



GUILHERME AUGUSTO TEIXEIRA TASSONE

**GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* L. DO BANCO ATIVO DE
GERMOPLASMA RESISTENTES A DOENÇAS**

**LAVRAS – MG
2021**

GUILHERME AUGUSTO TEIXEIRA TASSONE

**GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* L. DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA
RESISTENTES A DOENÇAS**

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

Pesq. Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho
Orientador

Pesq. Dr. Cesar Elias Botelho
Coorientador

**LAVRAS – MG
2021**

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

Tassone, Guilherme Augusto Teixeira.

Genótipos de *Coffea arabica* L. do banco ativo de germoplasma
resistentes a doenças / Guilherme Augusto Teixeira Tassone. – 2020.
57 p. : il.

Orientador: Gladyston Rodrigues Carvalho.

Coorientador: Cesar Elias Botelho.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Cafeeiro. 2. *Hemileia vastatrix* Berk et Br. 3. *Pseudomonas syringae*
pv. *garcae*. I. Carvalho, Gladyston Rodrigues. II. sobrenome, nome. III.
Título.

GUILHERME AUGUSTO TEIXEIRA TASSONE

**GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* L. DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA
RESISTENTES A DOENÇAS**

***Coffea arabica* L. GENOTYPES FROM THE ACTIVE BANK OF GERMPLASM
RESISTANT TO DISEASES**

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

APROVADA em 27 de agosto de 2020.

Dra. Juliana Costa de Rezende Abraão	EPAMIG
Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Dr. João Paulo Felicori Carvalho	UNICERP
Dr. Cesar Elias Botelho	EPAMIG

Pesq. Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho
Orientador

Pesq. Dr. Cesar Elias Botelho
Coorientador

**LAVRAS – MG
2021**

*Aos meus pais Benedito Tassone e Marcia
Zulian Teixeira Tassone que são meus
maiores exemplos de vida.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela graça de ser abençoado com amigos, família, saúde e paz.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Agricultura (DAG) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pelo apoio à estrutura de trabalho. Aos meus colegas e amigos de trabalho do grupo de pesquisa do café da EPAMIG, pela amizade ajuda e companheirismo.

Ao Departamento de Fitopatologia (DFP) pelo apoio, estrutura de trabalho, e aos colegas do departamento pela amizade, companheirismo e colaboração.

Ao Consórcio Pesquisa Café, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café INCT-Café, pela disponibilidade à estrutura e aos recursos.

A Agência de Inovação do Café (InovaCafé), pelo apoio, estrutura, e aos meus amigos do Núcleo de Estudos em Cafeicultura (NECAF) pela convivência, aprendizagem, companheirismo e colaboração.

Ao meu orientador pesquisador Dr. Gladyston Carvalho, pelos ensinamentos e orientações, por ser para mim um exemplo de profissional e pela amizade e parceria. Ao meu coorientador, pesquisador Dr. Cesar Elias Botelho pelos ensinamentos, orientações e apoio.

à Dra. Deila Magna dos Santos Botelho, Dr. Vinicius Teixeira de Andrade e Dra. Juliana Costa de Rezende Abrahão pela amizade, companheirismo ensinamentos e contribuições.

Ao pesquisador Dr. André Dominghetti Ferreira, pela amizade, companheirismo e convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de produtividade nível 2 ao orientador.

A todos os meus familiares, amigos e à minha namorada Samantha Brettas Oliveira pelo apoio e companheirismo.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

As doenças do cafeeiro causam prejuízos diretos e indiretos ao produtor. O dano direto é na queda de produtividade e o indireto refere-se ao aumento no custo de produção pela realização do controle. Dessa forma, o desenvolvimento de cultivares resistentes é preponderante para o sistema produtivo, na busca constante pela eficiência e consequente rentabilidade do cafeicultor. Atualmente tem-se à disposição inúmeras cultivares resistentes, principalmente para a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). Entretanto, para a mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), há somente uma cultivar registrada resistente à doença, no caso da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), nenhuma cultivar registrada apresenta resistência até o momento. Portanto novas fontes de resistência precisam ser identificadas para inserir alelos dessas características e potencializar o uso da resistência genética. Nesse contexto, o estudo de acessos de cafeeiro do Banco Ativo de Germoplasma de Minas Gerais (BAG) é fundamental, pois contém variabilidade genética e fenotípica a qual pode ser intensamente trabalhada, justificando sua importância para o melhoramento genético. Diante do exposto, os objetivos do trabalho foram verificar a existência de variabilidade genética entre 28 acessos e selecionar genitores para serem usados em cruzamentos na geração de variabilidade com foco em resistência à ferrugem, cercosporiose e bacteriose do cafeeiro. Adicionalmente, procurou-se verificar se a constituição enzimática e de compostos bioativos presentes nos cafeeiros são correlacionados com a resistência a essas doenças. Os 28 acessos do BAG foram avaliados em experimentos de triagem para resistência à ferrugem do cafeeiro (foram utilizados a cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 como padrão de susceptibilidade e a cultivar Catiguá MG 2 como padrão de resistência) e para resistência à mancha aureolada do cafeeiro. Com os resultados da triagem, selecionaram-se 15 acessos mais promissores quanto à resistência de ambas as doenças. Os acessos selecionados na triagem foram utilizados, em três experimentos, para resistência à ferrugem do cafeeiro, mancha aureolada e a cercosporiose, com a ‘Catuaí Vermelho IAC 99’, como padrão de suscetibilidade e a ‘Catiguá MG 2’ como padrão de resistência no experimento de ferrugem. Para resistência à ferrugem, foram selecionados oito acessos com resistência completa e, para a mancha aureolada, cinco acessos com resistência moderada. Para cercosporiose, não foi possível selecionar nenhum acesso, porque não se obteve variabilidade genética para a resistência. Foram analisadas atividade constitutiva das enzimas peroxidase (POX), polifenol oxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL) e os teores dos compostos bioativos ácido clorogênico, cafeína, trigonelina, fenóis totais e lignina visando relacionar essas substâncias com a resistência às doenças avaliadas. Não se observou correlação entre a composição constitutiva e a resistência para ferrugem, mancha aureolada e cercosporiose. Foram identificados dois acessos com resistência simultânea à ferrugem e à mancha aureolada. Portanto os resultados são promissores para o uso nos programas de melhoramento genético com foco no desenvolvimento de cultivares resistentes.

Palavras-chave: Cafeeiro. *Hemileia vastatrix* Berk et Br. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. *Cercospora coffeicola* Berk e Cook. Resistência múltipla.

ABSTRACT

Coffee diseases cause direct and indirect losses to the producer, respectively, consisting of decreased productivity and increased production cost due to the control employed. Thus, the development of resistant cultivars is preponderant for the productive system in the constant search for the coffee producer's efficiency and consequent profitability. Currently, numerous resistant cultivars are available, especially against coffee rust (*Hemileia vastatrix*). However, only one cultivar has been found to resist the aureolate spot (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) and none that resist cercosporiosis (*Cercospora coffeicola*). Therefore, new sources of resistance must be identified to insert alleles and enhance genetic resistance. In this context, the study of coffee accessions from the Active Germplasm Bank of Minas Gerais (BAG in Portuguese) is essential since it contains genetic and phenotypic variability, which can be intensively worked on justifying its importance for genetic improvement. Given the above, the study's objectives were to verify the existence of genetic variability among 28 accessions and select parents to be used in crosses in the generation of variability, focusing on rust, cercosporiosis, and coffee bacteriosis resistance. Additionally, we verified if the enzymatic constitution and bioactive compounds present in coffee trees are correlated with resistance to these diseases. The 28 accessions of BAG were evaluated in screening experiments for resistance to coffee rust (cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 was used as a susceptibility standard and Catiguá MG 2 as a resistance standard) and to the aureolated coffee spot. The screening results allowed the selection of the 15 most promising approaches regarding the resistance to both diseases. The accessions selected in the screening were used in three experiments for resistance to coffee rust, aureolous spot, and cercosporiosis, using 'Catuaí Vermelho IAC 99' as a susceptibility standard and 'Catiguá MG 2' as a resistance standard in the rust experiment. We selected eight accessions with complete resistance to rust and five with moderate resistance to aureolate spot. It was impossible to select any accessions for cercosporiosis because there was no genetic variability for resistance. The constitutive activity of the enzymes peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO), and phenylalanine ammonia lyase (PAL) and the contents of the bioactive compounds chlorogenic acid, caffeine, trigonelline, total phenols, and lignin were analyzed and compared to the resistance to the diseases. There was no correlation between the constitutive composition and resistance to rust, aureolus spot, and cercosporiosis. We identified two accessions with simultaneous resistance to rust and aureolate spot. Therefore, the results are promising for use in breeding programs focusing on the development of resistant cultivars.

Keywords: Coffee tree. *Hemileia vastatrix* Berk et Br. *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. *Cercospora coffeicola* Berk and Cook. Multiple resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Severidade de ferrugem em função das avaliações com intervalo de sete dias nos genótipos testados.....	37
Figura 2 -	Severidade de Mancha-Aureolada em função das avaliações com intervalo de sete dias nos genótipos testados.....	41
Figura 3 -	Severidade de cercosporiose em função das avaliações com intervalo de sete dias nos genótipos testados.	43
Figura 4 -	Gráfico dos teores constitutivos na folha dos 17 tratamentos, A - teores constitutivos de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em (%), B - teores constitutivos de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em (%), e C - atividade constitutiva das enzimas PPO, POX, e PAL, em (AE $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$).	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identificação e genealogia dos 15 genótipos selecionados da triagem e mais duas testemunhas.	26
Tabela 2 -	Identificação e genealogia dos 15 acessos selecionados da triagem e mais uma testemunha de suscetibilidade.	28
Tabela 3 -	Estimativa dos parâmetros genéticos, para a severidade da ferrugem (<i>Hemileia vastatrix</i>), nos acessos do banco ativo de germoplasma de Minas Gerais, Patrocínio-MG.	35
Tabela 4 -	Seleção dos acessos do BAG quanto à resistência a ferrugem, com valor genotípico (u+g), ordenamento quanto à resistência, severidade final em (%), classificação de resistência, porcentagem de plantas resistentes (R%) e ganho de seleção geral (GSg%) e em relação à testemunha (GSt%).....	36
Tabela 5 -	Estimativa dos parâmetros genéticos, para a severidade da mancha-aureolada (<i>Pseudomonas siringae</i> pv. <i>garcae</i>), nos acessos do banco ativo de germoplasma de Minas Gerais, Patrocínio-MG.	39
Tabela 6 -	Seleção dos acessos do BAG quanto à resistência à <i>Pseudomonas siringae</i> pv. <i>garcae</i> , com valor genotípico (u+g), ordenamento quanto à resistência, severidade final em (%), porcentagem de plantas resistentes (R%) e ganho de seleção geral (GSg%) e em relação à testemunha (GSt%).	40
Tabela 7 -	Estimativa dos parâmetros genéticos, para a severidade da cercosporiose (<i>Cercospora coffeicola</i>), nos acessos do banco ativo de germoplasma de Minas Gerais, Patrocínio-MG.....	42
Tabela 8 -	Estimativa dos parâmetros genéticos da atividade das enzimas PAL, POX e PPO, teores de trigonelina, ácido clorogênico, cafeína, compostos fenólicos totais e lignina nos acessos do banco ativo de germoplasma de Minas Gerais, Patrocínio-MG.....	44
Tabela 9 -	Coeficiente de correlação de Pearson entre os dados de atividade das enzimas PAL, POX e PPO, teores de trigonelina, ácido clorogênico, cafeína, compostos fenólicos totais e lignina para as doenças ferrugem, cercosporiose e mancha-aureolada do cafeeiro avaliada em diferentes acessos.	46

ANEXO A

Tabela 1 - Triagem de 30 genótipos para resistência à ferrugem <i>H. vastatrix</i> e mancha-aureolada <i>P. syringae</i> pv. <i>garcea</i> ., com valor genético (u+g) da severidade média da doença.	57
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Cultura do café	16
2.2	Ferrugem alaranjada do cafeeiro	17
2.2.1	Mecanismos e fontes de resistência à ferrugem	18
2.3	Cercosporiose do cafeeiro	19
2.3.1	Mecanismos e fontes de resistência à cercosporiose	20
2.4	Mancha-aureolada do cafeeiro	21
2.4.1	Mecanismos e fontes de resistência à bacteriose	22
2.5	Sistema de defesa das plantas	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Triagem para resistência às doenças	24
3.1.1	Triagem de genótipos de cafeeiro visando à resistência à ferrugem	24
3.1.2	Triagem de genótipos de cafeeiro visando a resistência à mancha-aureolada do cafeeiro	25
3.2	Seleção de acessos resistentes às doenças	25
3.2.1	Experimento de resistência à ferrugem	26
3.2.2	Experimento de resistência à mancha-aureolada	27
3.2.3	Experimento de resistência à cercosporiose	28
3.3	Seleção de acessos resistentes à doença	29
3.4	Quantificação de parâmetros relacionados à defesa constitutiva dos genótipos de cafeeiro selecionados	30
3.4.1	Determinação do teor de fenóis totais e lignina	30
3.4.2	Determinação do perfil dos compostos bioativos ácido clorogênico, cafeína e trigonelina por HPLC	31
3.4.3	Determinação da atividade das enzimas, peroxidase (POX), polifenol oxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL)	32
3.4.4	Análise estatística dos compostos bioativos e enzimáticos	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Seleção de acessos resistentes à ferrugem	34
4.2	Seleção de acessos resistentes à mancha-aureolada	38
4.3	Seleção de acessos resistentes à cercosporiose	41
4.4	Relação entre resistência à doença e composição constitutiva	43
4.5	Considerações do potencial dos acessos selecionados no melhoramento genético do cafeeiro	48
5	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A - TABELA	57

1 INTRODUÇÃO

Apesar da cafeicultura ter grande expressão no Brasil com estimativa no ano de 2020 de produção de 59 milhões de sacas e renda bruta de 25,5 bilhões de reais (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2020), a cafeicultura enfrenta diversas doenças, causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, que assolam o cafeeiro e provocam prejuízos significativos como redução de produtividade e qualidade (POZZA *et al.*, 2010). Dentre as diversas doenças incidentes no cafeeiro, a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) e a mancha-aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.) se destacam pelos danos causados e abrangência geográfica dessas doenças, as quais ocorrem em praticamente todo o parque cafeeiro. Esses danos envolvem toda a cadeia produtiva, desde a produção das mudas, implantação e desenvolvimento da lavoura, produtividade até a qualidade do produto final.

Na maior parte dos casos, o manejo é realizado por meio do controle químico, que, apesar de muito eficiente, possui desvantagens, como o custo elevado dos defensivos, danos ao meio ambiente e à saúde do trabalhador. Contudo, por meio do manejo integrado, o produtor pode manejar a lavoura, aliando nutrição, espaçamento, controle químico, resistência genética de plantas, dentre outras técnicas, de tal forma que as doenças e pragas são controladas e altas produtividades são obtidas (MESQUITA *et al.*, 2016). Entre essas medidas, a utilização de cultivares resistentes é uma das alternativas mais promissoras, pois proporciona ótimos resultados, reduz custo e diminui os impactos com o meio ambiente, tornando essa prática desejável para a sustentabilidade da cafeicultura.

Atualmente existem várias cultivares registradas resistentes a doenças, principalmente, a ferrugem, para a qual existem cultivares com resistência completa ou vertical, como o Catiguá MG 2, IAC 125 RN, IAC Catuaí SH₃ e com resistência incompleta ou Horizontal, como “Catucaí” e “Icatu” (DEL GROSSI *et al.*, 2013; ESQUES; COSTA, 1983; FAZUOLI *et al.*, 2018, 2019). Para a mancha-aureolada, a cultivar comprovadamente resistente é o IPR 102 (SERA *et al.*, 2017). Para a cercosporiose, existem poucos estudos, mas algumas cultivares apresentaram tolerância, como a Sarchimor MG8840 (BOTELHO *et al.*, 2017). É importante lembrar que a cercosporiose é uma doença cuja expressão é influenciada pelo equilíbrio nutricional das plantas (POZZA *et al.*, 2001), fato que precisa ser considerado na avaliação da resistência. Para essas doenças, a maioria do germoplasma de café arábica é constituída de descendentes de “Híbrido de Timor” (HT), “Icatu” e BA-10 doador do gene SH₃ (BOTELHO *et al.*, 2017; CONCEIÇÃO; FAZUOLI; BRAGHINI, 2005; DEL GROSSI

et al., 2013; ITO *et al.*, 2008). O HT não está disponível no mercado, entretanto é amplamente utilizado em programas de melhoramento genético visando à resistência a doenças.

Portanto, para a ferrugem do cafeeiro, a situação é um pouco menos preocupante, pois existem boas cultivares com variados níveis de resistência, graças aos trabalhos desenvolvidos pelas instituições de pesquisa desde a década de 1950 no Brasil. Porém, quando se analisa o panorama para as outras duas doenças, a situação é crítica e precisa de atenção para reforçar os projetos no desenvolvimento de cultivares resistentes. Esse processo se inicia na escolha dos genitores, a serem usados em cruzamentos, passa pelo processo de seleção em casa de vegetação e no campo e termina com a validação das cultivares em campo para uso dos agricultores. O desenvolvimento de uma nova cultivar pode levar de 15 a 20 anos e precisa ser conduzido com critério pelos custos envolvidos e pelo risco de no fim não se obter a cultivar desejada. Para se tomar decisões acertadas no decorrer do melhoramento, precisamos é importante conduzir experimentos precisos e determinar alguns parâmetros genéticos que auxiliarão os melhoristas. As cultivares podem ter resistência única a uma doença ou múltipla. A resistência múltipla é desejável, pois une, em uma única cultivar, alelos de diferentes resistências, porém aumenta o desafio de obtenção. Analisando-se as cultivares à disposição, acredita-se que elas devem ter preferencialmente algum nível de resistência à ferrugem, seja ela completa ou moderada. Adicionalmente, a resistência à cercosporiose e à bacteriose é desejável.

A seleção e avaliação de plantas resistentes podem ser realizadas em campo e em casa de vegetação. Esses trabalhos devem ser conduzidos concomitantemente e possuem vantagens e limitações. Os experimentos controlados em casa de vegetação possuem a vantagem de se proceder à inoculação controlada da doença, garantindo que todas as plantas testadas estejam sujeitas à mesma pressão do inoculo, evitando-se escapes e falsos positivos de resistência. Entretanto as plantas não são avaliadas onde serão utilizadas pelos produtores. Além disso, a avaliação em ambientes fechados permite avaliar apenas plantas jovens, não considerando os estresses no campo e o da produção de frutos, porém são muito eficientes na identificação acurada de fontes de resistência. No campo, tem-se a oportunidade de avaliar a adaptação das progênies nos ambientes de cultivo e seu desempenho quanto à resistência em condições naturais, maior variabilidade do patógeno e forte influência ambiental.

Como o melhoramento é um processo contínuo de desenvolvimento de cultivares e criação de nova variabilidade, é imprescindível a procura por novas fontes de resistência para essas doenças. Há uma grande variabilidade genética de genótipos de cafeeiro em bancos de germoplasma no Brasil, como o Banco Ativo de Germoplasma de Minas Gerais, localizado

no Campo Experimental de Patrocínio (CEPC), da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), que atualmente conta com 1596 acessos de *Coffea spp.*. Dentre esses acessos, existem genótipos com potencial, para características de interesse econômico, como a resistência a doenças e qualidade de bebida superior (BOTELHO *et al.*, 2017; FASSIO *et al.*, 2019) e, também, pode ser que existam acessos com outras características de interesse, como a tolerância ao déficit hídrico, adaptação à mecanização, dentre outras. Essa variabilidade genética ainda não foi totalmente explorada, e os pesquisadores necessitam de mais informações para utilizar essas características de interesse no programa de melhoramento do cafeeiro.

Diante do exposto, os objetivos do trabalho foram verificar a existência de variabilidade genética entre os acessos avaliados e selecionar genitores para serem usados em cruzamentos na geração de variabilidade com foco em resistência à ferrugem, cercosporiose e bacteriose do cafeeiro. Adicionalmente, procurou-se verificar se a constituição enzimática e de compostos bioativos presentes nos cafeeiros são relacionados com a resistência a essas doenças.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do café

Existem 124 espécies do gênero *Coffea* (DAVIS *et al.*, 2011), porém apenas duas espécies são cultivadas comercialmente e em larga escala, *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta), sendo que o arábica é autógama com 5 a 15% de fecundação cruzada e tetraploide com $2n = 44$ cromossomos e o robusta, uma espécie alógama com 100% de fecundação cruzada e diploide com $2n = 22$ cromossomos (NOIROT *et al.*, 2015).

O café arábica é a espécie mais cultivada no Brasil, ocupa aproximadamente uma área plantada de 1.733.120,0 ha com produção de 34,4 milhões de sacas. Já o *C. canephora* ocupa 398.810,0 ha de área plantada e produção de 14,5 milhões de sacas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2019), sendo, em sua maioria, da variedade Kouillou (Conilon) e robusta, principalmente na região Norte do País.

O café é cultivado em vários estados brasileiros e com diversos sistemas produtivos diferentes, como cafeicultura de montanha, irrigada, mecanizada, sombreada, dentre outros. Independente do sistema produtivo e região de cultivo, o cafeeiro possui uma produtividade potencial, definida pela genética da planta. O que induz a redução desse potencial até chegar aos patamares produtivos são as interações do cafeeiro com o ambiente de cultivo, como as adversidades climáticas, fertilidade do solo e ataque de pragas e doenças, com destaque para a ferrugem alaranjada do cafeeiro. Entretanto doenças como mancha-de-olho-pardo ou cercosporiose, mancha-de-phoma, mancha-aureolada, dentre outras, são frequentemente encontradas no cafeeiro (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956; CAVALHO *et al.*, 2010; POZZA *et al.*, 2010).

De acordo com Pozza *et al.* (2010), o sucesso do controle das doenças não está somente na aplicação de defensivos, mas sim relacionado com a combinação de fatores, como ambiente, patógeno e a constituição genética da planta hospedeira. Isso demonstra o quanto é desafiador controlar doenças na cafeicultura pelas inúmeras variáveis relacionadas para se tentar produzir o máximo possível do potencial das plantas. Contudo existem ferramentas que podem ajudar no manejo de doenças como a adoção de cultivares resistentes (VAN DER VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015).

2.2 Ferrugem alaranjada do cafeeiro

A ferrugem do cafeeiro ocorre em praticamente todas as regiões produtoras brasileiras. É considerada a doença de maior importância na cafeicultura, por sua capacidade de causar prejuízos, o agente etiológico dessa doença é o fungo *Hemileia vastatrix* Berk et Br. (TALHINHAS *et al.*, 2017).

A ferrugem alaranjada do cafeeiro foi descrita no Sri Lanka, em 1868, por Berkeley e foi identificada, no Brasil, pela primeira vez, em 1970 na Bahia e, em pouco tempo, disseminou-se pelo país chegando ao estado de São Paulo (ZAMOLIM; VALE; ZAMOLIM, 2005).

A ferrugem alaranjada do cafeeiro é uma doença foliar, cujos sintomas iniciam com manchas cloróticas de 1-3 mm de diâmetro com pontuações translúcidas; com o desenvolvimento da doença, essas manchas podem atingir de 1 a 2 cm de diâmetro. Posteriormente, há o aparecimento de massas pulverulentas de coloração amarelo-alaranjada, constituídas por urediniosporos do patógeno na face abaxial das folhas. Na face adaxial das folhas, observam-se manchas cloróticas correspondentes à mesma área com pústulas da parte abaxial, que, com o progresso da lesão, essas manchas cloróticas podem necrosar (ZAMBOLIM, 2016).

De acordo com Carvalho *et al.* (2010), a disseminação da doença, em longas distâncias, ocorre, principalmente pelo vento e, em curta distância dentro da planta, os respingos de chuva são responsáveis pela disseminação de uma folha para outra. A germinação dos uredosporos requer presença de água no estado líquido, ausência de luz direta e temperatura entre 21 e 23°C.

O principal dano que a ferrugem causa ao cafeeiro é a desfolha e, conseqüentemente, a perda na produção que pode chegar a 50% na safra pendente do ano e na futura (SILVA *et al.*, 2006; ZAMBOLIM, 2016). Em razão da grande desfolha provocada pela ferrugem, a planta reduz sua produtividade, decorrente do baixo pagamento da florada, queda e chochamento de frutos. Indiretamente, após anos do ataque, a ferrugem pode causar perda de ramos laterais e reduzir a longevidade da planta (CARVALHO *et al.*, 2010).

No manejo da ferrugem o produtor deve levar em conta o estado da lavoura, pois plantas com carga pendente alta, com maior enfolhamento e espaçamento adensado são mais propícias à ferrugem. Adubação equilibrada, podas, desbrotas, espaçamentos mais largos e plantio a pleno sol são medidas gerais de controle. O controle químico também é utilizado, por meio de fungicidas de contato protetores via foliar, a exemplo das fontes de cobre e

fungicidas sistêmicos via solo ou foliar sistêmicos e mesosistêmicos, como os triazóis e as estrobirulinas. Basicamente o controle é realizado de forma preventiva e, por meio do monitoramento do progresso da doença, para auxiliar na tomada de decisão (POZZA *et al.*, 2010). Porém a utilização de cultivares resistentes é a melhor opção no controle da ferrugem e deve ser utilizada conjuntamente com os demais métodos (MATIELLO *et al.*, 2002; POZZA *et al.*, 2010; ZAMBOLIM, 2016).

2.2.1 Mecanismos e fontes de resistência à ferrugem

O desenvolvimento de cultivares com resistência durável à ferrugem do cafeeiro tem sido um desafio pela variabilidade genética de *H. vastatrix*. No patossistema cafeeiro com ferrugem, foram descritas 49 raças patogênicas de *H. vastatrix* descritas no mundo (GICHURU *et al.*, 2012). No Brasil, estudos prévios identificaram 15 raças de *H. vastatrix* em *C. arabica* caracterizadas como I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXII, XXIII, XXIV, XXV ou XXXI e raça XXXVII, sendo que a raça II é a mais disseminada no Brasil (CABRAL *et al.*, 2009; ZAMBOLIM, 2016; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM 2005). Em *Coffea canephora* var. conilon, três raças fisiológicas foram identificadas: I, II e III (ZAMBOLIM, 2016).

Atualmente, várias cultivares resistentes à ferrugem com boas características estão disponíveis no mercado, a exemplo das cultivares Paraíso MG H 419-1, Grupo ‘Catiguá’, Araponga MG1, dentre outras (PEREIRA *et al.*, 2010).

O Híbrido de Timor e as progênies derivadas do seu cruzamento com outras cultivares vêm sendo estudados, em diversas regiões cafeeiras do mundo, como fonte de resistência à *H. vastatrix* (VÁRZEA; MARQUES, 2005).

Apesar dos avanços na pesquisa após a introdução da ferrugem no Brasil, a doença ainda é uma ameaça no custo de produção do café, em decorrência da combinação do clima favorável à doença e à utilização em grande escala de cultivares susceptíveis (ZAMBOLIM, 2016) Em anos de alta safra é também de difícil controle.

A espécie *Coffea arabica* L. é atacada por diversas doenças, com destaque para a ferrugem do cafeeiro que é a doença de maior relevância na cafeicultura como já mencionado anteriormente. Muitos genótipos possuem genes de resistência à essa doença, a exemplo dos genes (SH₁, SH₂, SH₄, SH₅) que são provenientes da espécie *C. arabica* (BETTENCOURT; CARVALHO, 1968). Esses genes não apresentam bons resultados no Brasil, pois a maioria

das raças de ferrugem encontradas no território nacional são virulentas aos genótipos com esses genes de resistência.

Sendo assim, genes introduzidos no *C. arabica* L. provenientes de outras espécies de *Coffea spp.* são boas opções de fontes de resistência, como, por exemplo, genótipos de Híbrido de Timor (HT) e do germoplasma Icatu, oriundos de cruzamento entre *C. arabica* com *C. canephora* que possuem genes de resistência (SH₆, SH₇, SH₈, SH₉) herdados da espécie *C. canephora*. Já os genótipos oriundos de cruzamentos espontâneos de *C. liberica* com *C. arabica* podem ser portadores do gene SH₃ herdado da espécie *C. liberica* (BRAGHINI *et al.*, 2015).

Atualmente existem vários grupos de cafeeiros derivados do HT, como, por exemplo, o grupo Catimor proveniente do cruzamento de Caturra Vermelho com HT, Cavimor proveniente do cruzamento de Catimor com HT, Sarchimor proveniente do cruzamento de HT com Villa-Sarchi, Blumor proveniente do cruzamento entre HT e Blue Mountain, dentre outros grupos (PEREIRA *et al.*, 2010).

2.3 Cercosporiose do cafeeiro

A cercosporiose, mancha-de-olho-pardo ou olho-de-pomba, doença cujo agente etiológico é o fungo *Cercospora coffeicola* Berk e Cook, é endêmica em todas as regiões produtoras de café do Brasil (GODOY *et al.*, 1997). A doença, uma das mais antigas do cafeeiro, foi relatada pela primeira vez, em 1881, na Jamaica (COOKE 1881 citado por SOUZA *et al.*, 2011). No Brasil, seu primeiro relato data de 1901, em cafeeiros, nos municípios de Campinas e Araraquara, no Estado de São Paulo (Noack 1901 citado por SOUZA *et al.*, 2011). Mesmo sendo uma doença antiga nos cafezais brasileiros, frequentemente, epidemias da doença são relatadas nas principais regiões produtoras (SOUZA *et al.*, 2011).

Inicialmente a cercosporiose era considerada de importância secundária e associada a plantas sob estresse nutricional ou hídrico, no entanto, nas últimas décadas, tem-se notado maior intensidade da mancha foliar da cercospora em plantações em todo o país (MARTINS; MAFFIA; MIZUBUTI 2008). No Brasil é considerada como a segunda doença mais importante, pois causa perdas de 15 a 30% na produtividade do cafeeiro (CARVALHO *et al.*, 2010).

Os sintomas nas folhas manifestam-se como manchas de configuração circular, com 0,5 - 1,5 cm de diâmetro, de coloração pardo-clara ou marrom-escura, envolvidas por anel

arroxeadado, dando a ideia de um olho. As folhas atacadas caem rapidamente, ocorrendo desfolha e seca dos ramos. A desfolha é causada pela grande produção de etileno no processo de necrose, bastando uma lesão por folha para causar sua queda (GODOY *et al.*, 1997).

A cercosporiose ataca as folhas e os frutos, causando desfolha reduzindo a produção, além dos prejuízos causados na depreciação da qualidade do café. Em condições de viveiro, causa desfolha intensa, provocando atraso no desenvolvimento e raquitismo das plantas (KIMATI *et al.*, 1997).

No manejo, deve-se priorizar medidas de controle cultural, com bom preparo do solo, utilizar irrigação com lâminas corretas e evitar irrigação por meio de pivô, adubação equilibrada, também, é recomendada a utilização de fungicidas cúpricos de forma preventiva (ZAMBOLIM, 2016). Quando o controle cultural não for eficaz, a aplicação do controle químico, utilizando fungicidas dos grupos químicos cúpricos, estrobilurinas, benzimidazóis e triazóis é indicada.

As condições ambientais influenciam no desenvolvimento da doença (SILVA *et al.*, 2016), assim como a nutrição, com efeito indireto de altas doses de potássio no aumento da doença (POZZA *et al.*, 2001).

2.3.1 Mecanismos e fontes de resistência à cercosporiose

Estudos de resistência de cafeeiro à cercosporiose *Cercospora coffeicola* ainda são escassos, não encontrando resistência completa (DELL' ACQUA *et al.*, 2011). Tal fato pode ser explicado em virtude de os pesquisadores dedicarem mais esforços visando à resistência à ferrugem, considerada doença de maior importância, ou pela cercosporiose ser relacionada com a deficiência nutricional (PATRICIO; BRAGHINI; FAZUOLI, 2010).

Em experimento de casa de vegetação, Patricio, Braghini e Fazuoli (2010), avaliando cercosporiose em plantas de *C. arabica*, *C. canephora* e híbridos interespecíficos, as cultivares com menor desenvolvimento de doença foram Piatã IAC 387, Ouro Verde IAC H5010-5 e Tupi IAC 1669-33; os cafeeiros Robusta IAC 1653-7, Apatã IAC 2258, Híbrido de Timor IAC 1559-13, Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo foram mais suscetíveis.

Botelho *et al.* (2017), em um estudo em que foram testados 124 acessos do banco de germoplasma de Minas Gerais e oito cultivares, quanto à resistência à cercosporiose, encontraram acessos próximos à resistência completa com severidade da doença próximo a zero, sendo eles 'Sarchimor MG 8840', a cultivar mais resistente nas condições avaliadas,

seguido do Guatenano, Híbrido Timor UFV 377-34, Híbrido de Timor UFV 376-14 e BE 5 Wush–Wush x Híbrido Timor UFV 366-08.

2.4 Mancha-aureolada do cafeeiro

A mancha-aureolada do cafeeiro, também conhecida como crestamento bacteriano, é uma doença cujo agente etiológico é a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

A mancha-aureolada foi encontrada pela primeira vez, em 1955, no estado de São Paulo no município de Garça (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). Essa bactéria ataca as folhas, causando lesão irregular pardo-escuro envolto por um alo amarelo, podendo não ocorrer o alo amarelado em folhas mais novas. Nas extremidades de ramos, ela causa seca dos ramos laterais e desfolha quando em ambiente acima de 800m exposto ao vento (ZAMBOLIM, 2016). Nos frutos, ela causa mumificação de chumbinhos, reduzindo a produção (CARVALHO *et al.*, 2010).

Os sintomas causados pela *P. syringae* pv. *Garcae*, como seca de ponteiro e mumificação do chumbinho, podem ser confundidos com outras doenças, como *Phoma* spp. ou problemas fisiológicos que causam o mesmo sintoma (CARVALHO *et al.*, 2010).

A doença se desenvolve bem em ambientes úmidos, com alta pluviosidade. O patógeno necessita de água na forma líquida, para penetrar no hospedeiro, por meio de estruturas naturais, como estômatos ou por ferimento, lesão e injúria mecânica, que podem ser ocasionadas por insetos e fungos por lesão de bicho mineiro, phoma tarda ou por danos mecânicos provocados por implementos, chuva de pedra e atrito das folhas por ação do vento (ZAMBOLIM, 2016).

Como manejo preventivo, deve-se escolher área protegida de fortes ventos e utilizar quebra-ventos; em áreas propícias ao patógeno, é importante utilizar espaçamentos mais largos para reduzir a umidade na lavoura (MESQUITA *et al.*, 2016). Ao proteger as plantas de ventos fortes, reduzem-se os ferimentos nas folhas, diminuindo a porta de entrada da bactéria, minimizando o período de molhamento foliar, além de reduzir a janela de tempo oportuno de infecção, ajudando no controle da doença.

O manejo integrado de doenças bacterianas, com a utilização de cultivares resistentes, é um dos métodos de controle mais eficaz, apresenta baixo custo e sem impacto ambiental negativo (RODRIGUES *et al.*, 2013). Dentro do manejo integrado, também, pode ser adotado o controle químico, com aplicações de fungicidas cúpricos preventivamente em épocas de risco da doença (ZAMBOLIM, 2016). Em viveiro o controle pode ser feito com pulverizações

preventivas com cúpricos e curativas com antibióticos, o foco da doença deve ser eliminado logo no início para reduzir a disseminação (MESQUITA *et al.*, 2016).

2.4.1 Mecanismos e fontes de resistência à bacteriose

Quanto à resistência à mancha-aureolada, existem poucas cultivares resistentes disponíveis. A cultivar IPR 102 (Catucaí) é considerada resistente, e as cultivares IPR 103, IPR 104, IPR 108 e IPR 59 com resistência parcial, provavelmente, herdada do Híbrido de Timor nos IPR 104, IPR 108 e IPR 59 (ITO *et al.*, 2008). Mohan, Cardoso e Paiva (1978) encontraram materiais resistentes, nas variedades de *C. arabica* Semierecta, e Geisha, um genótipo proveniente de Híbrido de Timor x Caturra e um genótipo de Híbrido de Timor x Blue Mountain. Os autores também encontraram resistência em alguns dos genótipos etíopes coletados pela FAO em 1964-1965. Também são fontes de resistências os genótipos Harar, Dilla e Alghe, S.12 Kaffa e Geisha (MORAES *et al.*, 1975). Rodrigues *et al.* (2019) reafirmam a resistência à mancha-aureolada dos genótipos Dilla & Alghe e Palido Viridis e na cultivar IPR 102.

2.5 Sistema de defesa das plantas

As plantas não possuem sistemas de defesa como os animais com células que combatem diretamente os patógenos (JONES; DANGL, 2006). As plantas possuem mecanismos de resistência previamente formada e mecanismos de resposta ao patógeno que são formados após a infecção do patógeno na planta hospedeira (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014).

A resistência pode ser estrutural pré e pós-formada, podendo ocorrer por várias características, como cutícula espessa, presença de tricoma, súber, formação de calose, dentre outras, ou pode ser bioquímica, pré e pós-formada, expressando-se por substâncias produzidas na planta, a exemplo de fenóis e alcaloides para pré-formado e fitoalexinas para pós-formados (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Tanto compostos fenólicos, quanto proteínas relacionadas à resistência existem na planta sadia, variando sua concentração, dependendo do bioquímico e de sua função, porém, ao sofrer injúrias ou ataque de patógenos, a planta hospedeira produz esses bioquímicos em maior quantidade para se proteger do patógeno (AGRIOS, 2005). O composto fenólico ácido

clorogênico e os alcaloides cafeína e trigonelina são compostos bioativos presentes nas folhas do cafeeiro (CHEN, 2019).

Logo após a infecção, várias reações acontecem no metabolismo secundário, a planta hospedeira reconhece o patógeno, por meio de elicitores, que sinalizam para a planta reagir à invasão. Existem vários elicitores diferentes e eles variam, de acordo com a integração patógeno hospedeiro (ZHAO; DAVIS; VERPOOTER, 2005). Em resposta, na região da infecção, ocorre uma explosão oxidativa, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) tóxicas ao patógeno e à planta, a exemplo do ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MITTLER, 2002). Outros compostos tóxicos são formados pela ação de enzimas como fitoalexinas, quinonas, dentre outros, além de ocorrer lignificação, ao redor das células afetadas, levando à reação de hiperssensibilidade, matando as células infectadas e contendo o desenvolvimento do patógeno (AGRIOS, 2005).

A lignina é um heteropolímero fenólico que fornece às células vegetais rigidez estrutural, hidrofobicidade. A lignificação limita o desenvolvimento de patógenos e insetos além de representar uma resposta à infecção ou lesão (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As proteínas relacionadas à patogênese, conhecidas como proteínas (PR), são proteínas produzidas na planta hospedeira, em resposta ao ataque de patógenos, de maneira localizada e sistêmica para a proteção da planta (SCHERER *et al.*, 2005). Apesar das enzimas polifenol oxidase (PPO), peroxidase (POX), fenilalanina amonialiase (PAL) serem relacionadas de maneira constitutiva, elas também são consideradas proteínas (PR), porque a planta aumenta a produção dessas enzimas após a infecção (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

A POX possui várias funções e catalisa várias reações na planta. Sua atuação principal no combate ao patógeno é oxidar compostos fenólicos, utilizando o H_2O_2 , também, atua na lignificação da parede celular, para conter o desenvolvimento do patógeno, na produção de fitoalexinas e, em alguns casos, na produção de ROS (ALMAGRO *et al.*, 2009). A PPO tem função de degradar compostos fenólicos em quinonas, que são moléculas com maior toxicidade que os fenóis usados na reação. A atividade da PPO acontece em maior intensidade na região da infecção, contribuindo assim no combate ao patógeno (AGRIOS, 2005). A PAL é a primeira enzima da biossíntese de fenilpropanoide e desempenha um papel importante na produção de flavonoides, ligninas (ZHAO; DAVIS; VERPOOTER, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidos 28 acessos de cafeeiro do BAG visando ao potencial de resistência à doença (ANEXO A). Foi realizada uma triagem para a avaliação da resistência à doença, um para resistência à ferrugem e outro para resistência à mancha- aureolada. Ao final da experimentação, foram selecionados os 15 acessos (ANEXO A) mais promissores para resistência à ferrugem, mancha-aureolada e cercosporiose.

3.1 Triagem para resistência às doenças

Para a produção de mudas, foram coletados frutos maduros no BAG para a produção de sementes. As sementes foram semeadas em caixa de areia e, posteriormente, as plântulas na fase de orelha de onça foram transplantadas para tubetes de 120ml com substrato Tropstrato HT e fertilizante de liberação controlada Osmocote Plus 4M 15-09-12 e conduzidas com sombreamento de 50% em casa de vegetação.

3.1.1 Triagem de genótipos de cafeeiro visando à resistência à ferrugem

Na primeira seleção para a resistência à ferrugem, foram utilizados 28 acessos selecionados no BAG, mais duas cultivares de testemunha, a Catiguá MG 2, como padrão de resistência e a Catuaí Vermelho IAC 99, como padrão de suscetibilidade, totalizando 30 tratamentos. O experimento foi realizado em delineamento experimental em blocos completos casualizados com cinco repetições e uma planta por parcela.

Para a obtenção do inóculo de *H. vastatrix*, foram coletadas folhas de cafeeiro infectadas, naturalmente, em uma lavoura sem controle químico de a cultivar Topázio MG 1190 no Campo Experimental da Universidade Federal de Lavras. A coleta dos urediniósporos foi realizada com auxílio de cápsula e, em seguida, acondicionados em microtubos de 2 mL até o momento da inoculação. Como o experimento visava a resistência à ferrugem, e o fungo *H. vastatrix* possui diversas raças, parte do inóculo foi enviado para o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) para a identificação da raça utilizada no experimento. Por meio de plantas diferenciadoras, o inóculo de ferrugem foi identificado como um inóculo puro da raça II.

O Experimento foi instalado em casa de vegetação no Departamento de Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras. A inoculação foi feita com uma suspensão na

concentração de 7×10^6 urediniósporos ml^{-1} , aplicada em todas as folhas da planta com auxílio de borrifador, na face abaxial das folhas. Imediatamente após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara úmida no escuro por 72 horas visando propiciar molhamento foliar para facilitar o processo de infecção. As avaliações da severidade da ferrugem foram realizadas, semanalmente, a partir dos primeiros sintomas da doença, totalizando cinco avaliações, utilizando-se a escala diagramática (CAPUCHO *et al.*, 2011).

3.1.2 Triagem de genótipos de cafeeiro visando a resistência à mancha-aureolada do cafeeiro

Para esse experimento foram avaliados 28 acessos do BAG, mais uma cultivar como testemunha, a Catuaí Vermelho IAC 99, como padrão de suscetibilidade, totalizando 29 tratamentos. O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados com cinco repetições e uma planta na parcela. O isolado padrão de referência de *P. syringae* pv. *garcae* utilizado foi o “Collection Française de Bactéries Phytopathogenes – CFPB 1634” em meio 523 de Kado e Heskett (1970).

O experimento de resistência à mancha-aureolada do cafeeiro foi instalado em sala de crescimento do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. A inoculação foi realizada no primeiro par de folhas com ferimentos por meio de multiagulhas imersas com o inóculo de suspensão bacteriana, produzido em laboratório, em placas de Petri, contendo meio MB1 e incubada a 25 °C. Após 48 horas de crescimento, foi preparada a suspensão bacteriana, removendo-se as colônias com uma alça de Drigaslki e calibrada para OD 600nm= 0,8. Logo após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara úmida por 72 h visando propiciar condições de alta umidade para o processo de infecção. A severidade foi quantificada por meio da escala diagramática proposta por (BELAN *et al.*, 2014).

3.2 Seleção de acessos resistentes às doenças

Por meio das triagens mencionadas acima, foram selecionados 15 acessos de cafeeiro (Anexo I). Eles foram submetidos a experimentos de avaliação de resistência a três doenças do cafeeiro, ferrugem, mancha-aureolada e cercosporiose, com o intuito de selecionar para cada doença cinco acessos presentes no BAG promissores quanto à resistência genética.

Para a produção de mudas, foram coletados frutos maduros no BAG para a produção de sementes, as quais foram semeadas em caixa de areia e depois as plântulas na fase de

orelha de onça foram transplantadas para tubetes de 120ml com substrato Tropstrato HT e fertilizante de liberação controlada Osmocote Plus 4M 15-09-12 e conduzidas com sombreamento de 50% no viveiro da Agência de Inovação do Café (INOVACAFE) na UFLA.

3.2.1 Experimento de resistência à ferrugem

O experimento foi instalado em uma casa de vegetação da INOVACAFE na UFLA com os 15 genótipos previamente selecionados na triagem (Anexo I) e mais duas cultivares de testemunha, a Catiguá MG 2, como padrão de resistência e a Catuaí Vermelho IAC 99, como padrão de suscetibilidade, totalizando 17 tratamentos (Tabela 1). O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados com 10 repetições e duas plantas na parcela.

Para a obtenção do inóculo de *H. vastatrix*, foi utilizado o mesmo método da triagem no item 3.1.1.

O Experimento foi instalado em casa de vegetação no Departamento de Agricultura na INOVACAFE na Universidade Federal de Lavras. A inoculação foi feita com uma suspensão na concentração de 7×10^6 urediniósporos mL⁻¹, aplicada em todas as folhas da planta com o auxílio de borrifador, na face abaxial das folhas. Imediatamente após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara úmida no escuro, por 72 horas, visando propiciar molhamento foliar para facilitar o processo de infecção. Durante o período experimental, as plantas foram mantidas com uma temperatura média de 16,3°C, umidade relativa média de 82,2% e tempo médio diário com temperatura em ponto de orvalho de 13 horas. As avaliações da severidade da ferrugem foram realizadas, semanalmente, a partir dos primeiros sintomas da doença, totalizando cinco avaliações por meio de escala diagramática de (CAPUCHO *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Identificação e genealogia dos 15 genótipos selecionados da triagem e mais duas testemunhas.

(continua)

Tratamento	Acesso	Genealogia
1	MG 176 RII	Amphillo X H. Natural MR 36-349
2	MG 270 (1,3,6) RII	Híbrido Timor UFV 377-21
3	MG 446	Mundo Novo x S 795 UFV 335-13
4	MG 451	Mundo Novo x S 795 UFV 335-68
5	MG 296 (6) RII	Híbrido Timor UFV 408-11
6	MG 270 (5) RI	Híbrido Timor UFV 377-21
7	MG 311 RII	Híbrido Timor UFV 428-02

Tabela 1 - Identificação e genealogia dos 15 genótipos selecionados da triagem e mais duas testemunhas.

(conclusão)

Tratamento	Acesso	Genealogia
8	MG 331	Híbrido Timor UFV 437-06
9	MG 443	Mundo Novo x S 795 UFV 335-09
10	MG 277 RII	Híbrido Timor UFV 376-52
11	MG 279 (9) RII	Híbrido Timor UFV 376-31
12	MG 441	Mundo Novo x S 795 UFV 335-07
13	MG 308 (7) RII	Híbrido Timor UFV 427-55
14	MG 364 (4) RI	Híbrido Timor UFV 442-42
15	MG 534	BE 5 Wush-Wush x Híbrido Timor UFV 366-08
16	Catuaí Vermelho IAC 99	Caturra A. IAC 476-11 x Mundo Novo 374-19
17	Catiguá MG 2	Catuaí A. IAC 86 x Híbrido Timor (UFV 440-10)

Fonte: Do autor (2020).

Para a classificação de resistência, utilizou-se metodologia de Conceição, Fazuoli e Braghini (2005), na qual os acessos foram classificados como imunes quando não ocorrer qualquer sinal de infecção visível; resistente quando acessos apresentarem flecks (reação de hipersensibilidade) visíveis macroscopicamente; lesões cloróticas; pequenas tumefações sem ocorrência de esporulação. Moderadamente resistente quando acessos com flecks; lesões cloróticas, pequenas tumefações e início de esporulação. Moderadamente susceptível quando acessos apresentarem flecks; tumefações lesões cloróticas, associadas com tumefações com pouca, média ou maior esporulação. Susceptível, acessos com esporulações intensas ocorrendo muitas pústulas por folha.

3.2.2 Experimento de resistência à mancha-aureolada

Os 15 acessos selecionados, na triagem do item 3.1.2 e mais uma cultivar de testemunha, como padrão de suscetibilidade, Catuaí Vermelho IAC 99, foram utilizados para a avaliação da resistência à bacteriose, totalizando 16 tratamentos (Tabela 2). Eles foram submetidos a um experimento com 10 repetições e duas plantas por parcela, no delineamento experimental em blocos completos casualizados. O isolado utilizado foi o UFLA 97 que ficou dentro do grupo dos mais virulentos no estudo de patogenicidade de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (RAIMUNDI, 2017).

Tabela 2 - Identificação e genealogia dos 15 acessos selecionados da triagem e mais uma testemunha de suscetibilidade.

Tratamento	Acesso	Genealogia
1	MG 176 RII	Amphillo X H. Natural MR 36-349
2	MG 270 (1,3,6) RII	Híbrido Timor UFV 377-21
3	MG 446	Mundo Novo x S 795 UFV 335-13
4	MG 451	Mundo Novo x S 795 UFV 335-68
5	MG 296 (6) RII	Híbrido Timor UFV 408-11
6	MG 270 (5) RI	Híbrido Timor UFV 377-21
7	MG 311 RII	Híbrido Timor UFV 428-02
8	MG 331	Híbrido Timor UFV 437-06
9	MG 443	Mundo Novo x S 795 UFV 335-09
10	MG 277 RII	Híbrido Timor UFV 376-52
11	MG 279 (9) RII	Híbrido Timor UFV 376-31
12	MG 441	Mundo Novo x S 795 UFV 335-07
13	MG 308 (7) RII	Híbrido Timor UFV 427-55
14	MG 364 (4) RI	Híbrido Timor UFV 442-42
15	MG 534	BE 5 Wush-Wush x Híbrido Timor UFV 366-08
16	Catuá Vermelho IAC 99	Caturra A. IAC 476-11 x Mundo Novo 374-19

Fonte: Do autor (2020).

O experimento de resistência à mancha-aureolada do cafeeiro foi instalado em sala de crescimento do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. A inoculação foi realizada no primeiro par de folhas com ferimentos, por meio de multiagulhas imersas com o inóculo de suspensão bacteriana produzido em laboratório, em placas de Petri contendo meio MB1 e incubada a 25 °C. Após 48 horas de crescimento, foi preparada a suspensão bacteriana, removendo-se as colônias com uma alça de Drigaslki e calibrada para OD 600nm= 0,8. Logo após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara úmida por 72 h visando propiciar condições de alta umidade para o processo de infecção. Durante o período de condução experimental, a temperatura média foi de 21,12°C, umidade relativa média de 71,73% e tempo médio diário com temperatura em ponto de orvalho de 15 horas. A severidade foi quantificada por meio da escala diagramática proposta por (BELAN *et al.*, 2014).

3.2.3 Experimento de resistência à cercosporiose

Para se avaliar a resistência dos acessos à cercosporiose do cafeeiro, foram utilizados os 15 acessos selecionados na triagem mais uma cultivar suscetível de testemunha, a Catuá Vermelho IAC 99, padrão de suscetibilidade (Tabela 2). O experimento foi instalado em

delineamento experimental em blocos completos casualizados com 10 repetições e duas plantas por parcela.

O experimento foi realizado em casa de vegetação da INOVACAFE na UFLA. Para a inoculação, foram selecionados três isolados de *C. coffeicola*: LFP 12, LFP 37, LFP 24 provenientes dos municípios de Lavras-MG, Bonfinópolis de Minas-MG, Ilicínea MG, respectivamente. A inoculação com mais de um isolado de *C. coffeicola* visou abranger maior variabilidade de patogenicidade do fungo. Para a esporulação dos isolados, utilizou-se a metodologia proposta por Souza, Maffia e Mizubuti (2012) com adaptações. Oito discos de micélio de 6 mm de diâmetro foram retirados de colônias de *C. coffeicola*. Os discos foram macerados com 400 µL de água destilada esterilizada. O micélio macerado foi depositado em erlenmeyers, contendo 20 mL do meio de cultura V8 líquido (100 mL de V8, 900 mL de água destilada) e agitados a 100 rpm por quatro dias em temperatura ambiente. Após esse período, o conteúdo dos erlenmeyers foi vertido em placas contendo meio ágar-água e permaneceram abertas em BOD por quatro dias para a secagem do líquido. Após a secagem, foram adicionados em cada placa 10 mL de água esterilizada para a remoção dos conídios com o auxílio de alça de Drigasliki. A esporulação foi quantificada em câmara de Neubauer e a suspensão foi calibrada para a concentração de 3×10^4 conídios mL⁻¹. O inóculo foi aplicado em todas as folhas da planta com o auxílio de borrifador na face abaxial das folhas. Logo após a inoculação, as plantas foram submetidas a uma câmara úmida por 72h. O experimento foi conduzido com temperatura média de 23,2°C, umidade relativa média de 83,3% e tempo diário médio em temperatura de ponto de orvalho de 19h.

A avaliação da severidade da doença foi realizada com o início da manifestação dos sintomas, utilizando-se escala diagramática proposta por Custodio *et al.* (2011). Essa escala quantifica a severidade de *C. coffeicola*, em seis níveis de severidade, com intervalos de 0,1-3,0; 3,1-6,0; 6,1-12,0; 12,1-18,0; 18,1-30,0 e 30,1-50,0% de área foliar afetada. Foram realizadas seis avaliações da severidade da doença, com intervalo de sete dias entre cada avaliação.

3.3 Seleção de acessos resistentes à doença

Com os resultados de severidade dos experimentos de resistência à ferrugem, à mancha-aureolada e à cercosporiose, realizou-se uma análise estatística para cada experimento com o procedimento de modelo misto REML-BLUP com o modelo 28 utilizando o programa estatístico Selegen (REZENDE, 2007).

O modelo estatístico é descrito pela equação $y = X_m + Z_g + e$, em que y é o vetor dos dados, m é o vetor dos efeitos das combinações medição-repetição (assumidos como fixos) somados à média geral, g é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios), p é o vetor dos efeitos de ambiente permanente (aleatório) e e é o vetor de erros ou resíduos (aleatório). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Utilizando os resultados estatísticos de cada experimento, selecionaram-se cinco acessos promissores à resistência, para cada uma das três doenças, ferrugem, mancha-aureolada e cercosporiose.

3.4 Quantificação de parâmetros relacionados à defesa constitutiva dos genótipos de cafeeiro selecionados

Tanto para as análises de HPLC quanto para as demais análises, foram coletadas folhas de dez plantas escolhidas aleatoriamente no viveiro coletando o segundo e terceiro pares de folhas completamente expandidas. As amostras coletadas, para a análise em HPLC, foram identificadas e condicionadas em sacos de papel para serem secas em estufas até atingirem o peso constante. Já as amostras coletadas, para as demais análises, foram identificadas e condicionadas em pacotes de papel alumínio em nitrogênio líquido, logo após a coleta, para impedir a oxidação até o momento, posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80°C .

3.4.1 Determinação do teor de fenóis totais e lignina

Os tecidos vegetais foliares dos genótipos de cafeeiro foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Logo depois, as amostras foram liofilizadas por 48 horas. Uma alíquota de 30,0 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2,0 mL, homogeneizada com 1,5mL de metanol a 80% e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para a determinação de lignina solúvel.

Para determinar a concentração de fenóis solúveis totais, utilizou-se o método descrito por Spanos e Wrolstad (1990), com algumas modificações. Em microtubos de 1,5 mL,

alíquotas de 150 μL do extrato metanólico foram misturadas com 150 μL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N por 5 minutos. Após esse período, adicionaram-se 150 μL de Na_2CO_3 1M por 10 minutos. Depois, as amostras foram diluídas em 1mL de água destilada e permaneceram à temperatura ambiente por uma hora. Os valores de absorbância dessa reação foram determinados a 725 nm em espectrofotômetro.

Para a quantificação do teor de lignina, o resíduo sólido resultante, após a retirada do extrato metanólico, foi levado para estufa a 65° C por 15 horas. Após esse período, foi adicionado aos tubos 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10), os quais foram colocados em banho-maria a 100°C por 4 horas. Após centrifugação a 12.000 g por 10 minutos, descarte do sobrenadante, adição de 1,5 mL de água ultrapura e descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M. Os tubos foram colocados em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 μL de HCl concentrado. Após período de precipitação (4 horas a 4°C), foi realizada nova centrifugação, descarte do sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. A absorbância dessa solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em μg de lignina por miligrama de massa seca (DOSTER; BOSTOCK, 1988).

3.4.2 Determinação do perfil dos compostos bioativos ácido clorogênico, cafeína e trigonelina por HPLC

As análises cromatográficas foram realizadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café) da Universidade Federal de Lavras – UFLA. O equipamento utilizado foi UFLC Shimadzu, equipado com bomba quaternária de alta pressão modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20^a5, forno modelo CTO-20^a, interface modelo CBM-20^a, injetor automático modelo SIL-20^a-HT e detector UV-Vis (SPD-20^a). A coluna empregada foi a Shim-pack CLC-ODS (6,0 x 150 mm, 5 μm) conectada a uma pré-coluna Eclipse XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 μm). A fase móvel, para a eluição dos compostos analisados, utilizou uma solução de ácido acético 1% em água (Solvente A) e metanol (Solvente B), obedecendo à seguinte proporção: água/metanol/ácido acético (84:15:1% v/v). As amostras e os padrões foram eluídos em modo isocrático. O comprimento de onda utilizado foi de 272 nm, fluxo de 1,0 mL/ min, temperatura do forno de 40°C e volume de injeção de 20 μL . O tempo de corrida de cada amostra foi de 50 minutos e as amostras foram injetadas em triplicata

Para a determinação dos teores de ácido clorogênico, cafeína e trigonelina, as folhas dos genótipos selecionados foram secas em estufa (60°C) até atingirem peso constante. Posteriormente foram moídas e peneiradas para que ficassem com uma granulação homogênea de 400 mesh. Os extratos aquosos foram realizados, utilizando 0,5 g de amostras moídas em 50 mL água destilada em ebulição, durante 3 minutos em banho-maria. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e em filtros de membranas de nylon de 0.45µm. As análises cromatográficas foram realizadas por metodologia proposta por Malta e Chagas (2009). Foram utilizados compostos padrões de ácido clorogênico, cafeína e trigonelina, todos adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados para a cromatografia foram metanol e ácido acético, ambos de grau analítico para HPLC (espectroscópico) e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q (DirectQ-3).

O método utilizado para a quantificação foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições, contendo uma mistura de todos os padrões, a qual foi obtida por meio da diluição das soluções-estoque previamente preparadas em água. Nas soluções-estoque, os padrões encontravam-se na concentração de 1mg mL⁻¹ e a faixa de construção da curva analítica foi de 0,001 a 0,8 mg mL⁻¹. Na construção das curvas analíticas, foram realizadas injeções em triplicata. A identidade dos analitos contidos nos extratos foi confirmada pelo tempo de retenção e pelos picos da amostra comparados aos dos padrões.

3.4.3 Determinação da atividade das enzimas, peroxidase (POX), polifenol oxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL)

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas POX, e PPO, amostras de tecido foliar foram maceradas com N₂ líquido em almofariz, até a obtenção de um pó fino. O material obtido foi homogeneizado em tampão formado por 450 µL fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, 15 µL de EDTA 10 mM e 1035 µL H₂O, com o volume correspondente de 3 ml por grama de amostra. Logo após, foram centrifugados a 13.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C; para a análise enzimática utilizaram-se os sobrenadantes

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do guaiacol, de acordo com a metodologia de Urbanek, Kuzniakgebarowska e Herka (1991). Adicionaram-se 20 µL do extrato enzimático, ajustado para 200 µL de solução contendo fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, guaiacol 50 mM e peróxido de hidrogênio 250 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 utilizado para calcular a atividade da POX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot) (CHANCE; MAEHLEY, 1955).

A atividade da PPO foi determinada conforme metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). Adicionaram-se 10 μL do extrato enzimático, ajustado para 200 μL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, contendo catecol 100 mM. A absorbância foi medida a 410nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade da PPO ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot).

Para a determinação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), em um grama de tecido foliar macerado, foram adicionados 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, acrescido de 1 mM de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonilo) e 1% de PVP. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. A atividade da PAL foi determinada conforme metodologia descrita por Zucker (1965). Foram adicionados 10 μL do extrato enzimático, ajustado para 200 μL de solução tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,8, contendo fenilalanina 50 mM. Após a incubação a 37 °C, por 20 minutos, a absorbância foi medida a 280nm. O coeficiente de extinção molar de 5000 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática da PAL ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot).

3.4.4 Análise estatística dos compostos bioativos e enzimáticos

Com os resultados de atividades das enzimas e teores de compostos bioativos dos 15 acessos mais as duas testemunhas, realizou-se uma análise estatística para cada um com o procedimento de modelo misto REML-BLUP com o modelo 83 utilizando o programa estatístico Selegem.

O modelo é descrito pela equação $y = Xu + Zg + e$, em que y é o vetor de dados, u é o escalar referente à média geral (eixo fixo), g é o vetor dos efeitos genotípicos (9 assumidos como aleatórios) e e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos (REZENDE, 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como foco a identificação de genótipos com resistência às três principais doenças do cafeeiro no Brasil para serem utilizados nos programas de melhoramento. Percebeu-se que a manutenção de um germoplasma ativo e diverso é de suma importância para a cafeicultura e deve ser continuamente enriquecido com as mais diversas origens.

Os resultados obtidos são referentes à viabilidade de seleção de acessos com resistência múltipla para a ferrugem, mancha-aureolada e à cercosporiose, com principal foco na identificação de genitores com alto valor reprodutivo, para serem usados em cruzamentos ao desenvolvimento de cultivares resistentes.

4.1 Seleção de acessos resistentes à ferrugem

A triagem para a resistência à ferrugem foi eficiente, pois promoveu a seleção de acessos com alto nível de resistência e permitiu elevada herdabilidade na média de parcela, indicando que a seleção dos melhores acessos para a resistência fenotípica terá alto valor reprodutivo para a resistência. Nessa avaliação, o coeficiente de determinação (c^2), para ambiente permanente das avaliações sucessivas, foi baixo, demonstrando que não é um efeito significativo na variação total. Porém existe diferença entre a repetibilidade e herdabilidade no nível de parcela, conforme o esperado, quando existem efeitos de ambiente permanente pelas sucessivas avaliações na mesma parcela.

Outros trabalhos estimaram os parâmetros genéticos para a severidade à ferrugem, sendo a maioria deles em experimentos de campo. Petek *et al.* (2006) estimaram a herdabilidade em progênies de diferentes origens e concluíram que a resistência para a ferrugem possui uma herdabilidade semelhante à encontrada neste trabalho, porém com um ganho de seleção inferior. Tal resultado provavelmente ocorreu, em razão de as plantas usadas neste trabalho terem alto nível de resistência, fazendo com que a diferença entre a média das progênies selecionadas em relação à média geral do experimento fosse maior. Em outro trabalho de campo, Romero *et al.* (2010) encontraram herdabilidade para incidência à ferrugem de 0,73 e 0,53, considerando a herdabilidade no sentido amplo e restrito, respectivamente. Neste trabalho, a herdabilidade calculada é no sentido restrito, pois as progênies são linhagens endogâmicas não possuindo atualmente apreciável dominância na expressão do caráter.

Tabela 3 - Estimativa dos parâmetros genéticos, para a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*), nos acessos do banco ativo de germoplasma de Minas Gerais, Patrocínio-MG.

Parâmetros	Ferrugem
Vg	3,9070*
Vf	7,7968
h ²	0,96
R	0,64±0,07
c ²	0,14

Fonte: Do autor (2010).

Vg: variância genotípica, Vf: variância fenotípica; h² herdabilidade à média de parcela; r: repetibilidade no nível de parcela; c²: coeficiente de determinação dos efeitos de ambiente permanente; *significativo a 5% de probabilidade.

A testemunha suscetível ‘Catuaí IAC 99’ (16) obteve alta severidade da ferrugem, durante o período de avaliação, permitindo a classificação da resistência das plantas avaliadas com segurança e demonstrando a eficiência do método de avaliação. Os tratamentos 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 e 15, correspondentes, respectivamente, aos acessos (MG 451, MG 296 (6) RII, MG 331, MG 443, MG 277 RII, MG 279 (9) RII, MG 441 e MG 534) e mais a testemunha resistente ‘Catiguá MG 2’ não apresentaram sintomas e sinais da doença, sendo considerados resistentes à raça II de *H. vastatrix*, sem nenhuma planta suscetível. Os demais acessos apresentaram baixa severidade da ferrugem, sendo classificados como moderadamente resistentes. A segregação para a resistência nesses acessos variou de 40 a 95% de plantas resistentes.

O ganho de seleção mostra que a seleção desses oito acessos pode formar populações com plantas completamente resistentes. O sinal negativo do GS refere-se à diminuição da característica selecionada (Tabela 4).

Tabela 4 - Seleção dos acessos do BAG quanto à resistência a ferrugem, com valor genotípico (u+g), ordenamento quanto à resistência, severidade final em (%), classificação de resistência, porcentagem de plantas resistentes (R%) e ganho de seleção geral (GSg%) e em relação à testemunha (GS t%).

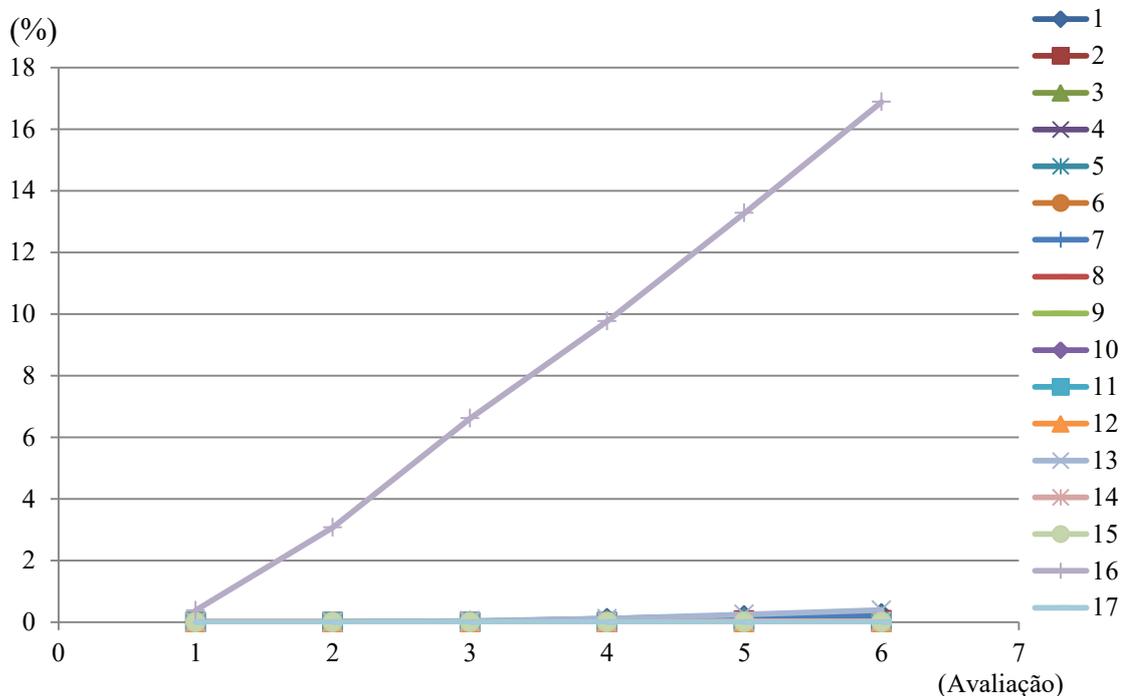
Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro				
Tratamento	Rank	(u + g)	Severidade Final	Classificação de Resistência - % R
4	1	0,0	0	R-100
5	1	0,0	0	R-100
8	1	0,0	0	R-100
9	1	0,0	0	R-100
10	1	0,0	0	R-100
11	1	0,0	0	R-100
12	1	0,0	0	R-100
15	1	0,0	0	R-100
17	1	0,0	0	R-100
6	10	0,0303	0,02	MR-95
14	11	0,0306	0,03	MR-95
2	12	0,038	0,06	MR-95
7	13	0,0737	0,18	MR-85
3	14	0,0824	0,19	MR-85
1	15	0,1222	0,28	MR-75
13	16	0,1497	0,39	MR-40
16	17	8,0326	16,88	S-0
GSg %		-96,00		
GS t %		-96,00		

Fonte: Do autor (2010).

I (imune), R (resistente), MR (moderadamente resistente), MS (moderadamente susceptível) e S (susceptível).

Observa-se, na Figura 1, a curva de tendência da doença, durante o período de avaliação da doença que a testemunha suscetível apresentou evolução da doença crescente linear, enquanto os demais acessos avaliados apresentaram baixa severidade durante a condução do experimento.

Figura 1 - Severidade de ferrugem em função das avaliações com intervalo de sete dias nos genótipos testados.



Fonte: Do autor (2010).

Os tratamentos selecionados 4, 9 e 12 correspondentes aos acessos (MG 451, MG 443 e MG 441) são acessos provenientes de cruzamentos de “Mundo Novo” com S795. De acordo com Conceição, Fazuoli e Braghini (2005), o cafeeiro S795 é oriundo do cruzamento entre “Kent” e “S288”, em que esta última é proveniente de uma hibridação espontânea de *C. arabica* com *C. liberica*, de onde herdaram o gene de resistência SH3 da espécie *C. liberica*. É provável que esses acessos classificados com resistência completa à raça II de *H. vastatrix*, que é portadora do gene de virulência v5, possuam os genes de resistência SH3. Já os acessos 5, 8, 10, 11 e 15 correspondentes aos acessos (MG 296 (6) RII, MG 331, MG 277 RII, MG 279 (9) RII, e MG 534), respectivamente, são provenientes de cruzamentos com HT. Os genótipos de HT podem possuir os genes de resistência SH6, SH7, SH8 e SH9 introgridos do *C. canephora* e o gene SH5 do *C. arabica*, sendo provável que esses acessos herdaram um ou mais desses genes de resistência do HT que conferem resistência completa à raça II de ferrugem.

Pelo grande número de raças de ferrugem e ocorrência de raças com vários genes de virulência combinados (ZAMBOLIM, 2016), é de grande importância dispor de genótipos como fonte de diferentes genes de resistência SH. Atualmente a maioria dos genes SH, presentes nas cultivares com resistência à ferrugem, são provenientes de *C. canephora* com

genes isolados ou associados de SH6 a SH9. Esse fato demonstra que genótipos portadores de outros genes de resistência, a exemplo do SH3, são muito promissores para a recombinação, com o intuito de agrupar o maior número de genes de resistência SH, em uma única cultivar, buscando, assim, produzir cultivares com resistência mais durável.

4.2 Seleção de acessos resistentes à mancha-aureolada

A triagem de acessos visando a resistência à mancha-aureolada não apresentou o aumento do nível de resistência como observado para a ferrugem. A variância genética para a bacteriose foi significativa e gerou uma herdabilidade na média de progênes moderada, porém com uma repetibilidade relativamente alta. O coeficiente de determinação dos efeitos de ambiente permanente foi superior ao observado, para a ferrugem, condizente com a maior diferença entre a herdabilidade, em relação à repetibilidade, que pode ser interpretada como um limite máximo para a herdabilidade. Portanto, apesar da herdabilidade moderada, a repetibilidade demonstra que se podem promover bons ganhos com a seleção, para gerar populações promissoras à resistência e genitores com alto valor reprodutivo (Tabela 5).

Encontrou-se apenas uma referência na literatura, a respeito do estudo da herdabilidade, para a interação entre o cafeeiro com a bactéria (PETEK *et al.*, 2006). Porém o estudo foi realizado em campo e com ocorrência natural da doença. Os autores estimaram uma herdabilidade de 0,83. O maior valor da herdabilidade, quando comparado ao encontrado neste estudo, pode ser pelo fato de a população de plantas utilizadas e ao fato do estudo ter sido realizado em campo. Além disso, a herdabilidade estimada é referente à população estudada, não devendo ser comparada em valores absolutos. Portanto, apesar do nível de resistência da população em estudo ter sido baixo, as informações sobre a possibilidade de ganho com a seleção em experimentos de casa de vegetação são importantes e demonstram que o procedimento pode auxiliar os melhoristas a atingirem progresso na resistência.

Tabela 5 - Estimativa dos parâmetros genéticos, para a severidade da mancha-aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*), nos acessos do banco ativo de germoplasma de Minas Gerais, Patrocínio-MG.

Parâmetros	Mancha-aureolada
Vg	0,0668*
Vf	0,8058
h ²	0,55
r	0,70±0,08
c ²	0,62

Fonte: Do autor (2020).

Vg: variância genotípica, Vf: variância fenotípica; h² herdabilidade à média de parcela; r: repetibilidade no nível de parcela; c²: coeficiente de determinação dos efeitos de ambiente permanente; *significativo a 5% de probabilidade.

A testemunha suscetível ‘Catuaí Vermelho IAC 99’ expressou intensamente a doença e não apresentou nenhuma planta com folhas sem o sintoma da doença, confirmando sua suscetibilidade, embasando as inferências sobre a resistência dos acessos estudados e demonstra que o método de inoculação foi funcional. Nenhum dos acessos estudados possui resistência completa à mancha-aureolada quando se utilizou o isolado UFLA 97 de *P. syringae* pv. *garcae*. A maioria dos acessos foi moderadamente resistente e o melhor acesso apresentou 60% de plantas sem a expressão da doença, indicando que provavelmente os alelos de resistência não estão fixados. Dessa forma, deve-se realizar a seleção dentro desses acessos para se tentar a resistência completa ou proceder à seleção recorrente para elevar o nível de resistência populacional. Esses argumentos são suportados pelas estimativas do ganho com a seleção dos cinco melhores acessos (Tabela 6).

Dentre os tratamentos selecionados, o tratamento 3 (MG 446) é proveniente do cruzamento de “Mundo Novo” x S795; os demais melhores tratamentos 2, 10, 11 e 13, correspondentes aos acessos (MG 270 (1,3,6) RII, MG 277 RII, MG 279 (9) RII e MG 308 (7) RII) são HT. Ito *et al.* (2008), avaliando resistência à *P. syringae* pv. *garcae*, também obtiveram resultados com melhor desempenho de resistência a cultivares descendentes de cafeeiros da espécie *Coffea canephora*, quando comparados à Catuaí Vermelho IAC 99. A IPR102 (“Catucaí”) foi classificada com resistência completa à mancha-aureolada e com resistência parcial nas cultivares IPR 108 (IAPAR 59 x “Catucaí”), IPR104 (“Sharchimor”) IAPAR 59 (“Sharchimor”) e IPR103 (“Catucaí” x “Icatu”).

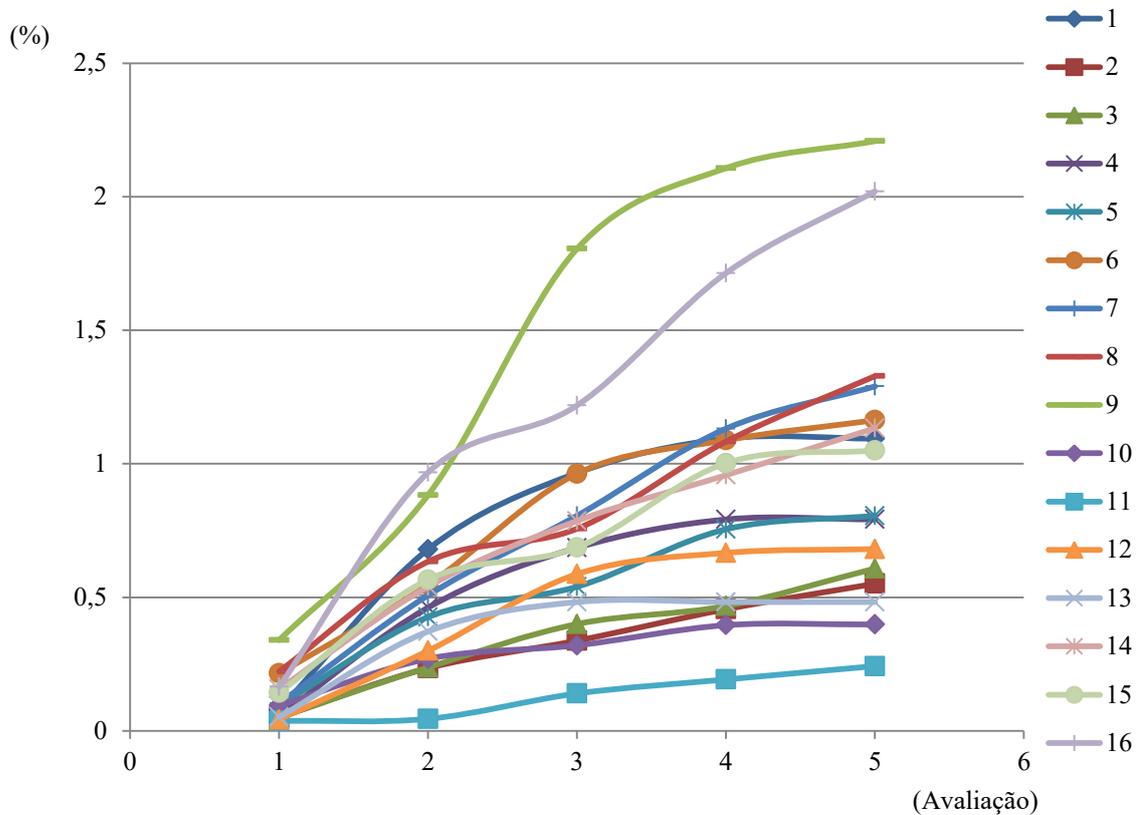
Tabela 6 - Seleção dos acessos do BAG quanto à resistência à *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, com valor genotípico (u+g), ordenamento quanto à resistência, severidade final em (%), porcentagem de plantas resistentes (R%) e ganho de seleção geral (GSg%) e em relação à testemunha (GS t%).

Tratamento	Mancha-aureolada			
	Rank	(u + g)	Severidade Final	Plantas resistentes %
11	1	0,3671	0,24	60
10	2	0,4575	0,39	50
2	3	0,474	0,55	42
3	4	0,4888	0,6	31
13	5	0,4981	0,48	25
5	6	0,5832	0,8	35
4	7	0,6158	0,79	33
12	8	0,6308	0,68	47
15	9	0,6742	1,05	10
14	10	0,6882	1,13	25
7	11	0,717	1,28	16
8	12	0,7377	1,33	30
1	13	0,7425	1,09	22
6	14	0,7437	1,16	25
16	15	0,9645	2,02	10
9	16	1,1029	2,20	10
GSg %		-28,78		
GS t %		-41,66		

Fonte: Do autor (2020).

O tratamento 9 (MG 443) não apresentou resistência à mancha-aureolada (Tabela 6), sendo o único tratamento com maior severidade que a testemunha (Figura 2). O tratamento 9 e a testemunha Catuaí Vermelho IAC 99, durante quase todo o período de condução do experimento, apresentaram maior severidade da doença, quando comparados aos demais tratamentos.

Figura 2 - Severidade de Mancha-Aureolada em função das avaliações com intervalo de sete dias nos genótipos testados.



Fonte: Do autor (2010).

4.3 Seleção de acessos resistentes à cercosporiose

Não houve variância genética para a severidade da cercosporiose, portanto não se pode inferir geneticamente sobre o comportamento dos acessos quando inoculados com o fungo. Dessa forma, as variações em expressão fenotípicas são de efeito ambiental, não contribuindo para o melhoramento genético. Entretanto os efeitos de ambiente permanente foram significativos, demonstrando que o método utilizado para a inoculação e avaliação não foram os causadores da ausência de variação genética (Tabela 7). Essa constatação pode ser corroborada pela curva de progresso da doença (Figura 3).

Tabela 7 - Estimativa dos parâmetros genéticos, para a severidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), nos acessos do banco ativo de germoplasma de Minas Gerais, Patrocínio-MG.

Coeficientes	Cercosporiose
Vg	0,0178
Vf	1,1157
h ₂	0,18
r	0,66±0,07
c ²	0,64

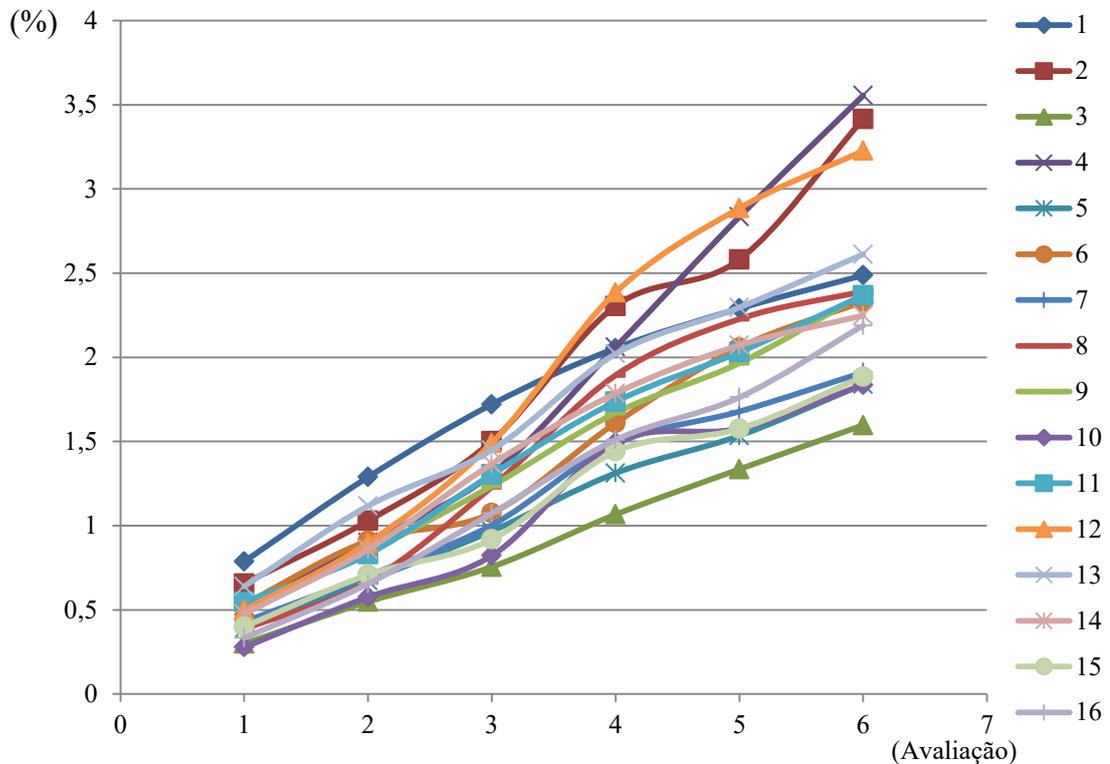
Fonte: Do autor (2020).

Vg: variância genotípica, Vf: variância fenotípica; h² herdabilidade à média de parcela; r: repetibilidade no nível de parcela; c²: coeficiente de determinação dos efeitos de ambiente permanente; *significativo a 5% de probabilidade.

Este baixo valor da Vg se deve à baixa variabilidade entre os genótipos quanto à resistência à cercosporiose. Isso provavelmente pode ser explicado pelo número reduzido de acessos avaliados. Botelho *et al.* (2017) encontraram variabilidade genética para a resistência à cercosporiose em cafeeiros trabalhando com 132 acessos do BAG e acessos com alto nível de resistência e sem segregação. A motivação para este trabalho foi procurar resistência à cercosporiose, em acessos diferentes dos que foram avaliados por Botelho *et al.* (2017), a busca da resistência múltipla, que ocorreu apenas para ferrugem e bacteriose, cuja correlação genética foi significativa e de 0,43, indicando que, para essa população, a seleção para resistência a uma das doenças, indiretamente estará incrementando a resistência da outra. O valor foi de baixa magnitude, porém a significância demonstra que podem ter genes nesses acessos que influenciam os dois caracteres na mesma direção.

Essa estimativa da correlação genética foi corroborada pela identificação de dois acessos, o 10 (MG 277 RII) e o 11 (MG 279 (9) RII), correspondentes aos acessos que foram altamente resistentes à ferrugem e moderadamente resistentes à mancha-aureolada, com pouca segregação para a resistência. Essa constatação é importante e desejável, pois, dessa forma, o desenvolvimento de cultivares com resistência múltipla é facilitado.

Figura 3 - Severidade de cercosporiose em função das avaliações com intervalo de sete dias nos genótipos testados.



Fonte: Do autor (2010).

4.4 Relação entre resistência à doença e composição constitutiva

Todos os compostos e enzimas analisados demonstraram variância genética herdável, exceto para o ácido clorogênico e lignina, demonstrando que a constituição genética dos acessos influencia nessas composições. Para a maioria dos compostos estudados, a herdabilidade foi elevada, possibilitando ganhos genéticos pela seleção dessas variáveis, desde que elas sejam associadas a alguma característica de interesse. Os altos valores de herdabilidade para a PPO, cafeína e compostos fenólicos, indicam que são pouco afetados pelo ambiente (Tabela 9).

Tabela 8 - Estimativa dos parâmetros genéticos da atividade das enzimas PAL, POX e PPO, teores de trigonelina, ácido clorogênico, cafeína, compostos fenólicos totais e lignina nos acessos do banco ativo de germoplasma de Minas Gerais, Patrocínio-MG.

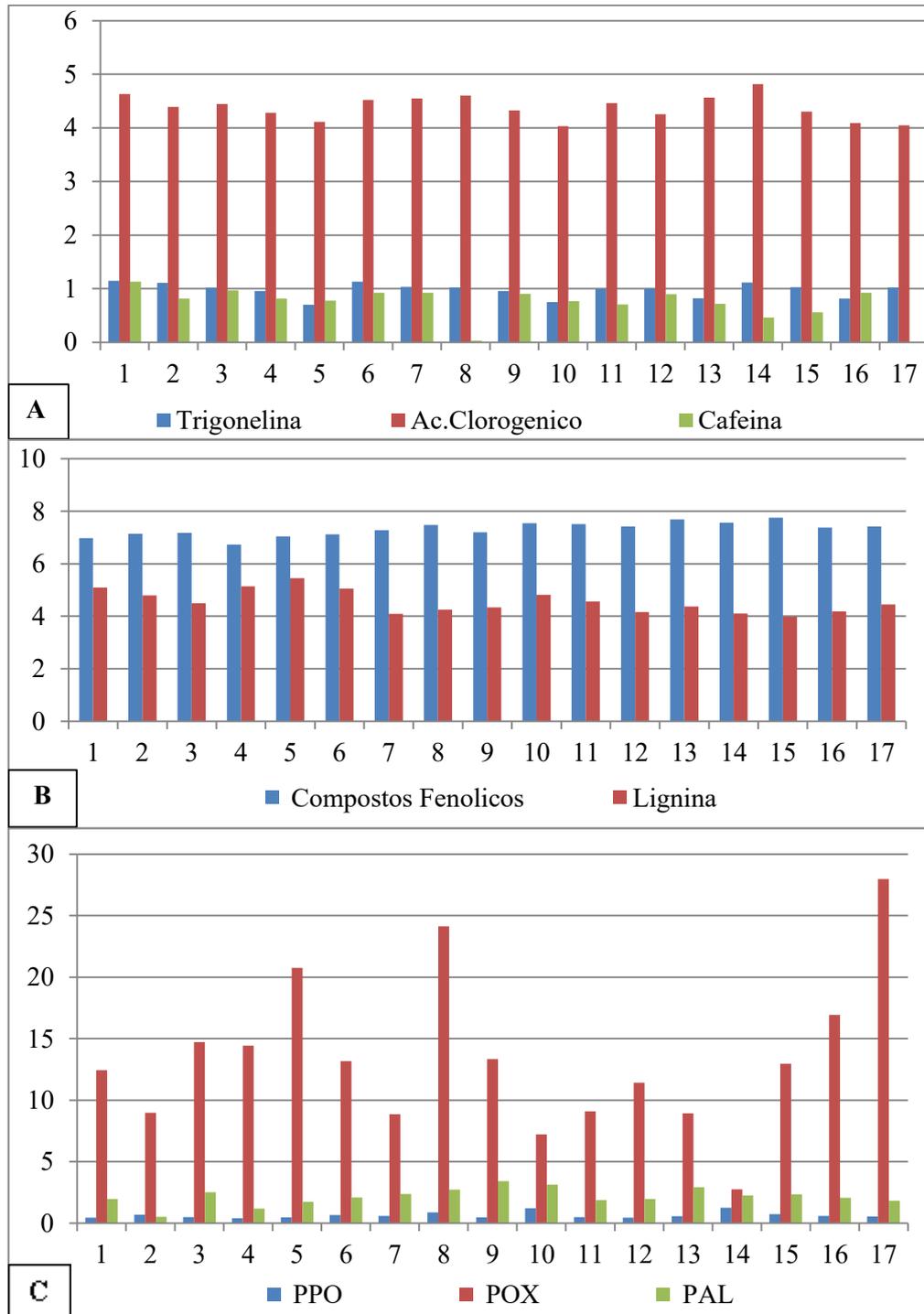
Par.	PPO	POX	PAL	Trigon.	Ácido Clorog.	Cafeína	Lignina	Comp. Fenol.
Vg	0,056*	27,843*	0,394*	0,014*	0,029	0,093*	0,116	0,065*
Vf	0,1003	86,4634	0,8370	0,0299	0,1373	0,1058	0,4785	0,1013
h ₂	0,55	0,70	0,81	0,82	0,58	0,97	0,61	0,90

Fonte: Do autor (2020).

Os valores da determinação das enzimas e dos compostos bioativos encontram-se na Figura 4. Chama a atenção que, nos tratamentos 17 (Catiguá MG2) e 8 (MG331), não ter sido identificada cafeína na folha, ao contrário dos demais. Para os outros compostos, a variação existe, porém não foi extrema. Caso seja identificada, nessa população de plantas, alguma característica fenotípica relacionada a esses compostos, eles podem ser utilizados na seleção de plantas resistentes ou no descarte de plantas suscetíveis.

Na análise de correlação genética entre a quantificação das enzimas e compostos bioativos em genótipos de cafeeiro, sem a inoculação das doenças estudadas, visando determinar a defesa constitutiva dos materiais estudados, observou-se correlação significativa apenas entre a resistência à cercosporiose do cafeeiro e a atividade da enzima PAL (Tabela 10). No entanto, como a severidade da cercosporiose apresentou baixa herdabilidade, essa correlação não é relevante para o contexto estudado. Sendo assim, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a resistência dos genótipos de cafeeiro avaliados não foi relacionada com sua defesa constitutiva, quantificada pela atividade das enzimas PAL, POX e PPO e compostos bioativos (trigonelina, ácido clorogênico e cafeína).

Figura 4 - Gráfico dos teores constitutivos na folha dos 17 tratamentos, A - teores constitutivos de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em (%), B - teores constitutivos de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em (%), e C - atividade constitutiva das enzimas PPO, POX, e PAL, em (AE $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot).



Fonte: Do autor (2010).

Verifica-se que esses compostos são importantes na defesa de plantas em diversos patossistemas (MONTEIRO *et al.*, 2016; POSSA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2010). No entanto vale ressaltar que a possibilidade das análises não serem

realizadas, após a inoculação das doenças estudadas, ter influenciado os resultados. Este trabalho é importante e deve ser abordado em estudos futuros para se verificar as relações da quantificação de compostos de defesa x processo de infecção de patógenos. Mesmo se a acurácia na seleção indireta não for próxima de 100%, o screening e descarte de plantas sem potencial de resistência já será um avanço.

Tabela 9 - Coeficiente de correlação de Pearson entre os dados de atividade das enzimas PAL, POX e PPO, teores de trigonelina, ácido clorogênico, cafeína, compostos fenólicos totais e lignina para as doenças ferrugem, cercosporiose e mancha-aureolada do cafeeiro avaliada em diferentes acessos.

Doença	PPO	POX	PAL	Trig.	Ácido Clorog.	Cafeína	Lign.	Comp. Fenól.
Ferrugem	-0,07	-0,17	-0,03	-0,37	-0,37	0,17	-0,22	0,08
PPO		-0,08	0,29	-0,05	0,16	-0,59	-0,25	0,54
POX			0,06	0,15	0,10	-0,45	0,23	-0,3
PAL				-0,46	-0,05	-0,02	-0,40	0,53
Trigonelina					0,70	-0,02	-0,03	-0,27
Ác. Clor.						-0,31	-0,23	0,13
Cafeína							0,36	-0,50
Lignina								-0,69
C. fenólicos								
	PPO	POX	PAL	Trig.	Ácido Clorog.	Cafeína	Lign.	Comp. Fenól.
Cercosp.	-0,23	-0,15	-0,54	0,33	0,28	0,05	0,126	-0,20
PPO		-0,08	0,29	-0,05	0,166	-0,59	-0,25	0,54
POX			0,06	0,15	0,10	-0,45	0,23	-0,3
PAL				-0,46	-0,055	-0,24	-0,40	0,53
Trigonelina					0,70	-0,02	-0,03	-0,27
Ác. Clor.						-0,31	-0,23	0,13
Cafeína							0,36	-0,50
Lignina								-0,69
C. fenólicos								
Doença	PPO	POX	PAL	Trig.	Ácido Clorog.	Cafeína	Lign.	Comp. Fenól.
M. aureolada	-0,10	0,21	0,29	0,06	-0,00	0,07	-0,24	-0,16
PPO		-0,08	0,29	-0,05	0,16	-0,59	-0,25	0,54
POX			0,06	0,15	0,105	-0,45	0,233	-0,3
PAL				-0,46	-0,05	-0,24	-0,40	0,53
Trigonelina					0,70	-0,02	-0,03	-0,27
Ác. Clor.						-0,31	-0,23	0,13
Cafeína							0,36	-0,50
Lignina								-0,69
C. fenólicos								

Fonte: Do autor (2020).

Valores em negrito indicam significância a 5% de probabilidade.

Desta forma, infere-se que quanto maior atividade constitutiva da enzima PAL, menor severidade da cercosporiose do cafeeiro. A biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas, dentre elas, a fenilalanina amônia liase (PAL), responsável por catalisar a conversão da fenilalanina em ácido *trans*cinâmico, resultando em fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina, os quais podem conferir maior resistência à parede celular das plantas (NAKAZAWA *et al.*, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009; ZHAO, 2016).

De modo geral, não se encontrou correlação entre resistência à doença e teores constitutivos da atividade das enzimas e dos teores de compostos bioativos. Vários trabalhos, a exemplo de (DINIZ *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2002, 2008), constataram que ocorre um aumento significativo da produção das enzimas e de alguns compostos bioativos durante o processo de infecção da doença. Apesar de todos os tratamentos apresentarem enzimas e compostos bioativos na folha, com exceção da cafeína nos tratamentos 8 e 17, (Figura 4), provavelmente, a falta da resposta da planta pela infecção do patógeno impede que se encontre correlação de resistência à doença e atividade da enzima de maneira constitutiva.

Por outro lado, Silva *et al.* (2008), quantificando a atividade das enzimas peroxidases e seus efeitos na área lesionada, em folhas de genótipos resistentes e susceptíveis de cafeeiro à ferrugem, antes e durante a infecção, demonstram que tanto as plantas susceptíveis quanto as resistentes possuem aumento na atividade da enzima após a inoculação, porém o genótipo resistente possui uma resposta mais rápida tornando o controle efetivo. Quando se comparavam a resposta da atividade da enzima entre dois genótipos resistentes, o genótipo resistente com a atividade enzimática constitutiva mais elevada barrou o desenvolvimento do patógeno com mais eficiência que o genótipo resistente com atividade constitutiva menor.

Portanto, apesar de não haver correlação entre resistência à doença e atividade constitutiva das plantas, essa informação pode se tornar relevante.

A correlação significativa positiva das enzimas PAL, PPO e os compostos fenólicos podem ser explicadas pela atividade da enzima PPO, a qual tem sido associada à lignificação, pois forma ligações cruzadas entre grupos fenólicos e proteínas de parede, pectinas e outros polímeros, além de ter um papel importante na oxidação de compostos fenólicos (MAYER; STAPLES, 2002; MENDONÇA; GUERRA, 2003). Já a enzima PAL possuiu relação direta com produção de compostos fenólicos (NAKAZAWA *et al.*, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009).

4.5 Considerações do potencial dos acessos selecionados no melhoramento genético do cafeeiro

Por meio dos resultados obtidos, pode-se traçar algumas estratégias nos cruzamentos a serem realizados, utilizando-se as plantas selecionadas para a resistência à ferrugem e à mancha-aureolada, aproveitando a resistência múltipla identificada. Os melhores acessos para a ferrugem possuem resistência completa e os melhores para a resistência à mancha-aureolada são moderadamente resistentes com segregação média para a resistência. Portanto essas plantas podem ser utilizadas para aumentar o nível de resistência à ferrugem de cultivares elite, como as “Catucaís”, por exemplo. Essas cultivares são derivadas do cruzamento entre Icatu e Catuaí, os quais possuem resistência moderada à ferrugem e são altamente produtivas. Dessa forma, poderiam ser utilizadas diferentes constituições genéticas de resistência, agrupando genes de maior efeito por parte dos acessos estudados neste trabalho com os poligenes dos ‘Catucaís’ e, ainda, estariam se adicionando nessas populações alelos de resistência à bacteriose.

Poderiam ser realizados, também, cruzamentos desses acessos com cultivares derivadas do Híbrido de Timor como a cultivar MGS Paraíso 2. Outros cruzamentos interessantes poderiam ser feitos entre cultivares que possuem o gene SH3 de *Coffea liberica*. Nesses cruzamentos, poderia se utilizar uma cultivar, como o Catuaí SH3, com esses acessos de resistência completa, conseguindo assim adicionar genes de diferentes origens. Outra possibilidade nessa linha seria o cruzamento desses acessos com a cultivar IPR-100, um descendente de *C. liberica* com ótimas características agrônomicas e resistência à *Meloidogyne* spp. porém suscetível à ferrugem. Conforme mencionado anteriormente, a piramidação gênica de genes de maior efeito com o acúmulo de poligenes é importante para a eficiência da resistência.

Os acessos identificados como resistentes para as doenças devem ser multiplicados via semente, preferencialmente utilizando a autofecundação com proteção de ramos, para evitar possíveis cruzamentos com outras plantas do banco de germoplasma. Obtidas as progênies autofecundadas, elas serão plantadas em campo, para seu estudo pormenorizado, pois, além da resistência, é necessário conhecer outras de suas características.

Um aspecto prático importante de ser mencionado quanto à resistência à mancha-aureolada é que os melhores acessos não foram resistentes pela média das avaliações. Entretanto, ao final do experimento, várias plantas foram resistentes dentro dos acessos. Essas plantas devem ser cultivadas em campo para sua utilização e estudo. Com isso, em uma planta

bem manejada, ter-se-ão genitores com provável resistência completa, sendo utilizados em campos de cruzamentos, em menos de um ano, quando essas plantas florescem pela primeira vez.

Percebeu-se que os experimentos de avaliação de resistência, conduzidos em ambientes controlados e com inoculação artificial, são úteis no processo de melhoramento. Além de promover a segurança contra falsos positivos de resistência, proporcionam a oportunidade de plantar no campo apenas plantas com potencial já confirmado. Salienta-se que, com as condições ambientais diversas no ambiente não controlado, a resistência pode ser alterada. Porém, neste caso, tem-se considerável confiança de que as plantas identificadas como resistentes o serão também em campo pelo fato de se ter realizado o experimento duas vezes para cada doença.

5 CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética para a resistência à ferrugem, por meio da qual se podem selecionar cafeeiros com alto nível de resistência, próximos à imunidade.

Detectou-se variabilidade genética para a resistência à bacteriose com nível de resistência moderado.

Para a cercosporiose não houve variabilidade genética nas condições experimentais.

Dois dos acessos avaliados foram altamente resistentes à ferrugem e com bom nível de resistência para a mancha-aureolada e com baixa segregação de plantas suscetíveis.

Existe variabilidade genética, para composição constitutiva de algumas enzimas e compostos bioativos entre os acessos estudados, sem, no entanto existir correlação com o nível de resistência à doença.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Academic, 2005. 952 p.
- ALMAGRO, L. *et al.* Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 377-390, 2009.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E. D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.
- BELAN, L. L. *et al.* Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 11-12, p. 801-810, Dec. 2014.
- BETTENCOURT, A. J.; CARVALHO, A. Melhoramento visando a resistência do cafeeiro a ferrugem. **Bragantia**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 35-68, jan. 1968.
- BOTELHO, D. M. dos S. *et al.* Cercosporiosis resistance in coffee germplasm collection. **Euphytica**, Wageningen, v. 1, n. 11, p. 213, n. 117-213, June 2017.
- BRAGHINI, M. T. *et al.* Durabilidade da resistência à ferrugem de cafeeiros portadores do gene SH3. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 9., 2015, Curitiba. **Anais [...]**. Brasília, DF: Embrapa Café, 2015. p. 1-4.
- CABRAL, P. G. C. *et al.* Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Collingwood, v. 4, p. 129–130, 2009.
- CAPUCHO, A. S. *et al.* Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 1144–1150, Dec. 2011.
- CARVALHO, V. L. *et al.* Manejo de doenças do cafeeiro. In: REIS, P. R. *et al.* (ed.). **Café Arabica: do plantio a colheita**. Lavras: U.R. EPAMIG SM, 2010. p. 689-756.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 2, p. 764-775, 1955.
- CHEN, X. A review on coffee leaves: phytochemicals, bioactivities and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 59, n. 6, p. 1008-1025, 2019.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Observatório agrícola. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café**, Brasília, v. 5, n. 3, p. 1-49, set. 2019.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Observatório agrícola. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café**, Brasília, v. 6, n. 1, p. 1-62, jan. 2020.
- CONCEIÇÃO, A. S. da; FAZUOLI, L. C.; BRAGHINI, M. T. Avaliação e seleção de progênies F3 de cafeeiros de porte baixo com o gene *sh3* de resistência a *Hemileia vastatrix* Berk. Et br. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 547-559, 2005.

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.

DAVIS, A. P. *et al.* Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 167, n. 4, p. 357–377, Dec. 2011.

DEL GROSSI, L. *et al.* Rust resistance in Arabic coffee cultivars in Northern Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 1, p. 27-33, jan./fev. 2013.

DELL' ACQUA, R. *et al.* Variabilidade in vitro, in vivo e molecular de isolados de *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 313-326, set./out. 2011.

DINIZ, I. *et al.* Fungal penetration associated with recognition, signaling and defence-related genes and peroxidase activity during the resistance response of coffee to *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 104, p. 119-127, Jan. 2019.

DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p.473-477, 1988.

ESKES, A. B.; COSTA, W. M. da. Characterization of incomplete resistance to *Hemileia vastatrix* in the Icatu coffee population. **Euphytica**, Wageningen, v. 32, n. 2, p. 649-657, May 1983.

FASSIO, O. L. *et al.* Sensory profile of arabica coffee acesses of the germplasm collection of Minas Gerais – Brazil. **Coffee Science**, Lavras, v. 14, n. 3, p. 382-393, set. 2019.

FAZUOLI, L. C. *et al.* IAC 125 RN – A dwarf coffee cultivar resistant to leaf rust and root-knot nematode. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 18, n. 2, p. 237-240, abr./jun. 2018.

FAZUOLI, L. C. *et al.* IAC Catuaí SH3 – A dwarf Arabica coffee cultivar with leaf rust resistance and drought tolerance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 19, n. 3, p. 356-359, jul./set. 2019.

GICHURU, E. K. *et al.* Additional physiologic races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 424-427, nov./dez. 2012.

GODOY, C. V. *et al.* **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 1997. v. 2.

ITO, D. S. *et al.* Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 8, n. 1, p. 99-103, jan./mar. 2008.

- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 7117, p. 323-329, Nov. 2006.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969-979, June 1970.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catase, peroxidase and polyphenoloxidase, activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 57, n. 2, p. 315-319, Feb. 1976.
- KIMATI, H. *et al.* (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 686 p.
- MALTA, M. R.; CHAGAS, S. J. de R. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região Sul de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 57-61, jan./mar. 2009.
- MARTINS, R. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Genetic variability of *Cercospora coffeicola* from organic and conventional coffee plantings, characterized by vegetative compatibility. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 11, p. 1205-1211, Nov. 2008.
- MATIELLO, J. B. *et al.* **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA, 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.
- 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.
- MESQUITA, C. M. *et al.* **Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (Coffea arábica L.)**. Belo Horizonte: Emater-MG, 2016. 62 p.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.
- MOHAN, S. K.; CARDOSO, R. M. L.; PAIVA, M. A. Resistência em germoplasma de *Coffea* ao cretamento bacteriano incitado por *Pseudomonas garcae* AMARAL *et al.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 53-64, 1978.
- MONTEIRO, A. C. A. *et al.* Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 164, p. 1043-1053, 2016.
- MORAES, S. A. *et al.* Resistência de cafeeiros a *Pseudomonas garcae*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, p. 105-110, 1975.

- NAKAZAWA, A. *et al.* Expression pattern and gene structure of phenylalanine. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 3, p. 323-328, Sept. 2001.
- NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 234-250, 2014.
- NOIROT, M. *et al.* Reproductive isolation, gene flow and speciation in the former *Coffea* subgenus: a review. **Trees**, Santa Mônica, v. 30, p. 597-608, Dec. 2015.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. *In*: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 365-392.
- PATRICIO, F. R. A.; BRAGHINI, M. T.; FAZUOLI, L. C. Resistance of plants of *Coffea arabica*, *Coffea canephora* and interespecific hybrids to brown eye spot. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p.883–890, dez. 2010.
- PEREIRA, A. A. *et al.* Cultivares: origem e suas características. *In*: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (ed.). **Café Arábica: do plantio a colheita**. Lavras: Epamig, 2010. p. 163-222.
- PETEK, M. R. *et al.* Seleção de progênies de *coffea arabica* com resistência simultânea à mancha aureolada e à ferrugem alaranjada. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 65-73, 2006.
- POSSA, K. F. *et al.* Primary metabolism is distinctly modulated by plant resistance inducers in *coffea arabica* leaves infected by *Hemileia vastatrix*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, p. 1-16, Mar. 2020.
- 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.
- POZZA, E. A. *et al.* Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. *In*: GUIMARÃES, R. J. *et al.* (ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. p. 69-101.
- RAIMUNDI, M. K. **Identificação bioquímica, molecular e patogenicidade de isolados de *pseudomonas spp.* provenientes e cafeeiros em Minas Gerais**. 2017. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- RESENDE, M. D. V. **SELEGEN-REML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelo lineares mistos**. Colombo: Embrapa Floresta, 2007. 359 p.
- RODRIGUES, F. A. *et al.* Níveis de ácido clorogênico em folhas de plantas de cafeeiro supridas com silício e infectadas por *Hemileia vastatrix*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 404-408, nov./dez. 2011.
- RODRIGUES, L. M. R. *et al.* **Mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Campinas: Instituto Agronômico, 2013. 24 p. (Boletim Técnico, 212).

RODRIGUES, L. M. R. *et al.* Multiple resistance to bacterial halo blight and bacterial leaf spot in *Coffea* spp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 86, p. 1-9, nov. 2019.

ROMERO, G. G. *et al.* Partial resistance to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee (*Coffea arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, p. 685–697, 2010.

SCHERER, N. M. *et al.* Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 645–653, out./dez. 2005.

SERA, T. *et al.* IPR 100 – Rustic dwarf Arabica coffee cultivar with resistance to nematodes *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 17, n. 2, p. 175-179, abr./jun. 2017.

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**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 169-183, Mar. 2002.

SILVA, M. do C. *et al.* Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 119–147, jan./mar. 2006.

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

SILVA, M. G. da *et al.* Effect of light and temperature on *Cercospora coffeicola* and *Coffea arabica* pathosystem. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 148-160, abr./jun. 2016.

SILVA, R. V. *et al.* Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicone. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 586–593, June 2010.

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.

SOUZA, A. G. C.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 10, p. 540-546, Oct. 2012.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TALHINHAS, P. *et al.* The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1039–1051, Oct. 2017.

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

VAN DER VOSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**, Wageningen, v. 204, v. 2, p. 243-256, Feb. 2015.

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

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: Ed. UFV, 2005. p. 53-74.

ZAMBOLIM, L. Doença do Cafeeiro. *In*: AMORIM, L. *et al.* (ed.). **Manual de fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 193-213.

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.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 283–333, June 2005.

ZHAO, Q. Lignification: flexibility, biosynthesis and regulation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 21, n. 8, p. 713-721, Aug. 2016.

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

ANEXO A - TABELA

Tabela 1 - Triagem de 30 genótipos para resistência à ferrugem *H. vastatrix* e mancha-aureolada *P. syringae* pv. *garcea.*, com valor genético (u+g) da severidade média da doença.

Trat	Acessos	Genealogia dos acessos	Ferruge	Bactéria
			(u + g)	(u + g)
1*	MG 0451	M.N. x S 795 UFV 335-68	0,507	0,7352
2	MG 0280	H.T. UFV 376-14	4,2406	0,6476
3*	MG 0446	M.N. x S 795 UFV 335-13	0,507	0,7149
4	MG 176 pl 1,2 RI	Amphillo X HN MR 36-349	1,5465	0,8508
5*	MG 0331	H.T. UFV 437-06	0,507	0,5142
6	MG 0430	M.N. x S 795 UFV 315-77	3,9301	0,8669
7*	MG 0270 pl 5 RI	H.T. UFV 377-21	0,507	1,0149
8	MG 0296	H.T. UFV 408-11	1,1555	0,7367
9*	MG 0443	M.N. x S 795 UFV 335-09	0,507	0,7828
10	MG 0291 RII	H.T. UFV 379-07	2,7508	0,5611
11*	MG 0176 RII	Amphillo X HN MR 36-349	0,572	0,7325
12*	MG 0270 pl 1,3,6	H.T. UFV 377-21	0,507	0,4702
13	MG 0333 pl 1 RI	H.T. UFV 437-10	7,0187	0,6373
14*	MG 0279 pl 9 RII	H.T. UFV 376-31	0,5937	0,8861
15	MG 0448	M.N. x S 795 UFV 335-15	2,2347	0,7726
16	MG 0439	M.N. x S 795 UFV 335-05	1,2347	0,7697
17	MG 265 pl 1 RI	Durandé Arabica x Canephora	2,8028	0,8112
18*	MG 364 pl 4 RI	H.T. UFV 442-42	0,507	0,7151
19	MG 0445	M.N. x S 795 UFV 335-11	7,2604	1,5272
20	MG 0440	M.N. x S 795 UFV 335-06	4,6857	1,1893
21*	MG 0534	BE5Wush-Wush xH.T. UFV366-08	0,507	0,4702
22	MG 0380	H.T. UFV 445-70	1,2212	0,768
23*	MG 0441	M.N. x S 795 UFV 335-07	0,507	0,6161
24*	MG 0311 RII	H.T. UFV 428-02	0,507	0,8028
25*	MG 0296 pl 6 RII	H.T. UFV 408-11	0,507	1,2965
26*	MG 0308 pl 7 RII	H.T. UFV 427-55	0,7152	0,5928
27	MG 0450	M.N. x S 795 UFV 335-48	2,2527	0,9568
28	Catuaí V. IAC 99	Caturra A. IAC 476-11 x Mundo Novo 374-19	4,0768	0,8519
29*	MG 0277 RII	H.T. UFV 376-52	0,507	0,9859
30	Catiguá MG 2	Catuaí A. IAC 86 x Híbrido Timor (UFV 440-	0,507	0,7352

*Genótipos selecionados na triagem.