD. Este tratamento diferiu tanto do tratamento pulverizado com água e inoculado com o patógeno quanto dos demais tratamentos sem inoculação. Neste período, o MnPhi, seguido de inoculação, proporcionou incremento de 55% na atividade da SOD, em relação ao controle inoculado com *H. vastatrix* (Fig.2B).

Para a atividade da PPO, observou-se que às 48 haa, plantas tratadas com MnPhi apresentaram maior atividade desta enzima, as quais diferiram, significativamente, das plantas pulverizadas com água. Às 192 e 216 haa, mudas de cafeeiro tratadas com MnPhi, inoculadas e não inoculadas com o patógeno apresentaram maior atividade dessa enzima, diferindo das plantas controle, inoculadas e não inoculadas. Às 240 haa, observou-se que plantas pulverizadas com MnPhi e inoculadas com *H. vastatrix* apresentaram maior atividade da PPO, proporcionando um incremento de 48%, em relação às plantas controle inoculadas com o patógeno (Fig. 2C).

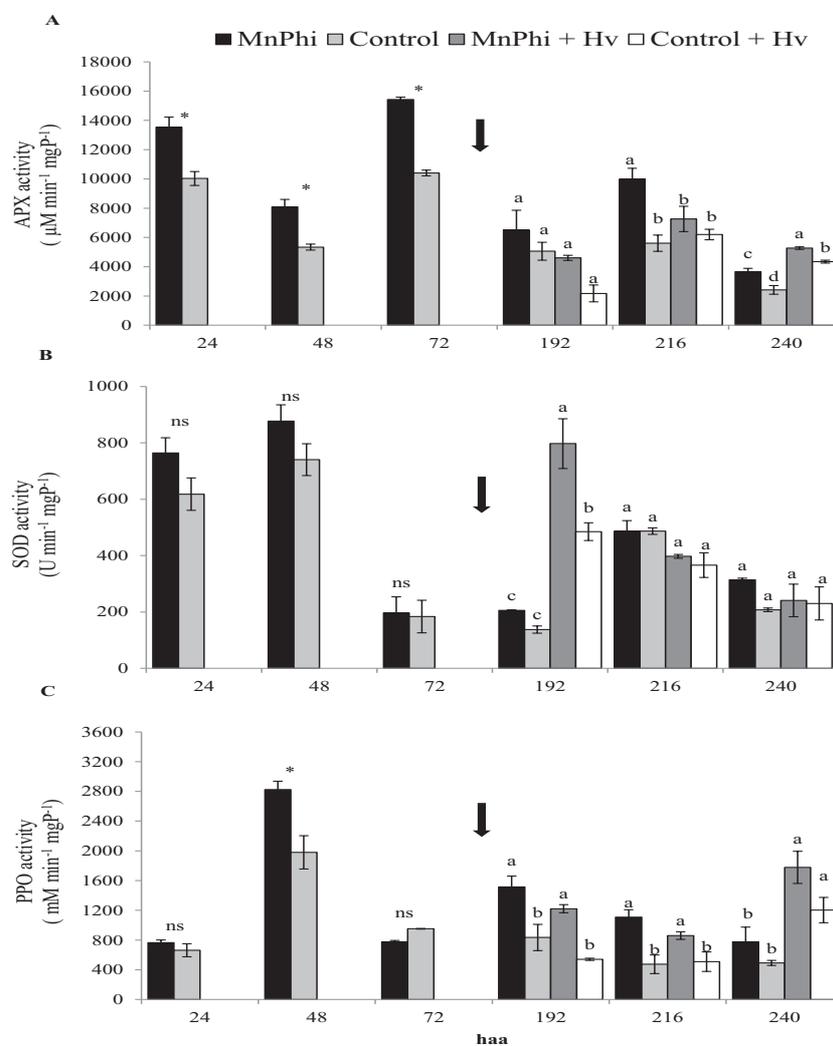


Fig. 2 Atividade das enzimas ascorbato peroxidase - APX (a), superóxido dismutase - SOD (b) e polifenol oxidase - PPO (c) em mudas de *Coffea arabica*. Plantas foram pulverizadas com fosfito de manganês (MnPhi) e o controle pulverizado com água. Setas indicam inoculação com *Hemileia vastatrix* (Hv), a qual ocorreu às 168 horas após aplicação dos tratamentos (haa). Barras de erros representam o erro padrão da média de três repetições. ns= não significativo. *significativo pelo teste F. Barras seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Investigou-se o efeito de MnPhi na interação entre mudas de cafeeiro e *H. vastatrix*. Observou-se que a aplicação foliar deste composto em mudas de cafeeiros proporcionou redução na intensidade da ferrugem, além de induzir respostas de defesa. MnPhi induziu o aumento da transcrição dos genes *POX*, *CAT*, *GLU* e *PAL* em plantas de cafeeiro não inoculadas e, também, proporcionou um incremento na atividade de enzimas de defesa (APX, SOD e PPO) em plantas inoculadas ou não inoculadas com patógeno.

Na literatura existem trabalhos que relatam o uso de Phi controlando doenças em plantas causadas por Oomicetos (Jackson et al. 2000; Daniel e Guest 2006; Eshraghi et al. 2011; Lobato et al. 2011; Machinandiarena et al. 2012). Apesar de *H. vastatrix* ser um basiodiomiceto, existem trabalhos que comprovam a eficácia de produtos à base de Phi no controle da ferrugem em lavouras cafeeiras (Dalio et al. 2012). Além disso, Costa et al. (2014) demonstraram que MnPhi reduziu em 62% a severidade da ferrugem em condições de campo. Neste trabalho comprovou-se, por meio de experimento em casa-de-vegetação, que MnPhi proporcionou eficácia semelhante ao indutor de resistência padrão acibenzolar-S-metil (ASM), reduzindo em 63% a severidade da ferrugem do cafeeiro.

Uma nutrição mineral equilibrada pode aumentar a resistência de plantas a patógenos. Apesar de Phi ser considerado um fertilizante foliar, as plantas não o utilizam como fonte de fósforo. No entanto, os compostos que acompanham esta molécula podem atuar na nutrição, como o manganês presente no MnPhi (Dalio et al. 2012). O manganês é um nutriente essencial para a planta, o qual é necessário em processos metabólicos importantes. Além disso, este elemento está envolvido na rota de biossíntese de fenóis solúveis e lignina, sendo cofator de enzimas chave na defesa da planta, como por exemplo, a fenilalanina amônia-liase; está envolvido na inibição de exoenzimas, como a pectina metilesterase,

produzida por certos fungos para degradação das paredes celulares do hospedeiro; e a Mn-superóxido dismutase é ativada pelo manganês, atuando na limpeza de EAOs (Marschner 2012; Graham e Webb 1991). Portanto, possivelmente, o manganês presente no composto em estudo contribuiu para o efeito indutor de resistência do MnPhi em mudas de cafeeiro, por meio da indução da expressão de genes de defesa, como o gene *PAL*, do incremento da atividade de enzimas, como a SOD e inibindo exoenzimas do patógeno.

Alguns autores relatam que Phi induz resistência em plantas por meio do mecanismo de “*priming*”. As respostas deste mecanismo incluem explosão oxidativa, que consiste em um rápido acúmulo de EAOs, a deposição de componentes de reforço da parede celular e aumento da transcrição de genes de defesa, dentre eles as PRs (Goellner e Conrath 2008; Eshraghi et al. 2011; Machinandiarena et al. 2012). Pelo presente trabalho comprovou-se que MnPhi induziu plantas de cafeeiro a expressarem genes de defesa, como os genes *PAL* e *GLU*, além do incremento da atividade da PPO. Neste trabalho não se avaliou a geração de EAOs, entretanto avaliou-se a expressão de genes que codificam enzimas de limpeza dessas EAOs (genes *POX* e *CAT*), assim como a atividade de enzimas de limpeza (APX e SOD), sugerindo, assim, que, possivelmente, o MnPhi induziu resistência em plantas de cafeeiro por meio do efeito “*priming*”.

As EAOs ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas, tornam-se tóxicas à célula. Plantas sob estresse, geralmente, usam um complexo sistema de defesa antioxidante constituído de antioxidantes e um diversificado leque de enzimas, como a superóxido dismutase, catalase, peroxidase, glutaciona-redutase e ascorbato peroxidase. Estas enzimas são utilizadas para limpar as EAOs e proteger as células de dano oxidativo (Hossain e Uddin 2011). Portanto, no presente trabalho observou-se que mudas de cafeeiro tratadas com MnPhi e inoculadas com *H. vastatrix*, apresentaram pico de atividade da SOD às 192 haa. Já, para a APX, estas mesmas plantas

apresentaram picos de atividades destas enzimas às 240 haa. Estes dados se correlacionam, pois o ânion superóxido é o primeiro das EAOs formado na célula e é rapidamente convertido pela SOD a peróxido de hidrogênio. A enzima APX atua, posteriormente, detoxificando o peróxido de hidrogênio (Apel e Hirt 2004; Mittler et al. 2004). Além disso, como houve aumento dos níveis de transcritos dos genes *POX* e *CAT*, os quais, provavelmente, foram transcritos em enzimas peroxidase e catalase, também, atuam na limpeza de EAOs.

As enzimas β -1,3-glucanase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase são importantes na defesa de plantas contra patógenos. A β -1,3-glucanase é uma proteína PR com ação antimicrobiana, pois é capaz de hidrolisar células da parede celular de fungos (Durrant e Dong, 2004). A fenilalanina amônia-liase é uma importante enzima na rota dos fenilpropanoides, que leva à formação de lignina e compostos fenólicos (Raes et al., 2003). Já a PPO está envolvida em reações de oxidação, a qual oxida compostos como ácido ascórbico e fenóis, aumentando, portanto, o grau de resistência à infecção (Agrios, 2005). No presente trabalho, mudas de cafeeiro pulverizadas com MnPhi apresentaram maior atividade da PPO e aumentos nos níveis de transcritos dos genes *GLU* e *PAL*, que, possivelmente, foram traduzidos em suas respectivas enzimas. Este fato, provavelmente, possibilitou uma maior defesa do cafeeiro contra a ferrugem.

O período de incubação, decorrido desde a inoculação do patógeno até o aparecimento dos primeiros sintomas, pode variar de acordo com as condições ambientais, como temperatura e umidade. Na interação cafeeiro- *H. vastatrix*, o período de incubação pode variar de 25 a 40 dias (Kushalappa et al. 1983). Neste trabalho, observou-se que o período de incubação durou 40 dias, período em que se começou a avaliação da severidade da doença. Entretanto, logo após a inoculação com *H. vastatrix*, o fungo forma diversas estruturas especializadas para a infecção, tais como tubo germinativo, apressório, hifa de penetração e

haustórios. Trabalhos mostram que a germinação dos urediniósporos cessa entre 8 e 24 horas após a inoculação (hai) e, no mesmo instante, ocorre formação do apressório. Geralmente, o início da formação da hifa de penetração ocorre por volta das 17 hai e do haustório entre 36 e 48 hai (Silva et al. 2008; Diniz et al. 2012). No presente trabalho observou-se que plantas de cafeeiro pulverizadas com MnPhi e inoculadas com *H. vastatrix* apresentaram maior atividade da SOD às 24 hai (192 haa), da PPO às 24 e 48 hai (192 e 216 haa) e da APX às 72 hai (240 haa). Comparando o processo de infecção do patógeno e a atividade enzimática, pode-se inferir que, a partir do início da formação da hifa de penetração (17 hai), possivelmente, ocorreu uma explosão oxidativa nas plantas, que levou à geração de ânion superóxido e o acúmulo de compostos fenólicos, por isso se observou maior atividade da SOD e da PPO às 24 hai. Entre 36 e 48 hai, ocorreu a formação do haustório, levando ao aumento da atividade da PPO e da APX às 48 e 72 hai, respectivamente, possivelmente em virtude do acúmulo de EAO's e de compostos fenólicos.

Após tratamento com Phi, plantas suscetíveis acabam exibindo respostas semelhantes às plantas naturalmente resistentes a determinados patógenos (Daniel e Guest 2006). Estudos têm mostrado que, para alguns genótipos de café, a resistência a *H. vastatrix* é expressa por uma grande liberação de peróxido de hidrogênio, uma rápida e localizada morte da célula vegetal associada com a restrição do crescimento dos fungos, além do aumento de compostos fenólicos e da atividade de enzimas de defesa (Silva et al. 2002; Guerra-Guimarães et al. 2003; Ramiro et al. 2009). Ramiro et al. 2009 observaram, na interação incompatível entre cafeeiro e *H. vastatrix*, uma elevada geração de peróxido de hidrogênio e aumento da transcrição de genes relacionados à patogênese às 39 horas após a inoculação do patógeno. Neste trabalho foi comprovado que MnPhi induziu a expressão dos genes de defesa

POX, *CAT*, *GLU* e *PAL* às 24 haa. Além disso, foi observado aumento da atividade das enzimas APX, SOD e PPO proporcionados por este composto.

Silva et al. (2008) demonstraram que, na interação incompatível entre cafeeiro e *H. vastatrix*, ocorrem dois picos da atividade da peroxidase. O primeiro pico ocorre antes ou no início da morte celular, sugerindo o envolvimento desta enzima na HR. O segundo pico pode estar relacionado com a lignificação do tecido hospedeiro, que ocorre por volta do quinto a sétimo dia após a inoculação. Na análise da expressão do gene *POX*, induzido por MnPhi em cafeeiro, foi observado aumento dos níveis de transcritos de 12 até às 48 haa, ocorrendo maior nível de transcritos às 24 haa. Pode-se inferir que este aumento dos transcritos do gene *POX* está relacionado com a limpeza de EAOs. Apesar da avaliação, os níveis de transcritos ter ocorrido até o terceiro dia após a aplicação do MnPhi, pode-se inferir, também, que a rota dos fenilpropanoides, que leva à formação de fenóis e lignina, foi ativada, pois houve um aumento dos transcritos do gene *PAL* e incremento da atividade da enzima PPO.

Guzzo et al. (2009) identificaram genes relacionados à resistência sistêmica adquirida (SAR) em cafeeiro suscetível após tratamento com o indutor de resistência ASM, por meio da técnica de hibridização subtrativa. Dentre estes genes, foram identificados 18% e 22% de genes que codificam proteínas relacionadas à explosão oxidativa e morte celular e que codificam proteínas antimicrobianas, respectivamente. No presente trabalho foram observadas a expressão de alguns genes de defesa em cafeeiro induzidos pelo MnPhi, inferindo-se que este composto possui efeito indutor de resistência em cafeeiro. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para se elucidar o efeito deste composto nas vias de defesa da SAR.

Pelos resultados deste trabalho comprova-se que MnPhi reduz a severidade da ferrugem em mudas de cafeeiro. Além disso, eles fornecem evidências de que este composto induz a transcrição de genes de defesa (*POX*,

CAT, *GLU* e *PAL*), assim como aumenta a atividade de enzimas de limpeza, após o estresse oxidativo (*APX*, *SOD* e *PPO*), comprovando que este composto é uma alternativa promissora para integrar o manejo de doenças do cafeeiro.

5 AGRADECIMENTOS

Ao professor Luciano Vilela Paiva, por permitir o uso do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-CAFÉ), por financiar este trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. San Diego: Academic.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biotechnology*, 55, 373-399.
- Barsalobres-Cavallari, C. F., Severino, F. E., Maluf, M. P., & Maia, I. G. (2009). Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *Bmc Molecular Biology*, 10.
- Biemelt, S., Keetman, U., & Albrecht, G. (1998). Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiology*, 116(2), 651-658.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Carvalho, V. L., Cunha, R. L. & Silva, N. R. N. (2012) Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. *Coffee Science*, 7(1), 42-49.
- Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(1), 113-116.
- Costa, B. H. G., Resende, M. L. V., Ribeiro Júnior, P. M., Mathioni, S. M., Pádua, M. A. & Silva Júnior, M. B. (2014). Suppression of rust and brown eye spot disease on coffee by phosphites and by-products of

- coffee and citrus industries. *Journal of Phytopathology*, n/a-n/a.
- Cunha, R. L., Pozza, E. A., Dias, W. P. & Barretti, P. B. (2001). Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: Simpósio Brasileiro De Pesquisa Dos Cafés Do Brasil. *Resumos Expandidos*. 1101-1108.
- Dalio, R. J. D., Ribeiro Júnior, P. M., Resende, M. L. V., Silva, A. C., Blummer, S., Pereira, V. F., Osswald, W. & Pascholati, S. F. (2012). O triplo modo de ação dos fosfitos no controle de doenças de plantas. In: *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 20, 206-243.
- Daniel, R. & Guest, D. (2006). Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3-5), 194-201.
- Deliopoulos, T., Kettlewell, P. S., & Hare, M. C. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection*, 29(10), 1059-1075.
- Diniz, I., Talhinhos, P., Azinheira, H. G., Varzea, V., Medeira, C., Maia, I., Petitot, A. S., Nicole, M., Fernandez, D. and Silva, M. D. (2012) Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 141-157.
- Durrant, W. E. & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185-209.
- Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. E. S., et al. (2011). Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60(6), 1086-1095.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042.
- Giannopolitis, C. N. & Ries S. K. (1977). Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314.
- Goellner, K. & Conrath, U. (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3), 233-242.
- Graham, D. R. & Webb, M. J. (1991) Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: Mortvedt, J. J., Cox, F. R., Shuman, L. M. & Welch, R. M. (Eds.) *Micronutrients in Agriculture* (pp. 329-370), 2nd ed. Madison, Wisconsin, USA: Soil Science Society of America Inc.
- Guerra-Guimares, L., Silva, M. C., Struck, C., Loureiro, A., Nicole, M., Rodrigues, C. J., Jr., et al. (2003). Chitinase activity in the intercellular fluido f coffea-rust interactions. In: *Eighth international congress of*

- plant pathology*, Christchurch, New Zealand.p. 199.
- Guimarães, P. T. G., Garcia, A. W. R., Venegas, V. H. A., Prezotti, L. C., Viana, A. S., Miguel, A. S., Malavolta, E., Corrêa, J. B., Lopes, A. S., Nogueira, F. D., Monteiro, A. V. C. & Oliveira, J. A. (1999). Cafeeiro. In: Ribeiro, A. C., Guimarães, P. T. G. & Venega, V. H. A. (eds), *Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação* (pp. 289-302). Viçosa, MG, Brazil: CFSEMG.
- Guzzo, S. D., Harakava, R., & Tsai, S. M. (2009). Identification of Coffee Genes Expressed During Systemic Acquired Resistance and Incompatible Interaction with *Hemileia vastatrix*. *Journal of Phytopathology*, 157(10), 625-638.
- Hossain, M. A. & Uddin, S. N. (2011). Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: Morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Australian Journal of Crop Science*, 5(9), 1094-1101.
- Jackson, T. J., Burgess, T., Colquhoun, I., & Hardy, G. E. S. (2000). Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 49(1), 147-154.
- Kar, M. & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57(2), 315-319.
- King, M., Reeve, W., Van der Hoek, M. B., Williams, N., McComb, J., O'Brien, P. A., et al. (2010). Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(6), 425-435.
- Kushalappa, A. C., Akutsu, M. and Ludwig, A. (1983). Application of survival ratio for monocyclic process of hemileia-vastatrix in predicting coffee rust infection-rates. *Phytopathology*, 73(1), 96-103.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lobato, M. C., Machinandiarena, M. F., Tambascio, C., Dosio, G. A. A., Caldiz, D. O., Daleo, G. R., et al. (2011). Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 130(2), 155-163.
- Machinandiarena, M. F., Lobato, M. C., Feldman, M. L., Daleo, G. R., & Andreu, A. B. (2012). Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, 169(14), 1417-1424.
- Marschner H. (2012) *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd ed., London: Academic Press, p. 651.
- Martins, M., Mendes, A. N. G. & Alvarenga, M. I. N. (2004). Incidência de pragas e doenças em agroecossistemas de café orgânico de agricultores

- familiares em Poço Fundo, MG. *Ciência e Agrotecnologia*, 28(6), 1306-1313.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
- Nojosa, G. B. A., Resende, M. L. V., Barguil, B. M., Moraes, S. R. G. & Vilas Boas, C. H. (2009). Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra mancha de Phoma. *Summa Phytopathologica*. 35(1), 60-62.
- Pilbeam, R. A., Howard, K., Shearer, B. L., & Hardy, G. (2011). Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees-Structure and Function*, 25(6), 1121-1131.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J. H., Peer, Y. V. & Boerjan, W. (2003). Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(3), 1051-1071.
- Ramiro, D. A., Escoute, J., Petitot, A. S., Nicole, M., Maluf, M. P., & Fernandez, D. (2009). Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*, 58(5), 944-955.
- Rozo, Y., Escobar, C., Gaitan, A., & Cristancho, M. (2012). Aggressiveness and Genetic Diversity of *Hemileia vastatrix* During an Epidemic in Colombia. *Journal of Phytopathology*, 160(11-12), 732-740.
- Salustiano, M., Ampelio, E., Ferraz, A., Botelho, A. & Alves, E. (2008). Variability in ten populations of *Hemileia vastatrix* for germination and germinative tube length under four temperatures. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(5), 1651-1656.
- Shaner, G. & Finney, R. F. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*, 67(8), 1051-1056.
- Silva, M. C., Guerra-Guimaraes, L., Loureiro, A. & Nicole, M. R. (2008). Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), 29-38.
- Silva, M. C., Nicole, M., Guerra-Guimaraes, L., & Rodrigues, C. J. (2002). Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(4), 169-183.

- Silva, M. C., Várzea, V., Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H. G., Fernandez, D., Petitot, A.-S., et al. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*, 119–147.
- Silvar, C., Merino, F., & Diaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, *165*(10), 1120-1124.
- Thatcher, L. F., Anderson, J. P., & Singh, K. B. (2005). Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology*, *32*(1), 1-19.
- van Loon, L. C., Bakker, P., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, *36*, 453-483.

(VERSÃO PRELIMINAR)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cada vez mais a sociedade tem se mostrado preocupada com o meio ambiente, exigindo um modelo de sustentabilidade no qual se deve usar o mínimo de agroquímicos possível e produtos de menor toxicidade para combater doenças de plantas. Assim, a utilização de indutores de resistência no manejo de doenças de plantas representa um método alternativo e eficaz.

Indutores de resistência, como fosfitos e formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica, vêm sendo estudados e mostram resultados promissores. Assim, empresas buscam inovar seus produtos, por meio de combinações de extratos vegetais com produtos comerciais, como os fosfitos, a fim de promover maior eficiência pela combinação do modo de ação desses produtos.

No presente estudo, verificou-se que fontes de fosfitos e formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica proporcionaram controle da ferrugem e cercosporiose tanto em plantas de cafeeiro adultas quanto em mudas. Em condições de campo, observou-se que as associações destes produtos com fungicida foram eficazes no controle destas doenças e na maior retenção foliar e maior produtividade. Nas análises bioquímica e molecular, comprovou-se que Greenforce CuCa e fosfito de manganês induziram o aumento da transcrição dos genes de defesa e, também, proporcionaram um incremento na atividade das enzimas de defesa em mudas de cafeeiro.

Pelos resultados observados indica-se que fosfitos ou formulações à base de subprodutos da lavoura cafeeira e da indústria cítrica podem ser utilizados no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro. Entretanto, fica a cargo das instituições de pesquisa, empresas privadas e pesquisadores, dentre outros, maior empenho e estudos dentro dessa área que a cada dia se mostra mais promissora.