



PRISCILLA DE FÁTIMA PEREIRA

**FOSFITO DE POTÁSSIO NA ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS DE
DEFESA EM GENÓTIPOS DE *Coffea arabica***

**LAVRAS – MG
2022**

PRISCILLA DE FÁTIMA PEREIRA

**FOSFITO DE POTÁSSIO NA ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA EM
GENÓTIPOS DE *Coffea arabica***

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

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

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

Pereira, Priscilla de Fátima.

Fosfito de potássio na ativação de respostas de defesa em
genótipos de *Coffea arabica* / Priscilla de Fátima Pereira. - 2022.
80 p. : il.

Orientador(a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Coorientador(a): Natália Chagas Freitas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Indutor de resistência. 2. Ácido salicílico. 3. Espécies
reativas de oxigênio. I. Resende, Mário Lúcio Vilela de. II. Freitas,
Natália Chagas. III. Título.

PRISCILLA DE FÁTIMA PEREIRA

**FOSFITO DE POTÁSSIO NA ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA EM
GENÓTIPOS DE *Coffea arabica***

**POTASSIUM PHOSPHITE ON THE ACTIVATION OF DEFENSE RESPONSES IN
Coffea arabica GENOTYPES**

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

APROVADA em 27 de janeiro de 2022.

Dr. Eduardo Alves

Dra. Leonor de Castro Esteves Guerra Guimarães

Dra. Sandra Marisa Mathioni

Dr. Bruno Henrique Garcia Costa

Dr. Wesley Pires Flausino Máximo


UFLA

ISA, Universidade de Lisboa

Syngenta

Nutrien Soluções Agrícolas

UFLA, PPG Biotecnologia Vegetal



Mário Lúcio Vilela de Resende
Prof. Titular, Ph.D.
Depto. Fitopatologia, UFLA

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

Ao meu esposo, Patrick, meu companheiro inseparável.

Aos meus pais e irmã, minha base.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Por ser a base de tudo em minha vida, agradeço a Deus por não permitir que eu fraquejasse nos momentos árdios, assim como por manter minha fé quando mais precisei.

Patrick, meu esposo, por todo amor, carinho, cuidado, compreensão, dedicação, abdicção e incentivo; foi um exemplo em toda minha jornada e sempre me apoiou para que eu nunca desistisse de meus sonhos. Obrigada por compartilhar e estar presente em cada momento. Sem você, não seria possível!

Aos meus pais, José Heitor e Clara, e a minha irmã, Francielly, agradeço por tudo, dedicaram-se sempre e apoiaram-me para que houvesse a conclusão de meus estudos, por meio de suporte, incentivo, amor e carinho para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigada por me ajudarem a construir meus sonhos e a caminhar até realiza-los. Minha eterna gratidão!

Ao meu orientador Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende, que é um exemplo de profissional, por toda orientação, ajuda, assim como a paciência e conselhos durante esse tempo acadêmico. Todos seus ensinamentos foram e serão de grande importância para minha formação e evolução pessoal e profissional.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade, suporte e estrutura para que eu obtivesse o título de doutora. A Capes pela concessão de bolsa de estudos. A Fapemig e ao INCT-Café pelo financiamento do trabalho.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia do Parasitismo, pelo convívio e aprendizado diários. Por todo trabalho em equipe! Em especial, agradeço, a Deila, Tharyn e Mariana por tudo que me ensinaram, por todo o apoio, profissionalismo, paciência, amizade e carinho que tiveram comigo nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Aos professores do departamento de Fitopatologia que dividiram seus conhecimentos e contribuíram para minha formação. Aos funcionários do departamento de Fitopatologia que de alguma forma me auxiliaram durante esse período.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas valorosas contribuições.

Por tornarem essa caminhada mais prazerosa, agradeço aos meus queridos familiares e amigos. Em especial a amiga e mentora Natália, profissional exemplar, por todo o ensinamento, ajuda, conselhos, carinho, amizade, por tudo que me ensinou desde o projeto até a conclusão desse trabalho. Serei eternamente grata por contribuir para meu crescimento pessoal e profissional. E ao meu cunhado, Ricardo, por todo incentivo e ajuda.

Aos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho e para o meu crescimento profissional nesses anos de formação, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A cultura do café está entre as principais *commodities* do Brasil. As doenças de plantas são uns dos principais fatores que afetam diretamente a produtividade do cafeeiro, acarretando perdas significativas, com destaque à ferrugem do cafeeiro. O principal método de controle dessa doença é o tratamento químico, porém, existe uma demanda por um café isento de resíduos de moléculas nocivas ao homem e ao ambiente. Uma opção a esses produtos é o uso dos indutores de resistência, uma medida de manejo de doenças que envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes da planta. Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito de fosfito de potássio (K-Phi) em cultivares de cafeeiro com genótipos contrastantes quanto à ferrugem. Visando elucidar o mecanismo pelo qual K-Phi ativa as defesas das plantas de cafeeiro, estudamos a expressão de genes e atividade de enzimas envolvidas desde a sinalização célula a célula até a biossíntese e quantificação de metabólitos secundários, comparado ao indutor padrão acibenzolar-S-metil (ASM). Observou-se que a aplicação foliar de K-Phi aumentou a transcrição de genes (*PAL*, *EDSI*, *NPRI*, *GLU* e *POX*) relacionados à via de respostas de defesa do hormônio vegetal ácido salicílico e à biossíntese de metabólitos secundários, além disso, aumentou a atividade de enzimas (SOD, APX e PPO) de defesa relacionadas à explosão oxidativa e a formação dos metabólitos. Os resultados obtidos a partir da expressão gênica e da quantificação dos metabólitos após tratamento com K-Phi foram semelhantes ao observados após aplicação do indutor padrão ASM em várias situações avaliadas (cultivares e tempos de coleta). Provavelmente, o mecanismo de ação do K-Phi na indução de resistência do cafeeiro envolve a mesma via induzida pelo ASM. Portanto, o K-Phi pode ser considerado um potente indutor de resistência do cafeeiro à ferrugem, pois o tratamento prévio das plantas com esse indutor foi capaz de induzir o aumento de respostas de defesa em cultivares de cafeeiro resistentes e suscetíveis, mesmo na ausência do patógeno.

Palavras-chave: Ácido salicílico. Espécies reativas de oxigênio. Resistência sistêmica adquirida. Indutor de resistência. Ferrugem.

ABSTRACT

The coffee culture is among the main commodities in Brazil. Plant diseases are one of the main factors that directly affect the productivity of the coffee tree, causing important losses, among which the coffee tree rust stands out. The main method of controlling this disease is chemical treatment, however, there is a demand for coffee free from residues of molecules that are harmful to man and the environment. One option for these products is the use of resistance inducers, a disease management measure that involves activating the plant's latent defense mechanisms. The present work aimed to evaluate the effect of potassium phosphite (K-Phi) on coffee cultivars with contrasting genotypes for rust. In order to elucidate the mechanism by which K-Phi activates defense responses in coffee plants, we studied the gene expression and enzymatic activity of components involved in the defense pathway of salicylic acid (SA), compared to the standard inducer acibenzolar-S-methyl (ASM). The quantification of metabolites was also performed. It was observed that a foliar application of K-Phi increased the transcription of genes related to the defense response pathway of the SA and the biosynthesis of secondary metabolites (PAL, EDS1, NPR1, GLU and POX), in addition, it increased the activity of defense enzymes related to oxidative explosion and the formation of secondary metabolites (SOD, APX and PPO). All these variables, quantified after treatment with K-Phi, presented results similar to the standard ASM inducer in several situations evaluated (cultivars and collection times). So, possibly, the mechanism of action of K-Phi in inducing resistance in coffee plants involves the same pathway induced by ASM. The results obtained demonstrate that K-Phi can be considered a potent coffee plant resistance inducer, as the previous treatment of plants with this inducer was able to induce an increase in defense responses in resistant and rust-susceptible coffee cultivars, even in the absence of the pathogen.

Keywords: Salicylic acid. Reactive oxygen species. Systemic acquired resistance. Resistance inducer. Rust.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 A cultura do café	12
2.2 Ferrugem do cafeeiro	13
2.3 Mecanismo de defesa das plantas	16
2.4 Respostas de defesa dependentes da via do ácido salicílico	19
2.5 Indutores de resistência	24
REFERÊNCIAS	29
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	37
ARTIGO – FOSFITO DE POTÁSSIO NA ATIVAÇÃO DE COMPONENTES ASSOCIADOS A RESPOSTAS DE DEFESA EM GENÓTIPOS DE <i>Coffea arabica</i>	38

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor mundial de café. A cultura está entre as principais *commodities* do país, com uma produção de mais de 48,8 milhões sacas (60 kg) beneficiadas para a safra de 2021. Entre os principais estados produtores de café no Brasil, Minas Gerais é o líder na produção, sendo responsável por mais de 45% da produção nacional em 2021 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2021). Um dos fatores que afetam diretamente a produtividade do cafeeiro são as doenças de plantas, com destaque para os patógenos especialmente o agente etiológico da ferrugem alaranjada, *Hemileia vastatrix* (TALHINHAS *et al.*, 2017).

O patógeno, em condições favoráveis e dependendo do genótipo hospedeiro, pode causar quedas de até 50% na produtividade da cultura (ZAMBOLIM, 2016), fator que aumenta ainda mais a relevância da escolha correta dos métodos de controle. O tratamento químico é o principal método de controle e, de acordo com produtores, aproximadamente 8% do custo total da produção por saca é destinado ao controle da ferrugem (IAC, 2017). Porém, existe uma demanda por um café livre de resíduos químicos nocivos ao homem e ao ambiente, associada com a crescente exigência da produção certificada (RESENDE *et al.*, 2021). Neste cenário, o uso de cultivares resistentes é uma alternativa eficaz e durável, que diminui custos e contaminação ambiental (TALHINHAS *et al.*, 2017). No entanto, 85% dos cafezais plantados no país correspondem a cultivares suscetíveis a ferrugem (IAC, 2017).

Outra ferramenta que pode ser empregada no manejo de doenças de plantas é o uso de indutores de resistência, uma forma alternativa para o controle de doenças causadas por fitopatógenos. Seu princípio é ativar a resistência latente da planta, aumentando sua capacidade de defesa diante da invasão de um microrganismo patogênico, mecanismo conhecido como efeito *priming* (CONRATH, 2011; OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016). Este efeito pode ser ativado após a aplicação de compostos químicos (MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016), extratos vegetais (RESENDE *et al.*, 2007), ou até mesmo de patógenos (CONRATH *et al.*, 2015).

Dentre os compostos químicos que podem eliciar as respostas de defesa das plantas estão os fosfitos, um dos elicitores mais estudados no cafeeiro (MONTEIRO *et al.*, 2016; NOJOSA *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2019). O modo de ação dos fosfitos e seus possíveis alvos na planta ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que, assim como o indutor padrão acibenzolar-S-metil (ASM, análogo do ácido salicílico), esse

composto induz o acúmulo de ácido salicílico (AS) e a expressão de genes de defesa (MACHINANDIARENA *et al.*, 2012; MASSOUD *et al.*, 2012).

Massoud e colaboradores (2012) demonstraram que o efeito da aplicação de fosfito em baixas doses em plantas de *Arabidopsis* é dependente de AS, induzindo o acúmulo de AS e o aumento dos transcritos de genes dependentes de AS, tais como o *NPR1* (non-expressor of pr1) e *PR1* (pathogenesis – related 1). Além disso, o indutor de resistência mobilizou dois componentes essenciais da resistência basal, a proteína *EDS1* (enhanced disease susceptibility1) e a *PAD4* (phytoalexin deficient1), que interagem diretamente entre si e ativam a amplificação das defesas locais por meio do acúmulo de AS (FALK *et al.*, 1999; FEYS *et al.*, 2001; JIRAGE *et al.*, 1999). O fosfito regula de forma negativa o gene *MPK4* (mitogen-activated protein kinase), responsável por regular negativamente as defesas dependentes de AS, e, desse modo, auxilia na iniciação das respostas de defesa da via do AS (MASSOUD *et al.*, 2012).

O gene *NPR1* atua como regulador principal das vias de sinalização dependentes do AS, pois, além de regular a expressão do gene alvo, ele regula sua própria expressão. Dentro do núcleo celular, o AS liga-se aos monômeros de *NPR1* e promove sua interação com os fatores de transcrição, como a quinase *CDK8* (cyclin-dependent kinase8), promovendo a transcrição dos genes *NPR1* e *PR1* (CHEN *et al.*, 2019). Outras *PRs* (pathogenesis related) apresentam alto pico de expressão durante a SAR, como *PR2* (β -1,3-glucanase) e a *PR5* (proteína tipo osmotina), as quais possuem atividade antimicrobiana, atuando na parede celular e na membrana plasmática de patógenos, respectivamente (DURRANT; DONG, 2004; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Os fosfitos também podem induzir a formação de metabólitos secundários pela mobilização de componentes da via dos fenilpropanoides. Monteiro e colaboradores (2016) demonstraram que a aplicação foliar de fosfito de manganês induziu o aumento da expressão dos genes *PAL* (fenilalanina amônia liase) e *POX* (peroxidase), e o aumento da atividade da enzima *PPO* (polifenol oxidase).

O estudo da expressão gênica é imprescindível quando se deseja conhecer as rotas metabólicas e de sinalização (GANESH *et al.*, 2006), uma vez que o reconhecimento de genes e também de enzimas compreendidos nas repostas de defesa podem auxiliar na elucidação do mecanismo de ação dos fosfitos no cafeeiro. Dessa forma, este estudo foi realizado com o intuito de avaliar o efeito do fosfito de potássio na ativação das respostas de defesa dependentes da via do AS em genótipos contrastantes de *C. arabica* quanto a resistência à ferrugem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do café

A cultura do cafeeiro pertence ao gênero *Coffea* e é formado por mais de 100 espécies (DAVIS *et al.*, 2006). No entanto, as espécies *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre são as mais cultivadas, com destaque para o café arábica por apresentar melhor qualidade de bebida. A cultura do café está entre as principais *commodities* do país, com uma produção de mais de 48,8 mil sacas (60 kg) beneficiadas para a safra de 2021. A demanda mundial pelo produto está crescendo, bem como os preços calculados mensalmente pela Organização Internacional do Café (OIC). O Brasil é o principal produtor de café arábica do mundo, seguido pela Colômbia, Etiópia e Honduras (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2021). A espécie *C. arabica* foi responsável por aproximadamente 68% da safra brasileira de 2021. Entre os principais estados produtores de café no Brasil, Minas Gerais é o maior produtor e foi responsável por mais de 45% da produção nacional em 2021, sendo que as regiões sul e centro-oeste do estado contribuíram com aproximadamente 52% dessa produção (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2021).

Em 2021, a produção nacional apresentou uma redução de 25,7% em relação à safra passada. O decréscimo do volume total da produção se deve, principalmente, ao ciclo da bienalidade da espécie, que consiste na alternância de um ano de maior rendimento, seguido por outro com rendimento inferior, sendo que a espécie *C. arabica* é mais influenciada por esse ciclo do que o *C. canephora* (CONAB, 2021). A bienalidade negativa de 2021 combinada com a condição climática desfavorável afetou diretamente a produção final, registrando baixos índices de precipitação, distribuição irregular das chuvas em várias regiões produtoras e a incidência de geadas ocorridas nos meses de junho e julho. Esses fatores influenciaram principalmente as fases mais significativas para o desenvolvimento do grão, enchimento e maturação. Além disso, a área destinada à produção é geralmente menor que nos anos de bienalidade positiva em razão do manejo das plantas que entrarão em produção no próximo ano e a aplicação de tratamentos culturais mais intensos com o propósito de recuperar o potencial vegetativo das plantas para a próxima safra. Por isso, a produção e as exportações mundiais de café apresentaram redução de 11 milhões e 4,8 milhões de sacas, respectivamente, comparadas à temporada anterior (CONAB, 2021).

Além da bienalidade negativa e das condições climáticas desfavoráveis, existem muitos outros fatores que afetam diretamente a produtividade do cafeeiro, acarretando perdas significativas, como exemplo, a ocorrência de doenças. Entre os patógenos que causam as principais doenças no cafeeiro, se destaca a *Hemileia vastatrix*, agente etiológico da ferrugem alaranjada (TALHINHAS *et al.*, 2017). Entretanto, diferentemente da natureza fisiológica da planta e das condições climáticas, existem várias soluções estratégicas para os problemas fitossanitários. Essas soluções visam o controle de doenças, buscando um manejo apropriado da cultura, a diminuição de perdas na produção e o avanço da cafeicultura no país.

2.2 Ferrugem do cafeeiro

Em 1861, na África Oriental, ocorreu o primeiro relato da ferrugem do cafeeiro (TALHINHAS *et al.*, 2017). Já no Brasil, o primeiro relato foi em 1970, na Bahia, onde a doença se estabeleceu e se disseminou rapidamente (CHAVES *et al.*, 1970 citado por ZAMBOLIM, p. 01). A forma de introdução do patógeno no país ainda é desconhecida, mas existem duas hipóteses. A primeira é que esporos foram disseminados a longa distância, sendo transportados da África a partir das correntes de vento marítimas; já a segunda hipótese é que os esporos foram introduzidos acidentalmente a partir de material infectado ou por meio de algum agente de disseminação, como por exemplo, o homem, insetos e animais (BOWDEN; GREGORY; JOHNSON, 1971). Além da disseminação a longa distância por material de propagação infectado ou por vetores, existem outras formas de disseminação do patógeno, tais como por respingos de água de irrigação e gotas de chuva (AGRIOS, 2005; MCCOOK, 2008).

O agente etiológico da ferrugem do cafeeiro, o fungo biotrófico *H. vastatrix*, faz parte do filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Mikronegeriaceae (AIME, 2006). A ferrugem apresenta três tipos de esporos: os uredinósporos representam a fase assexuada do microrganismo e apresentam forma reniforme, equinulados dorsalmente e lisos ventralmente. Os teliósporos representam a fase sexuada e são esporos de parede lisa e fina que germinam formando os basidiósporos, que ainda apresentam um papel desconhecido no ciclo de vida da ferrugem do cafeeiro (AGRIOS, 2005).

O inóculo primário principal das epidemias de ferrugem do cafeeiro são os esporos denominados uredinósporos. Essas estruturas reprodutivas germinam sobre a face abaxial das folhas e formam uma estrutura essencial para o sucesso da infecção denominada apressório,

que se adere à superfície do hospedeiro, facilitando a sua penetração e a emissão do haustório. Para os processos de germinação do uredinósporo e sua penetração ocorrerem, são necessárias temperaturas entre 22 e 23°C, ausência de luz e ao menos 48 horas de molhamento foliar. Após a penetração, o patógeno coloniza a câmara substomal e forma uma estrutura dilatada especializada na absorção de nutrientes a partir do citoplasma, o haustório. Os sintomas iniciais da doença se manifestam como pequenas manchas cloróticas na face abaxial das folhas, aumentando em dimensão e quantidade com a evolução da doença. Essas manchas se transformam em urédias de cor alaranjadas, onde se formam os uredinósporos. Consequentemente, a área fotossintética foliar é reduzida acarretando desfolha e queda da produção (MASSOLA JUNIOR; KRUGNER, 2011; POZZA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2002).

O patógeno pode causar até 50% de queda na produtividade do cafeeiro, dependendo do genótipo hospedeiro e das condições favoráveis para o desenvolvimento da doença (ZAMBOLIM, 2016). Diante desse fato, a escolha correta dos métodos de controle é relevante e o uso de cultivares resistentes é uma alternativa eficaz e durável (TALHINHAS *et al.*, 2017). Antes da chegada da ferrugem no Brasil já existia um programa de pesquisas desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e pelo Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal, empenhado em evitar a introdução da *H. vastatrix* no Brasil (BETTENCOURT; CARVALHO, 1968).

Muitas pesquisas em busca de cultivares resistentes à ferrugem do cafeeiro foram e estão sendo desenvolvidas pelo IAC e por outros órgãos públicos, incluindo o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). As pesquisas desenvolveram muitas cultivares resistentes a *H. vastatrix*, sendo que a maioria é derivada das populações do Híbrido de Timor. Esse híbrido é proveniente de um cruzamento natural entre uma cultivar de *C. arabica*, suscetível a ferrugem, e uma de *C. canephora*, com resistência a doença. Esse cruzamento tem valor histórico, pois a espécie arábica apresenta o dobro de cromossomos que a espécie robusta (TALHINHAS *et al.*, 2017).

Entre as cultivares resistentes pode-se citar a IAPAR-59, resultante do cruzamento das fontes de resistência Villa Sarchi CIFC 971/10 e Híbrido de Timor CIFC 832/2, realizado no CIFC. No Brasil, a geração F2 desse cruzamento foi recebida pelo IAC e após algumas gerações foi repassada ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), dando origem a essa cultivar que apresenta resistência completa à ferrugem (resistência a todas as raças). Outro exemplo é a MGS ARANÃS obtida a partir dos materiais Icatu Vermelho IAC 3851-2 e Catimor UFV 1602-215 em campo experimental da EPAMIG, materiais portadores de

resistência genética específica (vertical) e não-específica (horizontal) à ferrugem do café, respectivamente (BOTELHO *et al.*, 2010).

Mesmo sendo a forma mais eficaz de controle do patógeno, as cultivares resistentes não são muito utilizadas nas áreas cafeeiras do país. Os materiais mais plantados são as cultivares dos grupos Mundo Novo e Catuaí, os quais totalizam 85% dos cafezais no país devido às boas características agronômicas (IAC, 2017). A cultivar Mundo Novo é proveniente de um cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho, em Urupês – São Paulo, em 1943 (CARVALHO *et al.*, 1952). Após várias seleções de progênies, as linhagens geradas se apresentaram produtivas, vigorosas e adaptadas em várias regiões do país e foram liberadas pelo IAC a partir de 1977 para o plantio (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2014). Visando à introdução na cultivar Mundo Novo do gene *Ct* (Caturra) que confere porte baixo às plantas, surgiu, em 1949, as cultivares do grupo Catuaí. Com isso, a partir de 1964, sementes dessas plantas foram entregues a produtores a fim de testarem a produtividade sob várias condições climáticas das regiões cafeeiras do país. Os resultados foram positivos, pois esses cafeeiros apresentaram alta produtividade e alto vigor vegetativo (CARVALHO; MONACO, 1972). Por esse motivo, existe uma resistência cultural dos produtores em inserir novas cultivares nas áreas de plantio.

Diante disso, o método de controle mais utilizado é o químico. O controle preventivo é feito com os fungicidas cúpricos, enquanto o controle curativo é realizado com os fungicidas sistêmicos (triazóis e estrobirulinas). A alternância de aplicações entre os grupos de fungicidas cúpricos e sistêmicos é indicada para diminuir a possibilidade de seleção de populações de ferrugem resistentes aos fungicidas (ZAMBOLIM, 2016). De acordo com os produtores, o gasto com fungicidas é elevado, com cerca de 8% do custo total da produção por saca sendo destinado ao controle da ferrugem no Brasil (IAC, 2017). Já na Tanzânia, o gasto com fungicidas nessa cultura pode chegar a valores mais altos, até 50% do custo da produção (KILAMBO *et al.*, 2013).

Além do dispêndio com fungicidas, existe uma conscientização da sociedade em relação à segurança alimentar pela demanda de um café livre de resíduos de agrotóxicos, exigindo que a produção seja certificada, atendendo critérios de qualidade e cumprindo normas internacionais como a rastreabilidade da produção (MACIEL-ZAMBOLIM *et al.*, 2009). De acordo com o processo de revisão da Norma de Agricultura Sustentável da Rainforest Alliance 2020, o padrão de agricultura sustentável tem como objetivo principal promover sistemas agrícolas mais sustentáveis, propondo a implementação do manejo integrado e uma redução ainda maior do uso de produtos químicos. No Brasil, a questão dos

agroquímicos para a cultura do café é um desafio, pois a norma global suspende o uso de fungicidas necessários e permitidos pela legislação brasileira para o controle da ferrugem, como os triazóis: epoxiconazol, ciproconazol e triadimenol (BRASIL, 2003). Porém, ainda não foi sugerida uma data final para a suspensão do uso dessas substâncias (RAINFOREST ALLIANCE, 2021).

Diante do possível veto no uso de algumas moléculas com uso aprovado para o controle de patógenos na cultura do cafeeiro, torna-se necessário o uso de outras ferramentas no manejo de doenças de plantas que sejam eficazes e sustentáveis, uma vez que o aumento da produtividade ainda é dependente do controle químico de doenças. Dessa forma, a intensificação das pesquisas em busca dessas novas alternativas é indispensável, e o uso de indutores de resistência pode ser uma alternativa viável para o controle de doenças causadas por fitopatógenos.

2.3 Mecanismo de defesa das plantas

As plantas são resistentes à maioria das doenças ocasionadas por patógenos biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos, por meio de estruturas pré-formadas, como ceras ou cutículas, ou pós-formadas, que se formam após os mecanismos de percepção e transdução de sinais que atuam contra o desenvolvimento desses microrganismos. Atualmente, a percepção dos fitopatógenos pelas plantas está dividida em duas linhas. A primeira delas consiste no reconhecimento de padrões moleculares associados a micróbios/patógenos (MAMPs/PAMPs). Esses padrões são compostos moleculares conservados constituintes dos microrganismos, a exemplo da quitina presente na parede celular fúngica. O reconhecimento dessas moléculas é realizado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que iniciam a sinalização para ativar a resistência basal, também conhecida como imunidade desencadeada por PAMPs (Pattern-Triggered immunity; PTI). Os patógenos especializados podem codificar proteínas efetoras (fator de avirulência) que poderão suprimir a primeira linha de defesa. A segunda linha de defesa se baseia no reconhecimento destes efetores por proteínas de resistência, ativando a imunidade desencadeada por efetores (effector-triggered immunity; ETI), caracterizada por ser uma resistência específica e mais robusta (BOYD *et al.*, 2013; JONES; DANGL, 2006; STASKAWICZ, 2001).

O reconhecimento dos patógenos, seja por receptores da PTI ou pelos efetores da ETI, levam a vias de sinalização que envolvem primeiramente influxo de cálcio citosólico, produção de espécies reativas de oxigênio e ativação de proteínas quinases, MAPKs

(mitogen-activated protein kinases) e CDPKs (calcium-dependent protein kinases). Hormônios como o ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) participam da amplificação dos primeiros sinais, ativando vias de sinalização que induzem a transcrição de genes de defesa (KUSHALAPPA; YOGENDRA; KARRE, 2016).

Os mecanismos de defesa das plantas podem ser expressos de duas maneiras: (1) defesa constitutiva, compreendida em barreiras físicas e químicas como ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, fibras vasculares, fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas e enzimas hidrolíticas; e (2) defesa induzida, que leva à formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça, tiloses, gomas, espécies reativas de oxigênio (EROs), fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A interação planta-patógeno só será bem-sucedida, resultando em doença, se o patógeno conseguir driblar os mecanismos de reconhecimento e/ou suprimir os mecanismos de defesa da planta (STASKAWICZ, 2001). Quando o patógeno dá início ao processo infeccioso, a resistência induzida atua nessa região de infecção com o intuito de impedir e/ou atrasar sua entrada ou posterior atividade patogênica, por meio dos próprios mecanismos de defesa da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Uma das primeiras respostas de defesa manifestada pela planta é a explosão oxidativa através da formação de espécies ativas de oxigênio (EAOs), representadas pelo ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio, dióxigênio singleto e pelo radical hidroxila. Essas moléculas são formadas pelo metabolismo celular, no entanto, quando produzidas em excesso, seu acúmulo torna-se tóxico às células (THAKUR; SOHAL, 2013).

As EAOs são produzidas principalmente no apoplasto, mas, dependendo da espécie da planta, a produção pode ser mediada por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase da membrana plasmática, por peroxidases da parede celular ou por ambas (O'BRIEN *et al.*, 2012). Essas moléculas podem ser sintetizadas a partir de diferentes vias celulares, incluindo as vias do mecanismo celular básico, processo de fotossíntese, respiração e fotorrespiração, onde as EAOs são produzidas como subprodutos (MITTLER, 2002).

As NADPH oxidases, também conhecidas como RBOHs (homólogos de oxidase de explosão respiratória), pertencem a uma família de proteínas altamente conservadas na planta modelo *Arabidopsis thaliana* e são responsáveis por produzir o ânion superóxido de forma apoplástica através da transferência de um elétron do NADPH do interior da célula para uma molécula de oxigênio no exterior da célula. Após formado, o ânion superóxido é rapidamente transformado de forma espontânea ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD) em

peróxido de hidrogênio (MORI; SCHROEDER, 2004; SAGI; FLUHR, 2006; TORRES, DANGL, 2005). As EAOs produzidas por RBOHs são responsáveis por mediar vários processos relevantes nas plantas, como a lignificação, respostas a fermentos e aos estresses abiótico e biótico, morte celular programada, fechamento estomático, sinalização local e sistêmica, entre outros (SUZUKI *et al.*, 2011).

Entre as RBOHs, a RBOHD é mediadora de uma rápida sinalização sistêmica e é dependente do gene homólogo *RbohD*. O superóxido gerado por essa enzima e/ou seus derivados reativos apresentam um papel importante na comunicação célula a célula por longas distâncias. A transmissão rápida do sinal entre as células depende do acúmulo das EAOs nos espaços extracelulares, podendo ser bloqueado pela supressão das EAOs em locais distantes de onde se iniciou sua produção (MILLER *et al.*, 2009).

Na forma de moléculas sinalizadoras, as EAOs não podem ser geradas até levar a toxidez celular, pelo contrário, os níveis não nocivos devem ser mantidos de forma a equilibrar a produção e a eliminação dessas moléculas (MITTLER *et al.*, 2004). Esse equilíbrio pode ser desestabilizado por vários estresses bióticos e abióticos, causando o aumento e, conseqüentemente, o acúmulo nos níveis de EAOs dentro das células, acarretando danos consideráveis aos componentes celulares. O excesso prejudicial dessas moléculas é detectado e regulado de forma a retornar ao equilíbrio por um complexo sistema de eliminação de EAOs. Esse sistema é constituído por mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos, que trabalham em conjunto para detoxificar a célula. Os antioxidantes enzimáticos são representados principalmente pelas enzimas por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione peroxidase (APEL; HIRT, 2004; HUANG *et al.*, 2019).

As SODs estão presentes em todos os organismos aeróbios e são localizadas no citosol, nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Essas enzimas pertencem à família das metaloenzimas e são divididas em três grupos de isoenzimas de acordo com o íon metálico ligante, Mn-SOD, Fe-SOD e Cu/Zn-SOD. Sob estresse, elas atuam na linha de frente do sistema de detoxificação celular contra EAOs e, como já mencionado anteriormente, é responsável por converter os íons superóxido em peróxido de hidrogênio, sendo em seguida reduzido a água através da ação da enzima APX, que utiliza o ácido ascórbico como agente redutor. Além de participar do sistema antioxidante na redução dos níveis de EAOs, a APX tem grande importância no mecanismo fotossintético, atuando na defesa contra o estresse fotooxidativo. As enzimas da família APX estão presentes no citosol, mitocôndrias, peroxissomos e cloroplastos. Como são bem distribuídas dentro das células, tais enzimas

apresentam uma maior afinidade pelo peróxido de hidrogênio, sendo consideradas mais eficientes na eliminação dessa espécie reativa de oxigênio nos momentos de estresse (ALSCHER *et al.*, 2002; DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; MITTLER, 2002; SHARMA; DUBEY, 2004).

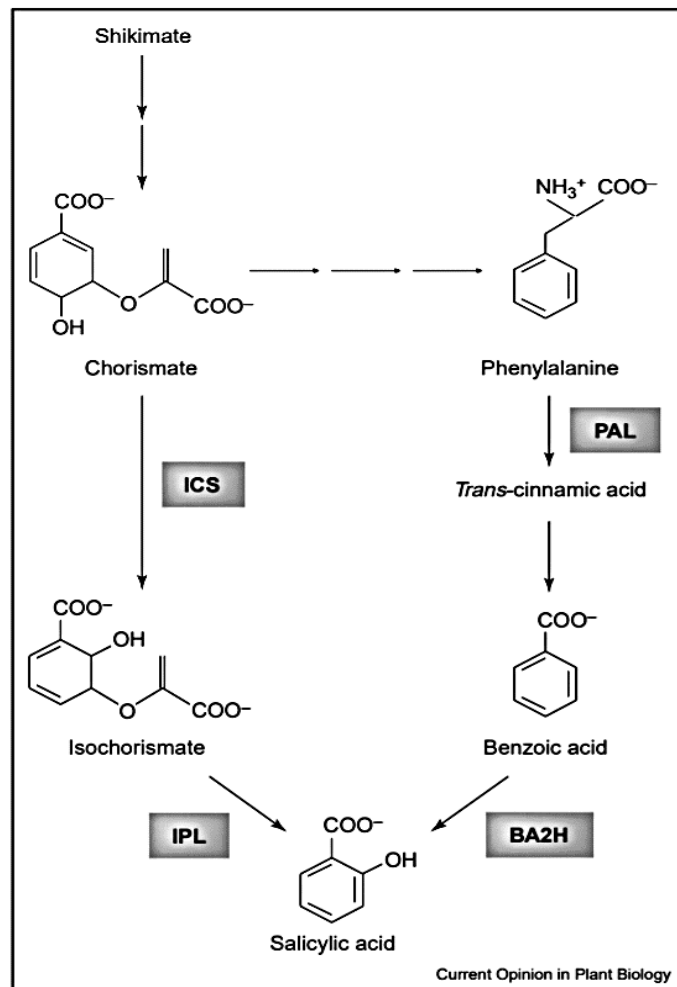
O peróxido de hidrogênio é a molécula com maior vida dentro as EAOs e apresenta alta permeabilidade pelas membranas. Dessa forma, atua como mensageiro secundário, desencadeando a ativação de genes de defesa e morte celular, gerando sinal para as células adjacentes e suprimindo o desenvolvimento da lesão. Em seguida, essa resistência local dá início a uma série de eventos e alterações no metabolismo do hospedeiro, levando sinais para outras partes da planta em locais distantes do ponto de infecção. Essa resposta geral de resistência, denominada resposta sistêmica adquirida (SAR), é mediada pelo ácido salicílico (AS), e pode ser induzida por agentes eliciadores abióticos (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; VERHAGEN; VAN LOON; PIETERSE, 2006). O peróxido de hidrogênio, além de interagir na sinalização para induzir a expressão dos genes de defesa, participa na formação de lignina como substrato para as peroxidases, fortalecendo a parede celular da planta (ALVAREZ *et al.*, 1998). Essa EAO também atua na biossíntese de AS, aumentando a atividade da enzima ácido benzóico-2-hidroxiase que catalisa a etapa final da via da fenilalanina (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

2.4 Respostas de defesa dependentes da via do ácido salicílico

O AS é um ácido orgânico formado por um anel aromático com dois radicais, uma hidroxila e uma carboxila. Esse ácido é um hormônio vegetal que regula desde o crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo a germinação, crescimento vegetativo, floração, produção de frutos e senescência, até a ativação de defesas contra estresses bióticos e abióticos (KHAN *et al.*, 2015; RIVAS-SAN VICENTE; PLASENCIA, 2011; SHAH, 2003). É um composto proveniente do metabolismo secundário das plantas e, junto com aproximadamente outros 10.000 compostos, forma o grupo dos fenólicos. Esse grupo abrange desde as moléculas mais simples, solúveis em água, até mesmo os grandes polímeros insolúveis, como a lignina (TAIZ; ZEIGER, 2013). O AS é considerado um hormônio crítico de sinalização de defesa, pois plantas mutantes que não expressam o gene que codifica a enzima salicilato hidrolase, responsável por metabolizar o AS, apresentam supressão da SAR (GAO *et al.*, 2015).

A biossíntese do AS em plantas foi proposta pela via do ácido chiquímico de duas formas: a partir do isocorismato e a partir da fenilalanina (FIGURA 1). Pela primeira via, o corismato é convertido em isocorismato e, posteriormente, em AS pela ação das enzimas isocorismato sintase (ICS) e isocorismato piruvato liase. Pela outra via, o primeiro passo é a ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) em converter fenilalanina à ácido trans-cinâmico, que é posteriormente convertido em ácido benzóico. Em seguida, a enzima benzoico-2-hidroxilase atua na conversão do ácido benzóico em AS (CHEN *et al.*, 2009). As duas vias para a biossíntese do AS estão presentes nas plantas, porém, nem todas as enzimas que atuam nessas vias foram identificadas nas espécies. Dessa forma, evita-se generalizar sobre a biossíntese de AS, pois a importância dessas vias varia entre as diferentes espécies de plantas (LEFEVERE; BAUTERS; GHEYSEN, 2020).

Figura 1 – Rotas propostas para a biossíntese de ácido salicílico em plantas.



Legenda: ICS: isocorismato sintase; IPL: isocorismato piruvato liase; PAL: fenilalanina amônia liase e BA2H: benzoico-2-hidroxilase. Fonte: CHEN *et al.* (2009).

As respostas de defesa dependentes do AS geralmente estão associadas a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto as respostas de defesa contra os patógenos necrotróficos são reguladas por ácido jasmônico (AJ) (GLAZE BROOK, 2005). O AS está diretamente envolvido na sinalização das defesas locais e na (SAR), que é caracterizada pela ativação simultânea de um conjunto de genes. EDS1 (*enhanced disease susceptibility1*) e PAD4 (*phytoalexin deficient1*) são proteínas essenciais à sinalização de resistência a doenças de plantas, que interagem diretamente entre si e ativam a amplificação das defesas locais através de um maior acúmulo de AS (FALK *et al.*, 1999; FEYS *et al.*, 2001; JIRAGE *et al.*, 1999). A proteína EDS1 atua na regulação positiva da SAR, visto que induz a expressão do gene PR1 (*pathogenesis-related 1*) (dependente de AS), mas é irrelevante para a expressão do gene PDF1.2 (*plant defensin 1.2*) (dependente de AJ) (FALK *et al.*, 1999). A PAD4 apresenta o mesmo papel na regulação do AS, aprimorando as respostas de defesa dependentes dessa via (JIRAGE *et al.*, 1999).

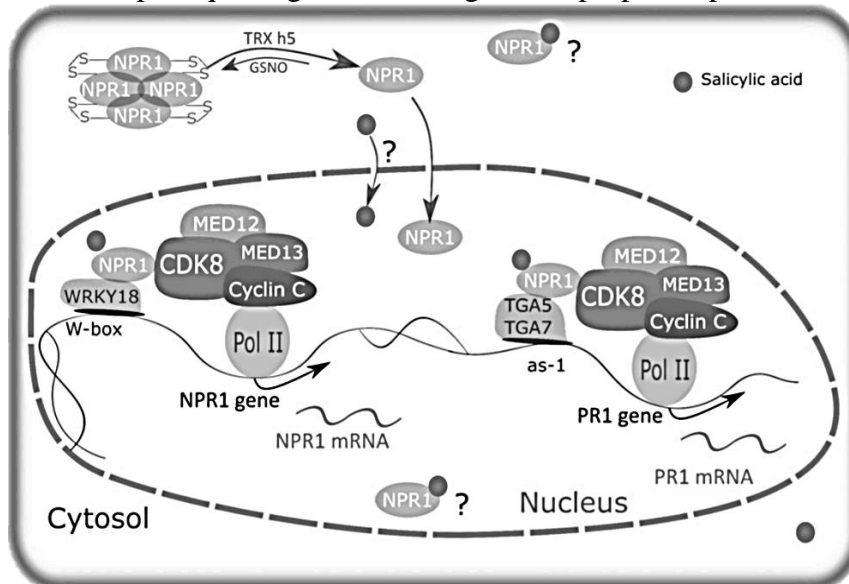
As proteínas EDS1 e PAD4 interagem e atuam no antagonismo entre as rotas do AS e AJ/etileno (ET), regulando positivamente o acúmulo de AS e reprimindo respostas de defesa dependentes de AJ/ET a jusante da enzima MPK4 (*mitogen-activated protein kinase 4*), responsável por regular negativamente essas duas funções. Quando há repressão da atividade da proteína MPK4, a interação EDS1-PAD4 é eficaz em induzir a SAR através da amplificação no acúmulo de AS e reprimir a defesa via AJ/ET a partir de uma função não dependente do acúmulo de AS (BRODERSEN *et al.*, 2006). Petersen *et al.* (2000) demonstraram em plantas mutantes do gene *mpk4* a atividade fundamental de MPK4 para reprimir a SAR. O mutante exibiu SAR, níveis elevados de AS, aumento da resistência a patógenos virulentos e expressão de genes PR. Além disso, a indução de genes dependentes de AJ foi bloqueada em mutantes *mpk4* que expressavam a salicilato hidrolase nahG, sugerindo que esse gene é necessário para expressar defesas de resposta ao AJ.

O estabelecimento gradual da SAR na planta é promovido inicialmente pela presença de espécies reativas de oxigênio, fazendo com que o ambiente celular sofra um desequilíbrio acarretado pelo aumento do potencial redox devido ao acúmulo de antioxidantes que atuam na limpeza da célula contra as EAOs (UQUILLAS *et al.*, 2004). Sob essas condições, a proteína NPR1 (*non-expressor of PR1*) que se apresentava no citosol como oligômeros formados através de ligações de dissulfeto intermoleculares, é reduzida a seu estado monomérico através da redução das ligações de dissulfeto. Os monômeros dessa proteína se acumulam no núcleo para controlar a expressão de genes relacionados a SAR. Quando há o bloqueio dessas condições redutoras, ocorre situação contrária, na qual a proteína NPR1 permanece em seu

estado oligomérico no citosol (MOU; FAN; DONG, 2003). Essa proteína apresenta expressão constitutiva e diante ao desafio patogênico ou aplicação exógena de AS, a NPR1 é ativada (CAO; LI; DONG, 1998).

O gene *NPR1* atua como regulador principal das vias de sinalização dependentes do AS, além de regular a expressão do gene alvo, ele regula sua própria expressão. Dentro do núcleo celular, o AS se liga aos monômeros da proteína NPR1 promovendo a interação com o fator de transcrição WRKY18 (*WRKY DNA-binding protein 18*) e do CDK8 (*cyclin-dependent kinase8*) com seus mediadores associados (MED12 e MED13), formando um complexo que recruta a RNA polimerase II à região promotora para iniciar a transcrição do gene *NPR1*. De maneira semelhante, o CDK8 associado ao NPR1 interage com os fatores de transcrição TGA5 e TGA7 (TGA, proteína de ligação de elemento cis-TGACG) se ligando ao promotor do gene *PR1* (*pathogenesis-related 1*) para recrutar a RNA polimerase II e promover a expressão do gene *PR1*. O gene *CDK8*, assim como o *NPR1*, regula positivamente a expressão dos genes *NPR1* e *PR1*, além de ser essencial para induzir as respostas dependentes de AS (FIGURA 2) (CHEN *et al.*, 2019).

Figura 2 – Mecanismo pelo qual o gene *NPR1* regula sua própria expressão e a do gene alvo.



Fonte: Mhamdi (2019).

É importante ressaltar que a regulação do *NPR1* no núcleo é mediada pelo proteassoma. Após ativar a transcrição do gene alvo, o NPR1 é rapidamente degradado, possibilitando o recrutamento de um novo monômero de NPR1 e de outros cofatores para iniciar novamente a transcrição de *NPR1* e *PR1*. Os coativadores também são degradados pelo

proteassoma, bloqueando a formação dos complexos que iniciam a transcrição do gene alvo. Sendo assim, a renovação constante do NPR1 no núcleo evita a ativação precoce da SAR/genes de defesa quando não há desafio patogênico e, diante da infecção, promove a expressão efetiva de genes alvo e estabelecimento da SAR. Essa rotatividade de NPR1 é necessária para a expressão completa dos genes alvo e estabelecimento da SAR, uma vez que a taxa de transcrição dos genes alvos é diretamente proporcional à degradação/renovação de NPR1 no núcleo (SPOEL *et al.*, 2009).

A atividade do promotor do gene *NPR1* de *C. arabica* (*CaNPR1*) é dependente de AS (BARSALOBRES-CAVALLARI *et al.*, 2013). Estes autores mostraram que a atividade de β -glucuronidase (GUS) em plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas para o promotor do gene *pCaNPR1* apresentaram um aumento significativo no nível da atividade de GUS após aplicação de AS, mostrando que esse fitohormônio estimula fortemente a atividade transcricional do promotor *CaNPR1*. Além disso, 24 horas após a inoculação de *H. vastatrix* sobre o genótipo suscetível de café (cultivar Mundo Novo), não observaram mudança significativa nos níveis de transcritos de *CaNPR1*. Os autores sugeriram que o desafio pelo patógeno não regula a expressão de *CaNPR1* a nível transcricional. No entanto, Couttolenc-Brenis *et al.* (2020) ao estudarem cultivares contrastantes de *C. arabica* quanto a resistência à ferrugem após a infecção pelo patógeno, observaram expressão aumentada em 20 vezes na cultivar resistente Oro Azteca em relação a cultivar suscetível Garnica. Esses resultados sugerem que a resistência à ferrugem pode ser mediada pela ativação do gene *NPR1*.

Os genes *PR* codificam proteínas classificadas em 17 famílias, de PR1 a PR17 (VAN LOON *et al.*, 2006), que em condições normais de desenvolvimento da planta apresentam expressão em nível basal. Mas, após o estresse há um aumento significativo no nível de sua expressão (NOGUEIRA *et al.*, 2012). A PR1, também conhecida como proteína marcadora da SAR, age com efeito inibitório contra patógenos ao se ligar e sequestrar esteróis da membrana plasmática do patógeno (GAMIR *et al.*, 2017).

Couttolenc-Brenis *et al.* (2020) observaram o aumento de expressão do gene de defesa *PR1* de *C. arabica* (*CaPR1*) na cultivar resistente Oro Azteca em relação a cultivar suscetível após a infecção de *H. vastatrix*. Ramiro *et al.* (2009) também observaram, na cultivar resistente Tupi de *C. arabica*, o aumento significativo da expressão do gene *CaPR1* na infecção do patógeno, precisamente durante o estágio de formação do haustório secundário, enquanto a expressão desse gene na cultivar suscetível Catuaí, nesse mesmo estágio da infecção do patógeno, apresentou baixos níveis de expressão. Os autores sugeriram que a via de resistência mediada por AS também ocorre para o patossistema *C. arabica* - *H. vastatrix*.

A PR2 se refere a enzima β -1,3-glucanase que apresenta atividade antimicrobiana, atuando na degradação das β -1,3-glucanas, componentes da parede celular fúngica (DURRANT; DONG, 2004). A PR5 é denominada na literatura como *osmotin-like protein* devido à alta similaridade com a osmotina descrita no tabaco (SINGH *et al.*, 1987). A atividade antimicrobiana dessa proteína é criar poros transmembrânicos na membrana plasmática do patógeno, o que impede a manutenção do pH, resultando em prejuízo para o desenvolvimento do microrganismo (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

A PR9, também denominada peroxidase (POX), além de fazer parte do sistema antioxidante celular, é uma enzima essencial na via dos fenilpropanóides, pois atua no último passo dessa via para a biossíntese de lignina, acoplando radicais monolignóis (álcool p-coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) em unidades H- (p-hidroxilfenil), G- (guaiacil) e S- (seringil) de lignina, exercendo papel no fortalecimento da parede celular da planta e consequentemente aumentando a resistência a múltiplos patógenos (CARPITA; RALPH; MCCANN, 2015). As POXs formam um conjunto de isoenzimas que se diferem por sua capacidade de catalisar a oxidação de diferentes substratos, como substâncias aromáticas e diversos compostos fenólicos (PANDEY *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, são gerados a partir do metabolismo secundário das plantas e possuem ação antimicrobiana, inibindo a germinação de esporos, crescimento micelial e a produção de enzimas microbianas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Além da POX, a enzima polifenol oxidase (PPO) também usa alguns compostos fenólicos como substratos. Essas enzimas encontram-se fisicamente separadas de seus substratos fenólicos e, quando o tecido vegetal é danificado, ocorre o aumento da atividade da PPO ao catalisar a hidroxilação de monofenóis para o-dihidroxi-fenóis. Em seguida, realiza a oxidação de o-dihidroxi-fenóis para o-quinonas ou polímeros, resultando na oxidação dos fenóis presentes nas células (CONSTABEL; BARBEHENN, 2008). As quinonas possuem ação antimicrobiana e são mais tóxicas que os compostos fenólicos que lhes deram origem. Já os polímeros, atuam como taninos, formando complexos com proteínas que agem como barreiras físicas contra patógenos (PORCELL *et al.*, 2007).

2.5 Indutores de resistência

Em uma sociedade cada vez mais preocupada com o meio ambiente e a segurança alimentar, ocorre um aumento pela demanda de produtos/alimentos livres de resíduos de agroquímicos. Além disso, cada vez mais tem se exigido produtos certificados que seguem

um padrão de agricultura sustentável que propõe a implementação do manejo integrado e uma redução ainda maior do uso de produtos químicos tóxicos. Dessa forma, é indispensável a intensificação das pesquisas em busca dessas novas soluções. Uma opção é o uso de indutores de resistência, sendo uma forma alternativa para o controle de doenças causadas por fitopatógenos. Estes indutores são conhecidos também como agentes eliciadores abióticos, pois ativam e elevam o nível de resistência latente pré-existente nas plantas. A principal função dos indutores é atuar como moléculas sinalizadoras de resposta de defesa, não apresentando ou apresentando baixa toxidez direta aos patógenos (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016).

Após a aplicação destas moléculas nas plantas ocorre um acúmulo de proteínas que tem papel importante na amplificação do sinal celular após a chegada do patógeno. Quando ocorre o desafio patogênico mais proteínas de sinalização são ativadas, levando a uma forte amplificação do sinal e, conseqüentemente, a uma resposta de defesa mais rápida e potente, efeito conhecido como *priming* (CONRATH, 2011). O mecanismo molecular do *priming* de defesa foi elucidado por Beckers *et al.* (2009), argumentando que a pré-ativação dos componentes de sinalização, como as quinases MPK3 e MPK6, antes do estresse é uma etapa crítica na preparação das plantas para a indução completa das respostas de defesa durante a indução de resistência. Esse processo foi demonstrado com o acúmulo de mRNA e proteínas MAPKs inativas (MPK3 e MPK6) em plantas de *Arabidopsis* previamente tratadas com produto análogo ao ácido salicílico. Após o estresse biótico ou abiótico, essas proteínas apresentaram maior atividade nas plantas tratadas em relação às plantas não tratadas, levando à indução aprimorada de respostas de defesa.

O acibenzolar-S-metil (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico, análogos funcionais do ácido salicílico, foram os primeiros representantes da categoria de produtos que interferem nos processos bioquímicos e fisiológicos das plantas com potencial para ativar respostas de defesa sistêmica contra os agentes patogênicos, sendo que, o ASM, do grupo químico benzotriazol, foi o primeiro a ser registrado e comercializado (KNIGHT *et al.*, 1997). As plantas tratadas com esse indutor podem ser protegidas contra infecções por fungos biotróficos e necrotróficos, bactérias e vírus (FERNANDES *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2016; MANDAL *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2009). No cafeeiro, a aplicação do produto proporciona proteção local e sistêmica contra ferrugem, e seu efeito persiste na planta até 10 semanas. A ação do produto no hospedeiro ocorre pós-penetração do fungo, pois o tratamento preventivo com o indutor não afeta as estruturas fúngicas pré-penetração (GUZZO *et al.*, 2001).

O efeito protetor do ASM foi comprovado pela sua aplicação em folhas de cafeeiro para indução de SAR, levando a ativação de genes que codificam proteínas com atividade antimicrobiana, incluindo as PR proteínas. Além disso, este composto é capaz de induzir a expressão de genes relacionados à explosão oxidativa, morte celular, reconhecimento e transdução de sinal (GUZZO *et al.*, 2009). O efeito do tratamento com ASM também foi comprovado pela indução da expressão de genes de defesa relacionados ao aumento das barreiras físicas e químicas, como glutaciona-S-transferase, peroxidase, superóxido dismutase, quitinase e lipoxigenase (NARDI *et al.*, 2007).

De Nardi *et al.* (2006) aplicaram um produto análogo ao AS em plantas de *C. arabica* e, ao compararem o material tratado com partes da planta que não foram tratadas, observaram um aumento sistêmico na síntese de PRs (dentre essas, PR2 e PR5), na explosão oxidativa e nos processos de fortalecimento da parede (dentre os compostos, a peroxidase). Em trabalho semelhante, Guzzo *et al.* (2009), ao estudarem genes de café associados à SAR após aplicação de ASM e do patógeno (*H. vastatrix*) em plantas da cultivar Mundo Novo (suscetível) e em planta de híbrido de Timor (resistente), identificaram genes envolvidos na explosão oxidativa, proteínas antimicrobianas, síntese e transporte dessas proteínas, percepção e transdução de sinais, metabolismo de lipídios, entre outros. A indução de conjuntos distintos de genes foi observada nas duas interações, no entanto, durante a análise semi-quantitativa e quantitativa de expressão de alguns desses genes, duas β -1,3-glucanases apresentaram aumento significativo da expressão, uma induzida durante a SAR e a outra na reação incompatível.

As respostas de defesa das plantas também podem ser elicitadas por outros compostos, como os fertilizantes foliares. A nutrição mineral pode contribuir na redução da severidade e intensidade de doenças. Além disso, muitos micronutrientes são cofatores de enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides (GRAHAM; WEBB, 1991). Os fosfitos são uns dos fertilizantes foliares ricos em micronutrientes mais estudados como indutores de resistência em plantas e seu efeito já foi comprovado no controle de doenças causadas por diferentes patógenos: *Fusarium oxysporum* (DAVIS; GRANT, 2001), *Phoma costarricensis* (NOJOSA *et al.*, 2009), *Cercospora coffeicola* (COSTA *et al.*, 2011, COSTA *et al.*, 2014), *Colletotrichum lindemuthianum* (COSTA *et al.*, 2018) e *H. vastatrix* (COSTA *et al.*, 2014; MONTEIRO *et al.*, 2016).

Os fosfitos apresentam atividade fungicida na planta (COHEN; COFFEY, 1986), porém, são mais conhecidos por proteger as plantas contra oomicetos (GRANT *et al.*, 1992; GUEST *et al.*, 1995; GUEST; GRANT, 1991). Esses fertilizantes têm um complexo modo de ação, apresentando ação direta contra os patógenos através da inibição do crescimento

micelial ou das rupturas de hifas, e ação indireta induzindo respostas de defesa no hospedeiro, tais como o aumento de proteínas PR, fitoalexinas, hidrolases, pectina, lignina, espécies reativas de oxigênio (levando à reação de hipersensibilidade) e compostos fenólicos (DALIO *et al.*, 2012). A eficácia dos fosfitos já foi comprovada atuando na indução de resposta de defesa do cafeeiro contra *H. vastatrix*, com o aumento da transcrição dos genes *POX* (peroxidase), *GLU* (β -1,3-glucanase), *PAL* (fenilalanina-amônia liase) e *CAT* (catalase) (MONTEIRO *et al.*, 2016).

O modo de ação dos fosfitos ainda não foi completamente caracterizado, mas sabe-se que, assim como o ASM, esses compostos podem induzir o acúmulo de ácido salicílico e a expressão de genes de resposta de defesa dependentes dessa via (MACHINANDIARENA *et al.*, 2012; MASSOUD *et al.*, 2012). O fosfito mais utilizado é o de potássio (FK), um sal inorgânico proveniente da neutralização do ácido fosforoso pelo hidróxido de potássio (REUVENI, 1997). O trabalho de Massoud e colaboradores (2012) propõe que a aplicação de FK regule negativamente a proteína MPK4. A expressão, acumulação e fosforilação dessa proteína quinase foram reduzidas, iniciando as respostas de defesa dependentes de AS após a infecção de *Hyaloperonospora arabidopsis* em plantas de *Arabidopsis* previamente tratadas com FK, o qual também mobilizou dois componentes essenciais da resistência a doenças, as proteínas EDS1 e PAD4.

MASSOUD *et al.* (2012) demonstraram que a resposta de defesa induzida pela aplicação de FK é dependente da via de AS a partir da ativação da expressão do gene *NPR1*. O efeito de baixas doses de FK diante da infecção por *Hyaloperonospora arabidopsis* foi nulo em plantas deficientes em AS (mutante *sid2-1*, *nahG*) quando comparado com plantas selvagens pré-tratadas que apresentaram 35% de redução na esporulação do patógeno, sugerindo que a sinalização de AS é essencial ao controle do patógeno. Além disso, o mutante *sid2-1* apresentou um aumento de 100% no número de esporos em relação às plantas selvagens, mostrando que a supressão da produção de AS afetou a resistência basal da planta ao patógeno.

Além disso, plantas mutantes deficientes no gene *NPR1* (*npr1-1*) apresentaram redução de apenas 4% do número de esporos quando tratadas com FK, indicando que as respostas de defesa induzidas por FK são dependentes da expressão de *NPR1*. Ao contrário, plantas mutantes para *jasmonate resistant1* (*jar1-1*), *ethylene-insensitive2-1* (*ein2-1*), e *abscissic acid-deficient1-5* (*aba1-5*), genes dependentes das vias de defesa de AJ, ET e ácido abscísico, respectivamente, não apresentaram fenótipo de resistência comprometido quando

tratadas com FK, indicando que a indução de resistência por FK é independente dessas vias (MASSOUD *et al.*, 2012).

Eshraghi *et al.* (2011) observaram que a aplicação de FK em plantas transgênicas de *Arabidopsis* da linha PR1::GUS aumentou a expressão do gene PR1 em folhas infectadas por *Phytophthora cinnamoni*, além de induzir a expressão desse gene nas folhas não inoculadas, indicando que o tratamento com FK pode atuar através da ativação da SAR.

Ao avaliar os efeitos de FK nas respostas de defesa das plantas de batata diante ao desafio de *Phytophthora infestans*, Machinandiarena *et al.* (2011) observaram que o produto induziu resistência, pois impediu o desenvolvimento do patógeno, além de reduzir os sintomas nas folhas infectadas que foram previamente tratadas. Os autores sugeriram que essas respostas de defesa podem ter sido, em parte, proporcionadas pelo aprimoramento da expressão de dois fatores de transcrição (NPR1 e WRKY1) e o gene marcador de defesa PR1, relacionados à via do AS. Em contraste, um gene relacionado à via do AJ também foi avaliado, mas sua regulação foi negativa em resposta ao tratamento com FK. O produto apresentou um efeito *priming* nas plantas tratadas, induzindo uma resposta mais precoce e intensa à infecção do patógeno, sendo que essa resposta é mediada pelo AS e independente de AJ.

O efeito *priming* de FK foi observado por Pires (2011) após o tratamento de plantas de *C. arabica* cv. Mundo Novo suscetível à ferrugem, em que a expressão dos genes de resposta de defesa PR2 e PR5 foi ativada 24 horas após a aplicação do produto. Também verificaram que, após a inoculação das plantas com *H. vastatrix*, a expressão desses genes foi potencializada no período de 24 horas após o desafio com o patógeno.

Monteiro *et al.* (2016) estudaram o efeito do fosfito de manganês no controle da ferrugem em mudas de cafeeiro da cultivar Mundo Novo. As aplicações foliares do produto propiciaram o controle de 63% da severidade da doença, enquanto a aplicação com ASM apresentou 50% de controle, mostrando que o fosfito é tão eficiente quanto o indutor de resistência padrão no controle dessa doença. Os autores sugerem que o resultado obtido após a aplicação do fosfito pode ter sido proporcionado pelo aumento da indução de respostas de defesa dos genes *PR2*, *POX*, *PAL* e *CAT* após 24 horas da aplicação do produto em plantas não inoculadas. Além disso, as plantas inoculadas previamente tratadas apresentaram aumento da atividade de enzimas de defesa como o ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e polifenol oxidase em relação às plantas inoculadas não tratadas.

Diante do exposto, nota-se que os estudos de resistência induzida por fosfitos demonstram que as respostas de defesa das plantas são dependentes da via do AS e que os

genótipos resistentes à ferrugem expressam genes dependentes dessa via. Além disso, já foi comprovada a eficácia do produto no manejo da ferrugem do cafeeiro, podendo ser utilizado como uma alternativa aos fungicidas. No entanto, estudos que elucidem o modo de ação dos fosfitos na indução do aumento da expressão de genes envolvidos na via do AS em cafeeiro ainda são necessários.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. **Plant Pathology**, v. 4, 2005.

AIME, M. C. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). **Mycoscience**, v. 47, n. 3, p. 112-122, 2006.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ALVAREZ, M. E. *et al.* Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 773-784, 1998.

APEL, Klaus; HIRT, Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. *et al.* Host response profiling to fungal infection: molecular cloning, characterization and expression analysis of NPR1 gene from coffee (*Coffea arabica*). **Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: science, technology and education**, v. 1, 2013.

BECKERS, G. J. M *et al.* Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 21, n. 3, p. 944-953, 2009.

BETTENCOURT, A. J.; CARVALHO, A. Melhoramento visando a resistência do cafeeiro à ferrugem. **Bragantia**, v. 27, n. 1, p. 35-68, 1968.

BOTELHO, C. E. *et al.* Seleção de progênies F4 de cafeeiros obtidas pelo cruzamento de Icatu com Catimor. **Revista Ceres**, 57(3), 274-281, 2010.

BOWDEN, J.; GREGORY, P. H.; JOHNSON, C. G. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. **Nature**, v. 229, n. 5285, p. 500-501, 1971.

BOYD, L. A. *et al.* Plant-pathogen interactions: Disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**. 29, 233-240, 2013.

BRASIL. Resolução-RE nº165, de 29 de agosto de 2003. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 set. 2003, Seção 1, p.48-50.

BRODERSEN, P. *et al.* Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid-and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. **The Plant Journal**, 47(4), 532-546. 2006.

CAO, H.; LI, X., DONG, X. Geração de resistência a doenças de amplo espectro pela superexpressão de um gene regulador essencial na resistência adquirida sistêmica. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1998.

CARPITA, N. C.; RALPH, J.; MCCANN, M. C. The Cell Wall. In Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., eds., **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, pp. 45-110. 2015.

CARVALHO, A. *et al.* Melhoramento do cafeeiro. IV. Café Mundo Novo. **Bragantia**, 12: 97-129, 1952.

CARVALHO, A.; MONACO, L. C. Transferência do fator caturra para o cultivar Mundo Novo de Coffea arabica. **Bragantia**, v. 31, p. 379-399, 1972.

CHEN, J. *et al.* NPR1 promotes its own and target gene expression in plant defense by recruiting CDK8. **Plant Physiology**, v. 181, n. 1, p. 289-304, 2019.

CHEN, Zhixiang *et al.* Biosynthesis of salicylic acid in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 6, p. 493-496, 2009.

COHEN, M. D.; COFFEY, M. D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 311-338, 1986.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Brasília, DF, v.8 safra 2020/21, n. 3, set. 2021.

CONRATH, U. *et al.* Priming for enhanced defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 97-119, 2015.

CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 10, p. 524-531, 2011.

CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ. **Cultivares de café**. 2014. Disponível em: <http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/index.php/tecnologias/cultivares>. Acesso em: 02 set. 2019.

CONSTABEL, C. Peter; BARBEHENN, Raymond. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. In: **Induced plant resistance to herbivory**. Springer, Dordrecht, 2008. p. 253-270.

COSTA, B. H. G. *et al.* Associação de indutores de resistência no manejo da ferrugem do cafeeiro. 2011.

COSTA, B. H. G. *et al.* Potassium phosphites in the protection of common bean plants against anthracnose and biochemical defence responses. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 2, p. 95-102, 2018.

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

COUTTOLENC-BRENIS, E. *et al.* Prehaustorial local resistance to coffee leaf rust in a Mexican cultivar involves expression of salicylic acid-responsive genes. **PeerJ**, v. 8, p. e8345, 2020.

DALIO, R. J. D. *et al.* O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DAS, Kaushik; ROYCHOUDHURY, Aryadeep. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in environmental science**, v. 2, p. 53, 2014.

DAVIS, A. J.; GRANT, B. R. The effect of phosphonate on the sporulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Australasian Plant Pathology**, v. 25, n. 1, p.31-5, 2001.

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

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

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

FALK, A. *et al.* EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 6, p. 3292-3297, 1999.

FERNANDES, L. H. M. *et al.* Acibenzolar-s-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 24-32, 2013.

FEYS, B. J. *et al.* Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 19, p. 5400-5411, 2001.

GAMIR, J. *et al.* The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. **The Plant Journal**, v. 89, n. 3, p. 502-509, 2017.

GANESH, D. *et al.* Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, v. 170, n. 6, p. 1045-1051, 2006.

GAO, Qing-Ming *et al.* Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 228, 2015.

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

GRAHAM, Robin D.; WEBB, Michael J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. **Micronutrients in agriculture**, v. 4, p. 329-370, 1991.

GRANT, B.R.; GRANT, J.; HARRIS, J. Inhibition of growth of *Phytophthora infestans* by phosphate and phosphonate in defined media. **Experimental Mycology**, v. 16, n. 3, p. 240-244, 1992.

GUEST, D. L.; PEGG, K. G.; WHILEY, A. W. Control of *Phytophthora* diseases of tree crops using trunk-injected phosphonates. **Horticultural Reviews**, v. 17, p. 299-330, 1995.

GUEST, D.; GRANT, B. R. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews**, v. 66, n. 2, p. 159-187, 1991.

GUIMARÃES, S. E. *et al.* Indutores de resistência no controle da cercosporiose do cafeeiro: análise de genes relacionados à defesa. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 3, p. 308 - 317, 2016.

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

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

HUANG, Honglin *et al.* Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 800, 2019.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS - IAC. **Três novas cultivares de café arábica do IAC apresentam ganhos de produtividade que variam de 35% a 70%**. IAC Notícias. 2017. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/noticiasdetalhes.php?pag=1&ano=2017&id=1196>. Acesso em: 18 set. 2019.

JIRAGE, D. *et al.* *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13583-13588, 1999.

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

- KHAN, M. I. R. *et al.* Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 462, 2015.
- KILAMBO, Deusdedit L.; REUBEN, Shazia OWM; MAMIRO, Delphina. Races of *Hemileia vastatrix* and variation in pathogenicity of *Colletotrichum kahawae* isolates to compact coffee genotypes in Tanzania. 2013.
- KNIGHT, S. C. *et al.* Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 349-372, 1997.
- KUSHALAPPA, A. C.; YOGENDRA, K. N; KARRE, S. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 35, n. 1, p. 38-55, 2016.
- LEFEVERE, H.; BAUTERS, L.; GHEYSEN, G. Salicylic acid biosynthesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 338, 2020.
- MACHINANDIARENA, M. F. *et al.* Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 14, p. 1417-1424, 2012.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E. *et al.* Produção Integrada de Café. *In*: ZAMBOLIM, L. *et al.* (Org.). **Produção Integrada no Brasil: Agropecuária Sustentável Alimentos Seguros**. 1 ed. Brasília: Mapa/ACS, 2009, p. 343-443.
- MANDAL, B. *et al.* Biological and molecular analyses of the acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance in flue-cured tobacco against Tomato spotted wilt virus. **Phytopathology**, v. 98, n. 2, p. 196-204, 2008.
- MARTINEZ-MEDINA, A. *et al.* Recognizing plant defense priming. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 10, p. 818-822, 2016.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. 4ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011.p. 149-206.
- MASSOUD, K. *et al.* Dissecting phosphite-induced priming in *Arabidopsis* infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. **Plant Physiology**, v. 159, n. 1, p. 286-298, 2012.
- MCCOOK, S. Global rust belt: *Hemileia Vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850, **Journal of Global History**, v. 1, n. 2, p. 177-195, 2006.
- MEDEIROS, F. C. L. *et al.* Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 2, p. 175-183, 2009.
- MHAMDI, A. NPR1 Has Everything under Control. **Plant Physiology**, v. 181, n. 1, p. 6-7, 2019.

MILLER, Gad et al. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. **Science signaling**, v. 2, n. 84, p. ra45-ra45, 2009.

MITTLER, Ron et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004.

MITTLER, Ron. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

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**, v. 164, n. 11-12, p. 1043-1053, 2016.

MORI, Izumi C.; SCHROEDER, Julian I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. **Plant physiology**, v. 135, n. 2, p. 702-708, 2004.

MOU, Z.; FAN, W.; DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. **Cell**, v. 113, n. 7, p. 935-944, 2003.

NOGUEIRA, A. C. W. *et al.* An overall evaluation of the Resistance (R) and PathogenesisRelated (PR) superfamilies in soybean, as compared with *Medicago* and *Arabidopsis*. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, p.260-271, 2012.

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

O'BRIEN, Jose A. *et al.* Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. **Planta**, v. 236, n. 3, p. 765-779, 2012.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry letters**, v. 15, p. 152-158, 2016.

PANDEY, V. P. *et al.* A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. **Biochem Anal Biochem**, v. 6, n. 1, p. 308, 2017.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. *In*: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 1, 1995. p. 417-453.

PETERSEN, M. *et al.* Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1111-1120, 2000.

PIRES, N. F. **Análise quantitativa da expressão de genes relacionados à defesa induzida em *Coffea arabica* por Soloflex® e Reforce® contra *Hemileia vastatrix***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, 61p. 2011.

POURCEL, Lucille *et al.* Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in plant science**, v. 12, n. 1, p. 29-36, 2007.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L. CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. *In*: GUIMARAES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D.P. **Semiologia do cafeeiro**: Sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: UFLA, 2010. 215 p.

RAINFOREST ALLIANCE. Anexo S7: Gestão de Pesticidas, versão 1.2, jul. 2021. Acesso em 10 de dezembro de 2021, from https://www.rainforest-alliance.org/wp-content/uploads/2020/06/Annex-7-Pesticides-Management_PT.pdf

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

RESENDE, M. L. V. *et al.* Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 213-221, 2007.

RESENDE, Mário Lúcio V.; SALGADO, Sônia ML; CHAVES, Zuleide M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

RESENDE, Mário LV *et al.* Strategies for Coffee Leaf Rust Management in Organic Crop Systems. **Agronomy**, v. 11, n. 9, p. 1865, 2021.

REUVENI, M. Post-infection applications of K₃PO₃, phosphorous acid and dimethomorph inhibit development of downy mildew caused by *Plasmopara viticola* on grapevines. **Journal of Small Fruit & Viticulture**, v. 5, n. 2, p. 27-38, 1997.

RIVAS-SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3321-3338, 2011.

SAGI, Moshe; FLUHR, Robert. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 336-340, 2006.

SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 365-371, 2003.

SHARMA, Pallavi *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v. 2012, 2012.

SILVA, J. A. G *et al.* Resistance inducers applied alone or in association with fungicide for the management of leaf rust and brown eye spot of coffee under field conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 7-8, p. 430-439, 2019.

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**, v. 60, n. 4, p. 169–183, 2002.

SINGH, N. K. *et al.* Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. **Plant Physiology**, v. 85, n. 2, p. 529-536, 1987.

SPOEL, S. H. *et al.* Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 860-872, 2009.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 73-76, 2001.

SUZUKI, Nobuhiro *et al.* Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 6, p. 691-699, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. Ed. – Porto Alegre: Artmed, 918p. 2013.

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

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

TORRES, Miguel Angel; JONES, Jonathan DG; DANGL, Jeffery L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 373-378, 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Production, Supply and Distribution**. 2019. Disponível em: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/m900nt40f/sq87c919h/8w32rm91m/coffee.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2019.

UQUILLAS, C. *et al.* NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 1, p. 34-42, 2004.

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

VERHAGEN, B. W. M.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Induced disease resistance signaling in plants. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**, p. 334-343, 2006.

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41 n. 1, p. 1-8, 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**ARTIGO – FOSFITO DE POTÁSSIO NA ATIVAÇÃO DE COMPONENTES
ASSOCIADOS A RESPOSTAS DE DEFESA EM GENÓTIPOS DE *Coffea arabica***

Elaborado de acordo com as normas do periódico Molecular Biotechnology (ISSN 1559-0305).

FOSFITO DE POTÁSSIO NA ATIVAÇÃO DE COMPONENTES ASSOCIADOS A RESPOSTAS DE DEFESA EM GENÓTIPOS DE *Coffea arabica*

Priscilla de Fátima Pereira¹, Mário Lúcio Vilela de Resende¹, Tharyn Reichel¹, Mariana de Lima Santos², Deila Magna dos Santos Botelho¹, Eric Batista Ferreira³, Natália Chagas Freitas¹

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

³ Departamento de Estatística, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil

Resumo

Os fosfitos têm sido usados como indutores de resistência ativando a defesa da planta e aumentando sua capacidade de resposta diante da invasão do patógeno. No entanto, o modo de ação dos fosfitos nas respostas de defesa ainda não foi completamente elucidado. Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito do fosfito de potássio (KPhi) em cultivares de cafeeiro com genótipos contrastantes quanto à ferrugem, visando esclarecer o mecanismo pelo qual KPhi ativa as defesas constitutivas das plantas. Para isso estudamos a expressão dos genes *PAL*, *ICS2*, *MPK4*, *EDS1*, *PAD4*, *NPRI*, *CDK8*, *PRI*, *GLU*, *OLP* e *POX*, e as atividades enzimáticas de SOD, APX e PPO, que estão envolvidos na via de defesa do ácido salicílico (AS). O tratamento com KPhi, na ausência do patógeno, induziu o aumento de respostas de defesa constitutivas em cultivares resistentes e suscetíveis a ferrugem. Os resultados sugerem que KPhi atue em duas vias paralelas de sinais de defesa, AS e reactive oxygen species (ROS), que são essenciais para a indução da resistência sistêmica adquirida quando ativadas simultaneamente, e, possivelmente ative a via dos fenilpropanoides. A ativação de todos esses membros associados a rotas de defesa demonstra que KPhi é um potencial indutor de resistência em plantas de cafeeiro.

Palavras-chave: Ácido salicílico. Espécies reativas de oxigênio. Resistência sistêmica adquirida. Indutor de resistência. Ferrugem.

Introdução

O Brasil é o principal produtor de café arábica (*Coffea arabica*) do mundo, uma das commodities mais comercializadas e consumidas mundialmente. Com uma produção estimada de mais de 35,7 mil sacas (60 kg) beneficiadas para a safra de 2022, o país foi responsável por 39% da produção mundial na safra anterior [1, 2]. Um dos fatores que limitam a produtividade cafeeira são as doenças de plantas. Entre os patógenos que mais afetam esta cultura se destaca o fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, agente etiológico da ferrugem alaranjada [3]. A doença pode causar até 50% de queda na produtividade do cafeeiro e a principal medida de controle dessa doença tem sido a utilização do controle químico com os fungicidas triazóis e estrobirulinas [4].

Apesar do controle químico ser importante para o manejo de doenças no café, especialmente a ferrugem, a demanda por café livre de resíduos químicos está crescendo no mundo, em conjunto com a exigência da produção certificada [5]. No Brasil, a questão dos agroquímicos para a cultura do café é um desafio, pois a norma global de agricultura sustentável (Rainforest Alliance 2020) suspende o uso de fungicidas permitidos pela legislação brasileira para o controle da ferrugem, como os triazóis: epoxiconazol, ciproconazol e triadimenol [6, 7]. No entanto, ainda não foi sugerida uma data final para a suspensão do uso dessas substâncias para que os produtores possam encontrar alternativas viáveis para aplicação no campo [6].

Diante do possível veto no uso dessas moléculas, torna-se necessário a busca por novas ferramentas no manejo de doenças, que sejam eficazes e sustentáveis, uma vez que, o aumento da produtividade do cafeeiro ainda é dependente do controle químico dessa doença. Uma alternativa provavelmente viável para suprir essa demanda é o uso de indutores de resistência, que são compostos que ativam a defesa da planta e aumentam sua capacidade de resposta diante da invasão de um microrganismo patogênico [8]. Esse efeito pode ser ativado após a aplicação de fertilizantes, com destaque para os fosfitos, que são os mais estudados dentro do manejo das principais doenças do cafeeiro [9-11].

O modo de ação dos fosfitos e seus possíveis alvos na planta ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que esse composto induz o acúmulo de salicylic acid (SA) e a expressão de genes de defesa dependentes dessa via, assim como o indutor padrão acibenzolar-S-metil (ASM, análogo do ácido salicílico) [12, 13]. O SA está diretamente envolvido na sinalização das defesas locais e na resistência sistêmica adquirida (SAR), que é caracterizada pela ativação simultânea de um conjunto de genes [14]. Massoud *et al.* [13], demonstraram que a aplicação de fosfito regula negativamente a expressão do gene *MPK4* (mitogen-activated protein kinase) e este, por sua vez, reprime as respostas de defesa dependentes de AS, pois, mobiliza dois componentes essenciais na resistência basal, EDS1 (enhanced disease susceptibility1) e PAD4 (phytoalexin

deficient1). Quando há repressão da atividade da proteína MPK4, a interação entre as proteínas EDS1 e PAD4 é eficaz em induzir a SAR através do aumento do acúmulo de SA [15].

O estabelecimento gradual da SAR na planta é promovido inicialmente pela presença de oxigênio reactive species (ROS) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), responsáveis pela explosão oxidativa [16]. A produção de ROS pode ser mediada por oxidases presentes na membrana plasmática (NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ou RBOHs – homólogos de oxidase de explosão respiratória) e/ou por peroxidases da parede celular [17, 18]. Quando produzidas em excesso, ROS tornam-se tóxicas as células [19]. Por isso, o excesso dessas moléculas é detectado e regulado por um sistema de detoxificação celular constituído por mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos [20]. Os antioxidantes enzimáticos são representados principalmente por superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathione peroxidase [21].

O peróxido de hidrogênio apresenta alta permeabilidade pelas membranas e atua como mensageiro secundário desencadeando a ativação de genes de defesa e a sinalização para as células adjacentes. Essa molécula também participa na formação de lignina, servindo como substrato para as peroxidases, além de atuar na biossíntese de SA na rota dos fenilpropanóides, aumentando a atividade da enzima ácido benzóico-2-hidroxiase que catalisa a etapa final da biossíntese desse hormônio [22, 23]. O SA também pode ser sintetizado a partir da via do corismato, o qual é convertido em isocorismato, e posteriormente, em SA pela ação das enzimas isocorismato sintase e isocorismato piruvato liase [24].

Sob as condições de estresse celular gerada pela explosão oxidativa, monômeros da proteína NPR1 (non-expressor of pr1) se acumulam no núcleo [25]. O gene *NPR1* atua como regulador principal das vias de sinalização dependentes do SA e, além de regular a expressão do gene alvo, ele regula autorregula sua expressão. Dentro do núcleo celular, o SA liga-se aos monômeros de NPR1 e promove sua interação com os fatores de transcrição, como a quinase CDK8 (cyclin-dependent kinase8), formando um complexo que é transportado à região promotora para iniciar a transcrição do gene *NPR1*. De maneira semelhante, a CDK8 associado ao monômero de NPR1 interage com outros fatores de transcrição e promove a expressão do gene de defesa *PR1* (pathogenesis – related 1) [26]. Outros genes PRs apresentam alto pico de expressão durante a SAR, como *PR2* (β -1,3-glucanase) e o *PR5* (proteína tipo osmotina), os quais possuem atividade antimicrobiana atuando na parede celular e membrana plasmática de patógenos, respectivamente [14, 27].

Diante desse contexto, são necessários estudos que esclareçam o mecanismo através do qual KPhi modula o recrutamento de defesas em plantas. Sabe-se que KPhi é capaz de promover o controle de doenças em

cafeeiro, mas, esses resultados não elucidam completamente o modo de ação desse princípio ativo. O intuito desse trabalho foi avaliar o efeito de fosfito de potássio comparado ao ASM (controle positivo) na ativação das respostas de defesa dependentes da via do SA em genótipos contrastantes de *C. arabica* quanto à resistência à ferrugem. Neste estudo, analisamos a expressão de genes envolvidos na explosão oxidativa, síntese de SA, e na regulação e responsividade da via desse hormônio. Além disso, avaliamos a atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo e na produção de compostos da via dos fenilpropanóides e quantificamos os teores de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel.

Material e métodos

Material vegetal

Cultivares de cafeeiro com níveis de resistência contrastantes à ferrugem foram utilizadas neste trabalho (Tabela 1).

Tabela 1 Cultivares de *C. arabica*, respectivas origens e níveis de resistência à ferrugem, e número de registro constante no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Sigla	Cultivares	Cruzamentos de origem	Nível de Resistência	RNC
AR	MGS Aranãs	Icatu Vermelho IAC 3851-2 x Catimor UFV 1602-215	Resistente	33348
IP	IAPAR-59	Villa Sarchi CIFC 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2	Resistente	02324
CV	Catuaí Vermelho IAC 144	Caturra Amarelo IAC 476-11 x Mundo Novo IAC 374-19	Suscetível	02934
MN	Mundo Novo IAC 376-4	Sumatra x Bourbon Vermelho	Suscetível	02908

Tratamento com indutor de resistência

O produto fosfito de potássio (Reforce[®], Agrichem do Brasil S.A.) foi utilizado como indutor de resistência na dose de 5,0 mL L⁻¹, aplicado com pulverizador manual. O produto acibenzolar-S-metil (Bion[®], Syngenta Crop Protection Ltda), na dose de 0,2 g L⁻¹, foi utilizado como indutor de resistência padrão, considerado controle positivo. No tratamento utilizado como testemunha (controle negativo) foi realizada pulverização somente com água destilada.

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento (fitotron), sob temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa de 90%. Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados (DBC) com três blocos e parcela experimental composta de três plantas. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial $3 \times 3 \times 4$, sendo os fatores: dois indutores de resistência (fosfito de potássio e acibenzolar-S-metil) e controle (sprayed with pure water only); tempos de avaliação (06, 24 e 48 horas após tratamento com indutores) e cultivares (MGS Aranãs, Iapar-59, Catuaí Vermelho IAC 144 e Mundo Novo IAC 376-4). O tratamento testemunha foi amostrado em todos os tempos avaliados e utilizado para fins de padronização. O experimento foi repetido duas vezes independentemente a fim de assegurar a repetibilidade dos dados obtidos. Foram utilizadas plantas com quatro pares de folhas totalmente expandidas, sendo que os tratamentos foram aplicados em toda a planta. Todas as folhas coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a maceração do tecido.

Seleção dos genes de referência e alvo

Foram selecionados seis potenciais genes de referência para normalização dos dados de RT-qPCR do presente estudo: protein 14-3-3 (*14-3-3*), ribosomal protein 24S (*24S*), adenine phosphoribosyltransferase 1 (*APT1*), elongation factor 1 α (*EF1 α*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) e protein phosphatase 2A (*PP2A*) (Tabela 2). A escolha desses genes foi baseada em estudos de validação em *C. arabica* [28, 29]

Como o fosfito de potássio atua na via de defesa do fitohormônio SA e induz a SAR [13], foram selecionados doze genes alvo envolvidos na via de defesa desencadeada por SA, relacionados à: explosão oxidativa - respiratory burst oxidase homolog protein D (*RBOHD*); biossíntese de AS - fenilalanina amônia-liase (*PAL*) e isochorismate synthase 2 (*ICS2*); regulação - mitogen-activated protein kinase (*MPK4*), enhanced disease susceptibility1 (*EDS1*) e phytoalexin deficient1 (*PAD4*); recepção - non-expressor of PR1(*NPR1*) e cyclin-dependent kinase8 (*CDK8*); e responsividade - pathogenesis – related 1 (*PR1*), β -1,3-glucanase (*GLU*, pertencente à família PR2), osmotin-like protein (*OLP*, pertencente à família PR5) e peroxidase (*POX*, pertencente à família PR9) (Tabela 2).

Desenho e síntese dos primers

Os primers utilizados para amplificar os genes *RBOHD*, *MPK4*, *EDS1*, *PAD4*, *NPR1*, *CDK8*, *PRI*, *GLU* e *PR5* foram desenhados com o auxílio do programa Primer 3 Plus [32]. Para a análise da qualidade estrutural dos primers desenhados foi utilizado o Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Tabela 2 Seis candidatos a genes de referência (*14-3-3*, *24S*, *APT1*, *EF1 α* , *GAPDH* e *PP2A*) e doze genes alvo para análise por RT- qPCR em folhas de cultivares de *C. arabica*

Gene	Acesso	Sequência de primer (5' – 3')	A (pb)	Tm (° C)	E (%)
<i>14-3-3</i>	SGN-U356404 ¹	F: TGTGCTCTTTAGCTTCCAAACG R: CTCACGAGACATATTGTCTTACTCAA	75	59.4 57.6	99.4
<i>24S</i>	GR986263.1 ²	F: ACGGCATCAAAGGAGACAAT R: ATGCAGAACATCGATCACGA	114	59.5 60.2	99.4
<i>APT1</i>	GT696592.1 ²	F: TAACTCAACCAGCAGCACCA R: TCTGCGGCGTCAGTAGTAGA	132	60.3 59.7	97.0
<i>EF1α</i>	GW466696.1 ²	F: CTCTCTCGCCTCCTGTCTTC R: CAGAGTCGACGTGACCAATG	105	59.2 60.3	95.6
<i>GAPDH</i>	SGN-U347734 ¹	F: TTGAAGGGCGGTGCAAA R: AACATGGGTGCATCCTTGCT	59	57.6 62.8	98.7
<i>PP2A</i>	GR994021.1 ²	F: CGAATAAACCTTTGGAACCTGG R: GGTAGGGTGAAGCTCTGCTG	117	59.8 60.0	99.5
<i>RBOHD</i>	XM_027269685.1 ³	F: CCAACAACGGACCACAGT R: CATGACCCCAATCCACAG	108	57.8 58.2	92.5
<i>PAL</i>	GT697082.1 ²	F: CATCAGGGCTTCGACAAAAT R: CGGGTGTATCCATCGAGAC	141	51.6 58.3	95.3
<i>ICS2</i>	Scaffold21359 ⁴	F: TGCCATAGTACGAGAAAACA R: CCCAGAAAATCGACCATAAA	124	79.0 79.0	97.0
<i>MPK4</i>	XM_027228798.1 ³	F: AGGAGTGCTTATTCATGGAGGC R: GGCGAATGGGAGGGACATAT	92	60.2 59.3	94.9
<i>EDS1</i>	XM_027270029.1 ³	F: TGAGAAAATGCAAGCAGGAT R: GCTGACAACCTTCTCCTTCA	103	58.5 58.0	93.2
<i>PAD4</i>	evm.model.Scaffold_2065.205 CDS ⁵	F: CAAGTGGTGGAGGGACAGA R: GCCCAGAAGCACGAATCTT	90	58.5 58.1	91.1
<i>NPR1</i>	XM_027209533.1 ³	F: GGCATTTCAGCGAGGATAAAC R: TGAGCTTCATGTCGGACTTT	101	59.7 58.4	102.8
<i>CDK8</i>	XM_027222762.1 ³	F: AAACACCAATCAGAGCAGCA R: GTACGTCCCCTCGCCTATCT	136	59.4 60.5	92.4
<i>PRI</i>	XM_027256901.1 ³	F: CATTCTCCTAGCAATCTTCTGG R: ATTGGCGTAGTTTTGTGCATAG	148	58.1 59.2	91.6
<i>GLU</i>	XM_027212980.1 ³	F: TGGGTGTTGAAGGGCTTG R: CATTGTCTTTCAGCATTTGCAC	90	60.7 60.7	91.3
<i>OLP</i>	evm.model.Scaffold_629.467 CDS ⁵	F: AACAATCACCTCCTCACAA R: GCAGCCCAAACCGTGTAG	81	58.0 60.3	92.7
<i>POX</i>	GR987384.1 ²	F: TTGCCTTCTCTGCTTTTGCA R: GCTTGACTTGCTCCCTGATGA	111	66.5 65.8	90.7

A amplicon, pb pares de bases, Tm temperatura de melting, E eficiência, F forward primer, R reverse primer

¹ Número de acesso de acordo com SOL Genomics Network / [28]

² Número de acesso de acordo com GenBank / [29]

³ Número de acesso de acordo com NCBI

⁴ Número de acesso de acordo com o banco de dados RNA-seq de café [30] / [31]

⁵ Número de acesso de acordo com Phytozome

Para análise da expressão do gene de referência *14-3-3* e *GAPDH* foram utilizados os primers desenvolvidos por Barsalobres-Cavallari *et al.* [28], para os genes de referência *24S*, *APT1*, *EF1a* e *PP2A*, e genes alvos *PAL* e *POX* foram utilizados os primers desenvolvidos por Reichel *et al.* [29] e o gene alvo *ICS2* foi utilizado o par de primers desenvolvido por Diniz *et al.* [31]. Posteriormente, todos os primers foram testados para amplificação específica em qPCR usando o *pool* de cDNA das amostras e DNA genômico de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 144.

Análises de RT-qPCR

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen por Thermo Fisher Scientific). Em seguida, as amostras de RNA total foram tratadas com TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) para a eliminação de eventual DNA presente. Esses procedimentos foram realizados de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ One/One^C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) e a integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,0%. Todas as amostras utilizadas apresentaram uma relação de leitura de 1,8-2,0 de absorvância em 260/280 nm e 260/230 nm para RNA de alta qualidade.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), a partir dos RNAs totais (1000 ng μL^{-1}) tratados com TURBO DNA-free™ Kit DNase, seguindo as especificações do fabricante. A reação de amplificação foi realizada em equipamento QuantStudio® 3 Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) com o seguinte ciclo de amplificação: 2 minutos a 50 °C e 2 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, finalizando com 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 segundo a 95 °C. Os dados gerados foram analisados no programa QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.3.1 (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific).

Para cada reação foram utilizados 1,0 μL de cDNA (40 ng/ μL), 0,2 μL de cada primer (0,4 μM) e 2,5 μL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation). A reação foi completada com 1,1 μL de água UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase, Free (Invitrogen by Life Technologies) para um volume final de 5,0 μL /amostra. Exceto para o gene *NPRI*, que foi utilizado 0,4 μL de cada primer (0,8 μM) e 0,7 μL de água. Como inter-ensaio de todas as placas foi utilizada a reação com 1,0 μL do *pool* de cDNA das amostras (100 ng/ μL), 0,2 μL de cada primer (0,4 μM) e 2,5 μL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation). A

reação foi completada com 1,1 µL de água UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase, Free (Invitrogen by Life Technologies), para um volume final de 5,0 µL/amostra. A ausência de contaminação foi verificada com reações contendo os reagentes e água (no template control – NTC).

Análise da estabilidade e número ótimo dos genes de referência

Os valores de ciclo de quantificação (Cq) dos genes de referência foram corrigidos de acordo com a eficiência de cada par de primers, com o auxílio do software GenEx Enterprise (MultiDAnalyzes, Göteborg, Suécia). Posteriormente, para avaliar a estabilidade dos genes de referência, os dados foram submetidos a ferramenta RefFinder [33], onde foram testados seis conjuntos de amostras: (i) amostras tratadas com acibenzolar-S-metil, (ii) amostras tratadas com fosfito de potássio, (iii) amostras sem tratamento, (iv) amostras de genótipo resistente com e sem tratamento, (v) amostras de genótipo suscetíveis com e sem tratamento, e (vi) todas as amostras.

A partir da classificação obtida com o auxílio do RefFinder, calculou-se o número ótimo de genes de referência necessários para normalizar cada conjunto de dados. Primeiramente, para cada gene em cada conjunto de dados foi identificado o Cq de maior valor, em seguida, esse foi submetido a fórmula $2^{(\text{Valor da amostra de maior Cq} - \text{Valor de Cq amostra } n)}$. Para cada amostra foram calculados os fatores de normalização (NFs) e, posteriormente, uma matriz gerada a partir da razão dos dados de dois NF sequenciais de cada amostra que foram transformados em \log_2 . O desvio padrão dos dados da matriz para cada par de NF ($V_n / n+1$) foi calculado e utilizado um *cut-off* < 0,15, sendo estipulado o número ótimo de genes de referência para cada conjunto de dados experimental [34].

Quantificação da expressão relativa

Os dados de expressão foram quantificados relativamente pela fórmula de Pfaffl [35], com a normalização sendo feita com a expressão dos genes de referência selecionados a partir dos cálculos de estabilidade e número ótimo de genes do conjunto de dados de todas as amostras. Foi utilizada como amostra calibradora a que apresentou o maior valor Cq. As amostras foram processadas em duplicata técnica e triplicata biológica.

Determinação da atividade enzimática

Os extratos enzimáticos foram obtidos com a adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p) ao microtubo, e homogeneizado em vórtex com tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0. Para as enzimas APX e SOD adicionou-se 600 μ L do tampão para cada 100 mg de tecido vegetal; para a enzima PPO, a cada 100 mg de tecido vegetal adicionou-se 500 μ L do tampão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo para as análises das atividades enzimáticas [36].

A atividade da APX (EC 1.11.1.11) foi quantificada de acordo com o método proposto por Nakano & Asada [37]. Para isso, foram adicionados 1 μ L do extrato enzimático, ajustado para 200 μ L de solução tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 contendo ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio 0,1 mM. O conteúdo foi incubado durante 3 minutos a 30 °C. Em seguida, a atividade desta enzima foi determinada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a 290 nm, no período de 3 minutos a 30 °C. O coeficiente de extinção molar de $1,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi empregado para calcular a atividade da APX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína).

A atividade da PPO (EC 1.10.3.1) foi estabelecida conforme metodologia descrita por Kar & Mishra [38]. Foram adicionados 15 μ L do extrato enzimático, ajustado para 200 μ L de solução de tampão fosfato de potássio 70 mM pH 7,0 e catecol 20 mM. Após incubação a 30 °C, por 10 minutos, a absorbância foi medida a 410 nm. O coeficiente de extinção molar de $1,235 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a atividade da PPO ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína).

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi pré-determinada pela competência da enzima em coibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) [39], em um meio de incubação composto por tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, metionina 70 mM, EDTA 10 μ M, NBT 1 mM, riboflavina 1 mM e 30 μ L do extrato enzimático na diluição 1:50 (amostra:tampão). A mistura foi incubada por 15 minutos, em uma câmara com lâmpada fluorescente de 30 W e, em seguida, a absorbância foi determinada a 560 nm. Uma unidade da SOD equivale à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio. A atividade da SOD foi apresentada em U SOD/min/mg proteína.

A proteína total de cada extrato enzimático foi determinada segundo a metodologia de Bradford [40], utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina. Todos os experimentos foram conduzidos usando três repetições técnicas. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro de microplacas PowerWave XS (Biotek).

Determinação dos teores de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel

O material vegetal macerado foi liofilizado e uma alíquota de 30 mg homogeneizada com metanol a 80%. O sobrenadante (extrato metanólico) foi utilizado para determinar os compostos fenólicos solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi usado para determinação de lignina. Para determinação dos fenóis solúveis totais, o extrato metanólico foi misturado com o reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N. À solução foram adicionados Na_2CO_3 (Carbonato de sódio) 1 M e água destilada. O volume da reação foi de 200 μL e os valores de absorvância desta reação foram estabelecidos a 725 nm, em espectrofotômetro e calculados com base na curva do catecol. Os compostos fenólicos foram definidos em equivalente miligrama de catecol por grama de tecido seco [41].

Para quantificação de lignina solúvel, ao resíduo sólido foi adicionado metanol a 80%, homogeneizado, centrifugado e a reação levada a estufa para secagem a 45 °C durante 15 horas. Em seguida, o resíduo foi hidratado com solução de ácido tioglicólico e 2 M ácido clorídrico (1:10), a solução foi colocada em banho maria a 100 °C durante 4 horas. A reação foi centrifugada e o precipitado dissolvido em água destilada e novamente centrifugado. A seguir, o precipitado foi ressuspensão em NaOH (Hidróxido de sódio) 0,5 M e novamente, centrifugado. O sobrenadante resultante foi misturado com ácido clorídrico P.A. e mantido em câmara fria (4°C) durante 4 horas. A seguir, a mistura foi centrifugada e o precipitado ressuspensão em NaOH 0,5 M. A absorvância desta solução foi determinada por espectrofotometria, a 280nm e os valores calculados com base na curva da lignina e expressos em miligrama de lignina solúvel por grama de tecido seco [42]. Todos os experimentos foram conduzidos usando três repetições técnicas. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro de microplacas PowerWave XS (Biotek).

Análises estatísticas

Para a análise estatística e plotagem dos gráficos, utilizou-se os valores resultantes da equação (tratamento com o indutor/tratamento controle), correspondente a cada período avaliado. Sendo assim, cada variável resposta é representada pelo acúmulo de transcritos/atividade enzimática/metabólitos secundários em relação ao controle negativo (testemunha). Todos os dados foram submetidos à análise de variância para experimento fatorial triplo em blocos casualizados, balanceados e de efeitos fixos. Variáveis significativas pelo

teste F foram submetidas ao teste de Tukey, 5% de significância, para diferenciar os indutores, o tempo e as cultivares. Para as análises foi utilizado o software R [43] e o pacote ExpDes.pt [44].

Resultados

Estabilidade da expressão dos genes de referência

A estabilidade da expressão dos seis candidatos a genes de referência (*14-3-3*, *24S*, *APT1*, *EF1 α* , *GAPDH* e *PP2A*) foi analisada em seis diferentes conjuntos de amostras com base na ferramenta RefFinder que inclui os algoritmos Delta-Ct, BestKeeper, NormFinder e geNorm (Fig. Suplementar 1) [33]. Os valores médios de Cq de todas as amostras analisadas variaram de 16,95 a 26,02, expressos pelos genes *GAPDH* e *APT1*, respectivamente, indicando grande variação nos níveis de expressão nos candidatos a genes de referência analisados para esse estudo. Entre os conjuntos de amostras avaliados foi observada variação na estabilidade de expressão e classificação dos genes de referência. De acordo com os valores calculados pelos algoritmos geNorm e BestKeeper, usando os dados dos valores médios de Cq do conjunto de todas as amostras, todos os genes candidatos exibiram estabilidade transcricional aceitáveis, pois apresentaram valores M (geNorm) abaixo de um valor de corte de 1,5 [34] e desvio padrão (BestKeeper) abaixo de 1 [45]. Entretanto, para estes algoritmos, as estabilidades dos genes *PP2A* (M = 0,58 e SD = 0,22, respectivamente) e *GAPDH* (SV = 0,58 e SD = 0,38, respectivamente) foram maiores quando comparados aos demais genes avaliados. Por outro lado, *PP2A* e *14-3-3* foram considerados os genes mais estáveis pelo NormFinder (SV = 0,31 e 0,54, respectivamente) e Delta-Ct (Cq = 0,68 e 0,78, respectivamente). Todos os quatro algoritmos ranquearam *EF1 α* como o gene menos estável (geNorm = 0,80, BestKeeper = 0,60, NormFinder = 0,68 e Delta-Ct = 0,87) (Fig. Suplementar 1).

A classificação geral estabelecida por RefFinder revelou que os genes mais estáveis foram *PP2A* seguido por *GAPDH*, e o gene de referência menos estável foi *EF1 α* (Fig. Suplementar 2). Para todos os conjuntos de amostras foi calculado o número ótimo de genes de referência para normalizar a expressão. O número ótimo foi calculado de acordo com o primeiro valor de V abaixo do valor de corte de 0,15 [34], que indicou o número mínimo recomendado e adequado de genes de referência para normalizar cada conjunto de amostras (Fig. Suplementar 3). No conjunto de todas as amostras, o valor de variação pareada para V2/3 (0,13)

está abaixo do cut-off, indicando que a combinação recomendada dos dois genes de referência mais estáveis para esse conjunto de amostras, *PP2A* e *GAPDH*, é suficiente para a normalização da expressão gênica.

Expressão relativa dos genes alvo

A indução da via do fitohormônio SA após a aplicação de fosfito de potássio foi investigada pela análise da expressão gênica de doze genes (*RBOHD*, *PAL*, *ICS2*, *MPK4*, *EDS1*, *PAD4*, *NPR1*, *CDK8*, *PRI*, *GLU*, *OLP* e *POX*). Os resultados demonstram que o fosfito de potássio (KPhi), assim como o indutor padrão acibenzolar-S-metil (ASM), induziram a expressão dos genes analisados nas cultivares MGS Aranãs (AR), Iapar-59 (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV), e Mundo Novo IAC 367-4 (MN) nos três períodos de tempos avaliados (6, 24 e 48 horas) (Fig.1). No entanto, os níveis de expressão desses genes não foram associados com a resistência ou suscetibilidade das cultivares à ferrugem. De modo geral verificou-se que, em maior parte, os níveis de expressão dos genes induzidos pelo tratamento ASM (controle positivo) foram superiores em comparação ao tratamento KPhi. Entretanto, observamos que a aplicação de KPhi foi capaz de induzir a expressão dos genes alvos, especialmente para *PAL* e *POX* nas cultivares resistentes.

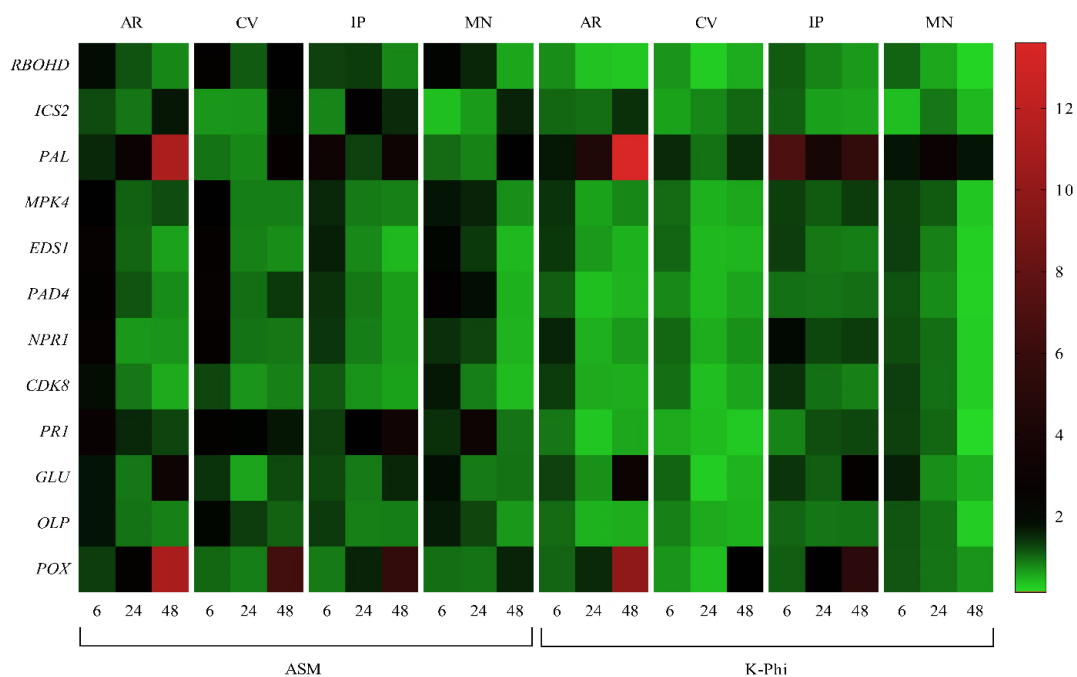


Fig. 1 Expressão relativa dos genes alvo (*RBOHD*, *PAL*, *ICS2*, *MPK4*, *EDS1*, *PAD4*, *NPR1*, *CDK8*, *PRI*, *GLU*, *OLP* e *POX*) após a aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acibenzolar-S-metil) nas diferentes cultivares de *C. arabica* avaliadas nos tempos de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar-59 (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). O nível de expressão do gene é indicado de acordo com a escala de cores

Genes envolvidos na produção de ROS e enzimas antioxidantes

O gene *RBOHD*, envolvido na produção de espécies reativas de oxigênio, apresentou diferença significativa entre os tratamentos (indutores), exceto na cultivar IP (Fig. 2). Nas demais cultivares, o gene apresentou uma indução significativamente maior após a aplicação de ASM (controle positivo), principalmente nos primeiros períodos avaliados. Entretanto, o KPhi não induziu a expressão desse gene se comparado ao controle.

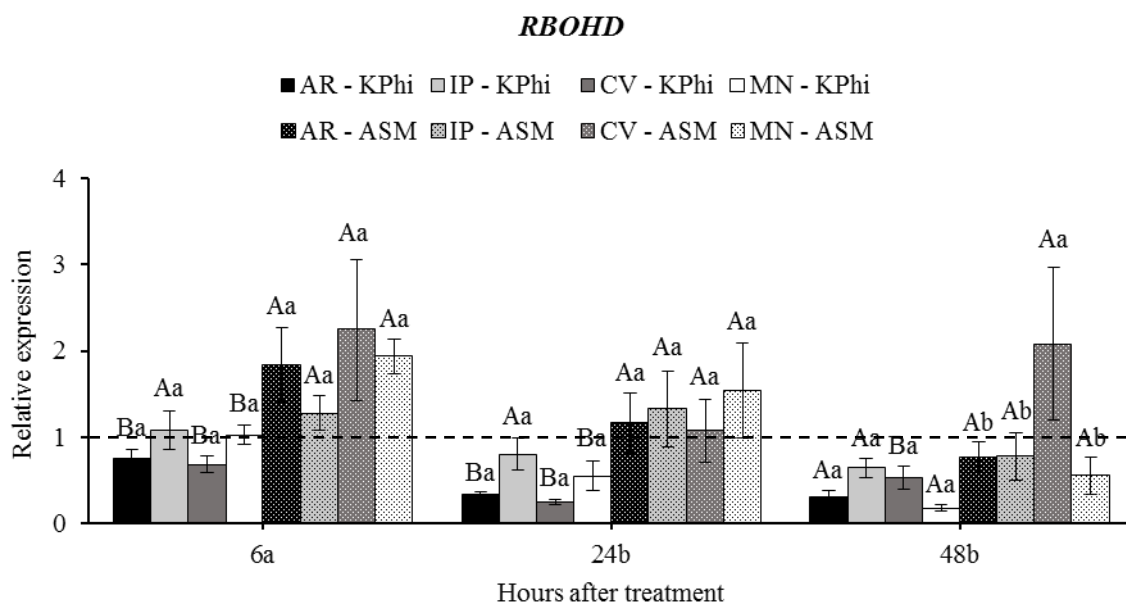


Fig. 2 Expressão relativa do gene *RBOHD*, relacionado a produção de espécies reativas de oxigênio, em folhas de diferentes cultivares de *C. arabica* após aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acibenzolar-S-metil) avaliados no tempo de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). Barras de erro indicam desvios padrão; n = 3. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os indutores de resistência dentro de cada cultivar. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre as cultivares dentro de cada de indutor. Letras minúsculas junto aos valores de tempo indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação. A linha tracejada corresponde ao tratamento controle

As enzimas SOD e APX, responsáveis pela detoxificação celular atuando na eliminação das espécies reativas de oxigênio produzidas sob estresse, apresentaram comportamentos distintos em relação a sua atividade após o tratamento com os indutores de resistência (Fig. 3).

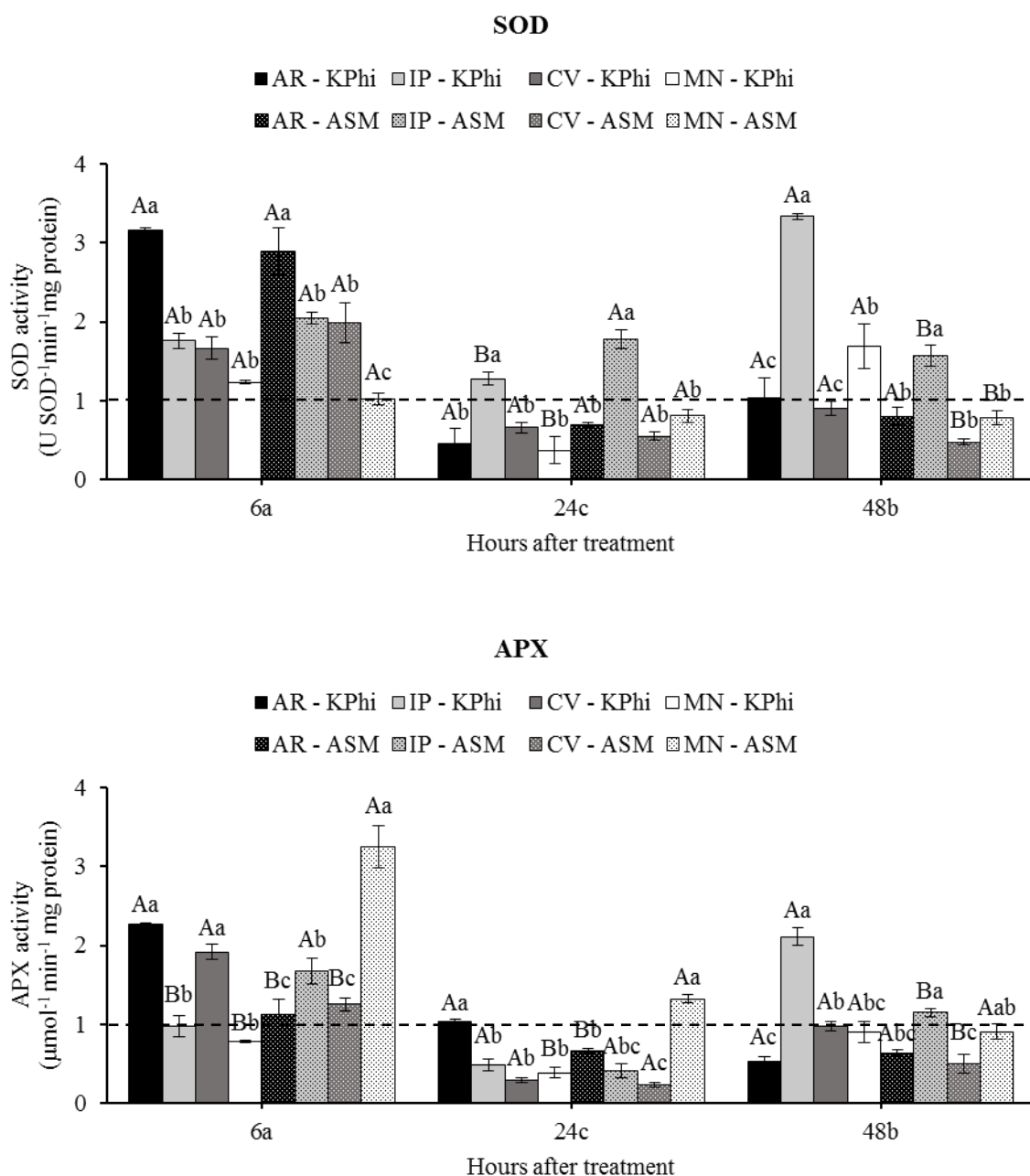


Fig. 2 Atividade enzimática de SOD e APX em folhas de diferentes cultivares de *C. arabica* após aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acibenzolar-S-metil) avaliados no tempo de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). Barras de erro indicam desvios padrão; $n = 3$. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os indutores de resistência dentro de cada cultivar. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre as cultivares dentro de cada de indutor. Letras minúsculas junto aos valores de tempo indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação. A linha tracejada corresponde ao tratamento controle

A atividade da SOD não se diferenciou significativamente entre os tratamentos (indutores) no período de 6 horas após aplicação de ASM e KPhi. Adicionalmente foi possível observar, neste tempo, que ambos os

indutores apresentaram expressão maior que o controle para todas as cultivares, exceto para MN após tratamento com ASM. Mostrando que o KPhi apresenta uma capacidade equivalente de induzir a atividade da SOD se comparado ao ASM para AR, CV e IP. Neste mesmo período de avaliação, também, foi possível observar, após o tratamento com ambos indutores, que a cultivar AR foi significativamente superior as demais. Já nos períodos de 24 e 48h, a cultivar IP apresentou uma atividade enzimática significativamente maior que as outras cultivares. Além disso, às 48h, para as cultivares IP e MN, a aplicação de KPhi gerou maior atividade enzimática que o controle e significativamente maior quando comparado à aplicação de ASM (Fig. 3).

Para a enzima APX, às 6h, foi possível detectar que as cultivares AR e CV apresentaram atividade estatisticamente maior após a aplicação do indutor KPhi. No entanto, para este mesmo tempo, a atividade enzimática foi significativamente maior no tratamento ASM nas cultivares MN e IP. Às 48h, a cultivar IP apresentou um aumento significativo na atividade da APX em resposta ao indutor KPhi. No geral, a atividade dessa enzima foi maior no período de 6 horas (Fig.3).

Expressão de genes envolvidos na biossíntese, regulação, recepção e responsividade da via do SA

As cultivares apresentaram diferença significativa para a expressão dos genes *ICS2* e *PAL*, envolvidos na biossíntese de SA (Fig. 4). A cultivar resistente IP, às 24h, apresentou os maiores níveis significativos de expressão de *ICS2* em relação as demais cultivares, após o tratamento com ASM, que também foi significativamente maior do que o tratamento com KPhi. Para esse mesmo gene, às 48h, diferença significativa entre os indutores de resistência foi verificada apenas nas cultivares IP e MN, que apresentaram maior expressão após a aplicação de ASM. Para o gene *PAL*, com relação a aplicação dos indutores não se observou diferença significativa entre eles. No entanto, a cultivar AR produziu um aumento significativo dos níveis de transcritos ao longo dos tempos avaliados, com maior expressão desse gene as 48 horas, em ambos os tratamentos (indutores). Entretanto, foi possível observar que a expressão desse gene foi maior que o controle para ambos os indutores, todos os tempos e cultivares avaliadas, além de demonstrar que KPhi apresenta mesma capacidade de induzir expressão desse gene se comparado ao ASM (Fig. 4).

Em relação à expressão relativa dos genes *MPK4*, *EDS1* e *PAD4*, envolvidos na regulação do SA, observa-se diferença significativa após tratamento com os indutores. No geral, após a aplicação de ASM ocorreu uma maior indução significativa desses genes, principalmente, no período de 6 horas que foi estatisticamente superior aos demais períodos avaliados (Fig. 5). Para o gene *MPK4*, ocorreu maior expressão nas cultivares AR

e CV após tratamento com ASM. Para os genes *EDS1* e *PAD4*, além dessas duas cultivares, a cultivar MN também teve um aumento significativo da expressão de ambos os genes após aplicação de ASM.

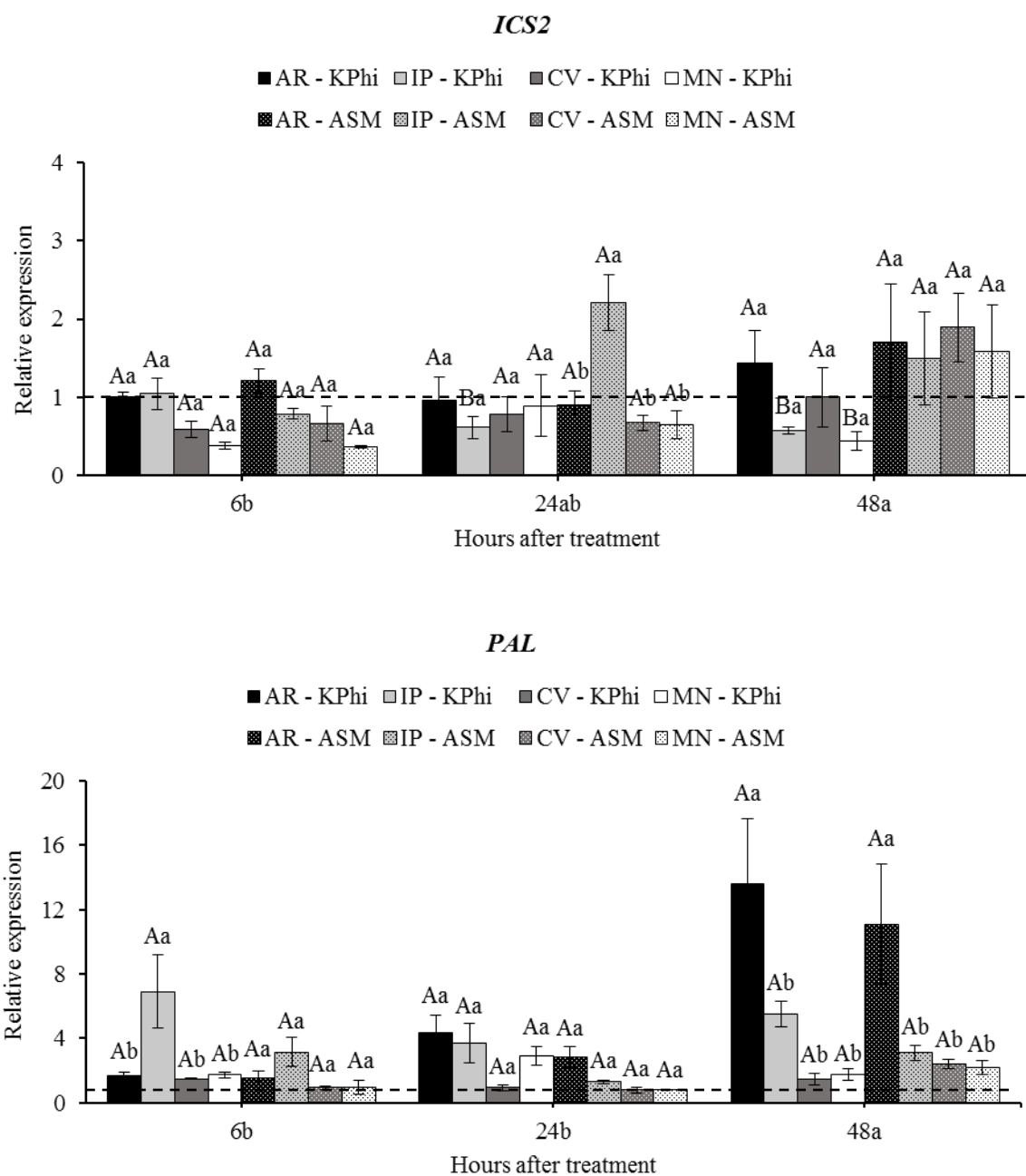
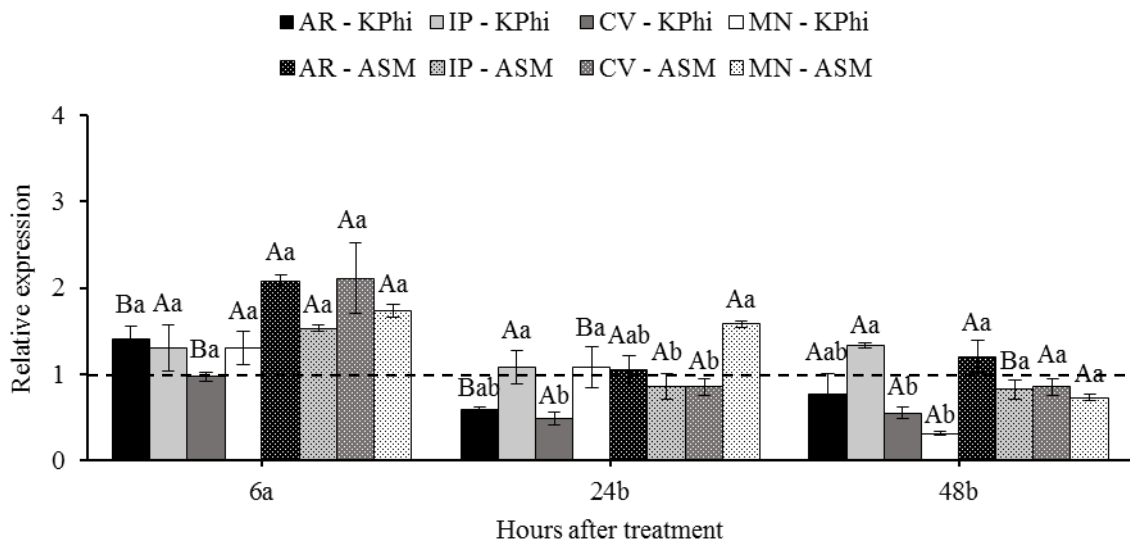
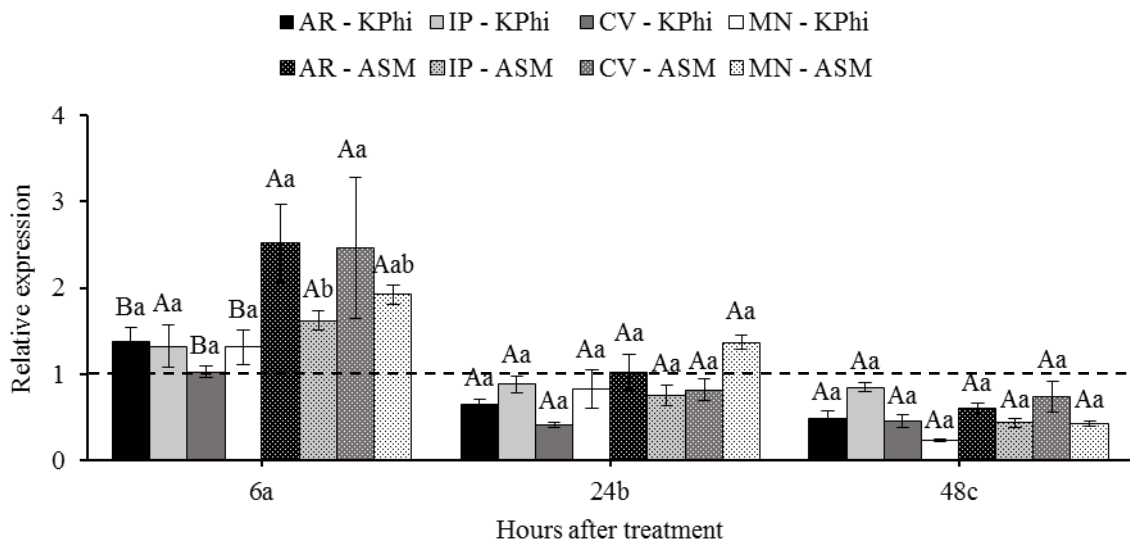


Fig. 4 Expressão relativa dos genes *ICS2* e *PAL*, envolvidos na biossíntese do ácido salicílico, em folhas de diferentes cultivares de *C. arabica* após aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acibenzolar-S-metil) avaliados no tempo de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). Barras de erro indicam desvios padrão; n = 3. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os indutores de resistência dentro de cada cultivar. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre as cultivares dentro de cada de indutor. Letras minúsculas junto aos valores de tempo indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação. A linha tracejada corresponde ao tratamento controle

MPK4***EDS1***

(Continua)

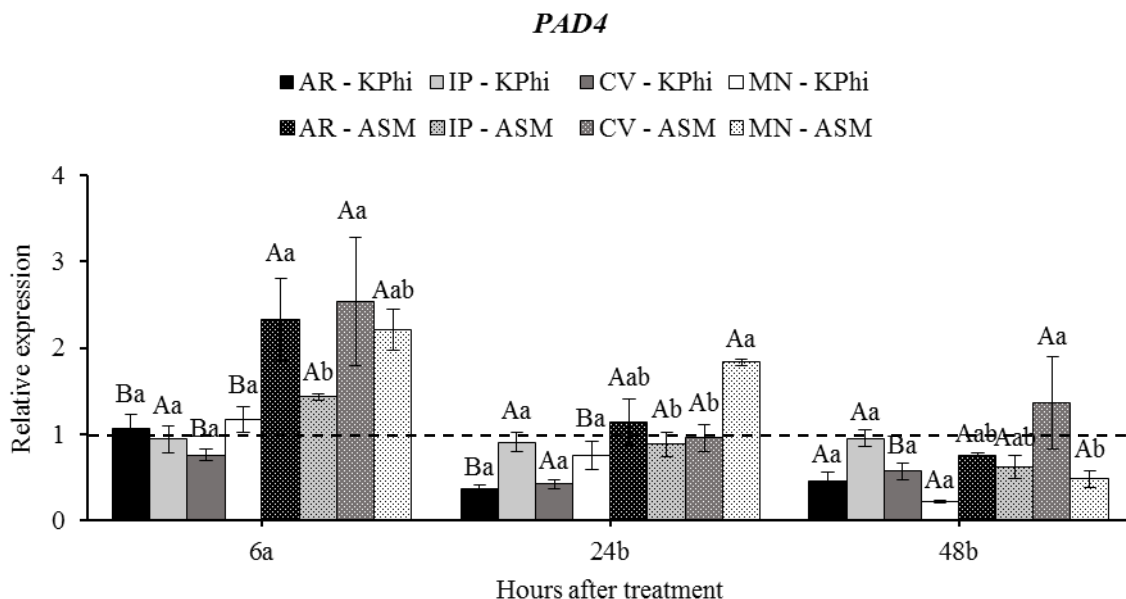


Fig. 5 Expressão relativa dos genes *MPK4*, *EDS1* e *PAD4*, envolvidos na regulação do ácido salicílico, em folhas de diferentes cultivares de *C. arabica* após aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acibenzolar-S-metil) avaliados no tempo de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). Barras de erro indicam desvios padrão; n = 3. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os indutores de resistência dentro de cada cultivar. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre as cultivares dentro de cada de indutor. Letras minúsculas junto aos valores de tempo indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação. A linha tracejada corresponde ao tratamento controle

Quanto aos genes *NPR1* e *CDK8*, relacionados a recepção do SA para regulação da expressão de genes alvos responsáveis pela resposta de defesa, observou-se diferença significativa entre os indutores. No geral, também, ocorreu um aumento significativo da expressão desses genes as 6 horas (Fig. 6). Na cultivar AR, após o tratamento com ASM, houve maior indução de expressão de ambos os genes. Na cultivar CV, após aplicação de ASM, ocorreu maior indução de expressão somente do gene *NPR1*.

Os genes *PR1*, *PR2* e *PR5*, responsáveis pela resposta de defesa relacionadas a via do SA, apresentaram diferentes perfis de expressão gênica após a aplicação dos tratamentos (Fig. 7). O gene *PR1* apresentou maior expressão após o tratamento com o indutor ASM em todas as cultivares em pelo menos um tempo avaliado. Para o gene *PR2*, a cultivar IP apresentou expressão significativamente maior quando comparado ao tratamento com ASM, às 48 horas após aplicação de KPhi. Para a cultivar AR, os resultados da expressão relativa desse gene foram semelhantes entre os indutores. As cultivares resistentes (AR e IP) apresentaram aumento da expressão

estatisticamente maior que as cultivares suscetíveis (CV e MN) após tratamento com KPhi, às 6h. O gene *PR5* apresentou diferença significativa entre os indutores de resistência. ASM foi o tratamento que apresentou maior expressão, principalmente às 6 horas, exceto quando se observou os resultados da cultivar IP em que não houve diferença significativa entre os indutores ao longo dos tempos avaliados (Fig. 7).

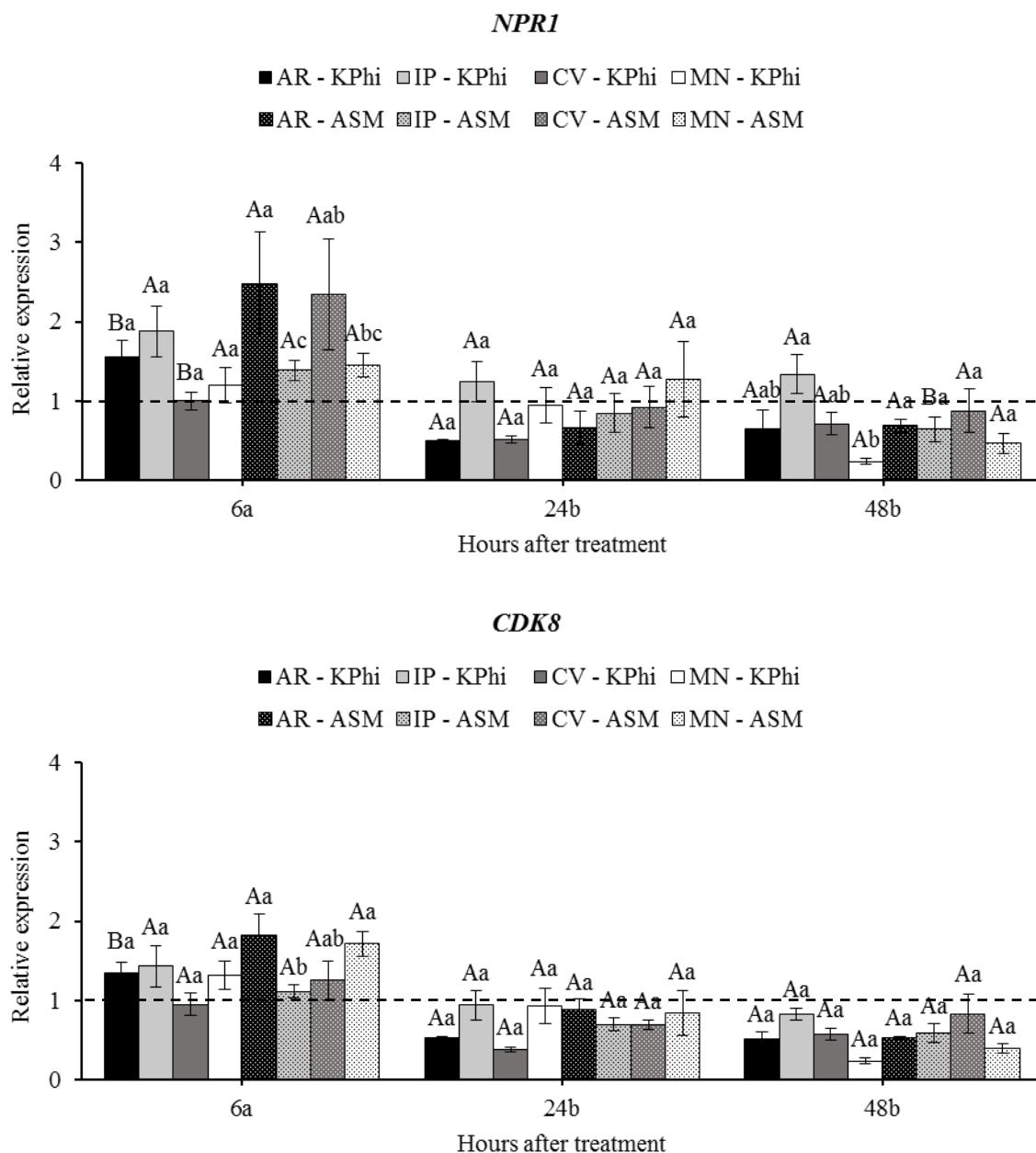
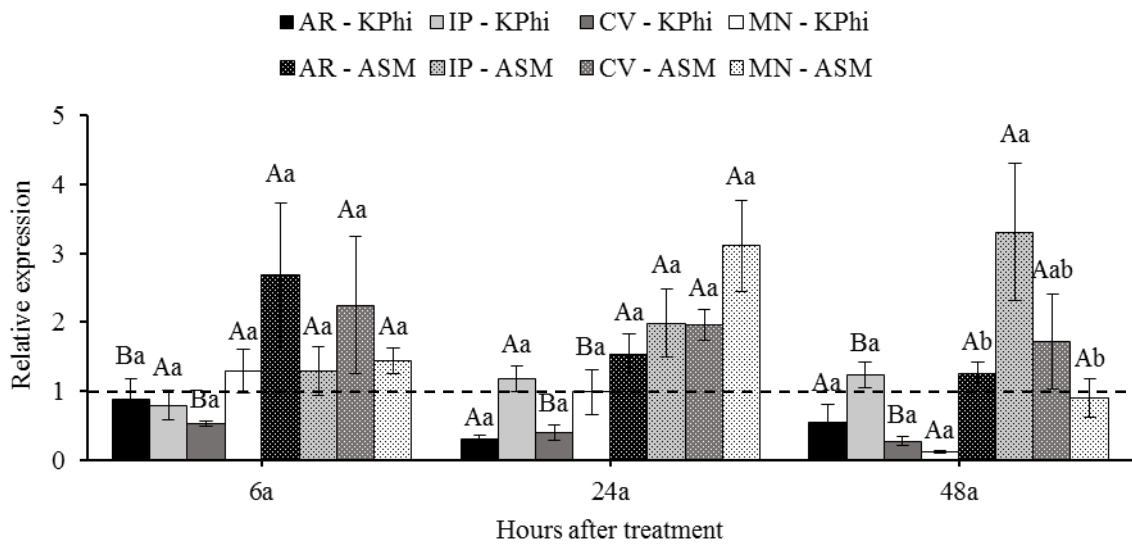
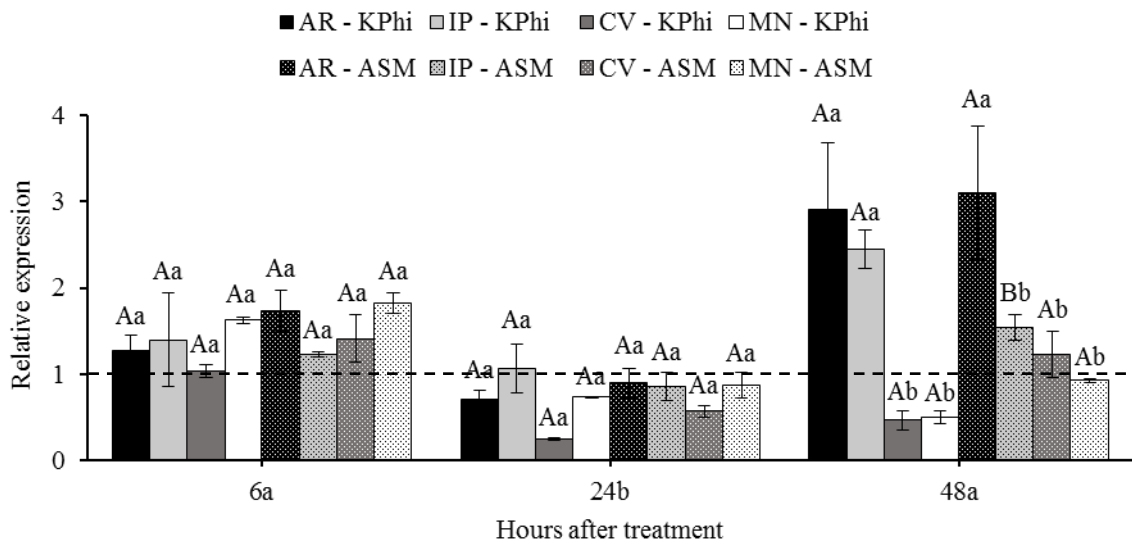


Fig. 6 Expressão relativa dos genes *NPR1* e *CDK8*, relacionados à recepção de ácido salicílico para regular a expressão de genes alvo, em folhas de diferentes cultivares de *C. arabica* após aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acicbenzolar-S-metil) avaliados no tempo de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). Barras de erro indicam desvios padrão; n = 3. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os indutores de resistência dentro de cada cultivar. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre as cultivares dentro de cada de indutor. Letras minúsculas junto aos valores de tempo indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação. A linha tracejada corresponde ao tratamento controle

PR1



PR2



(Continua)

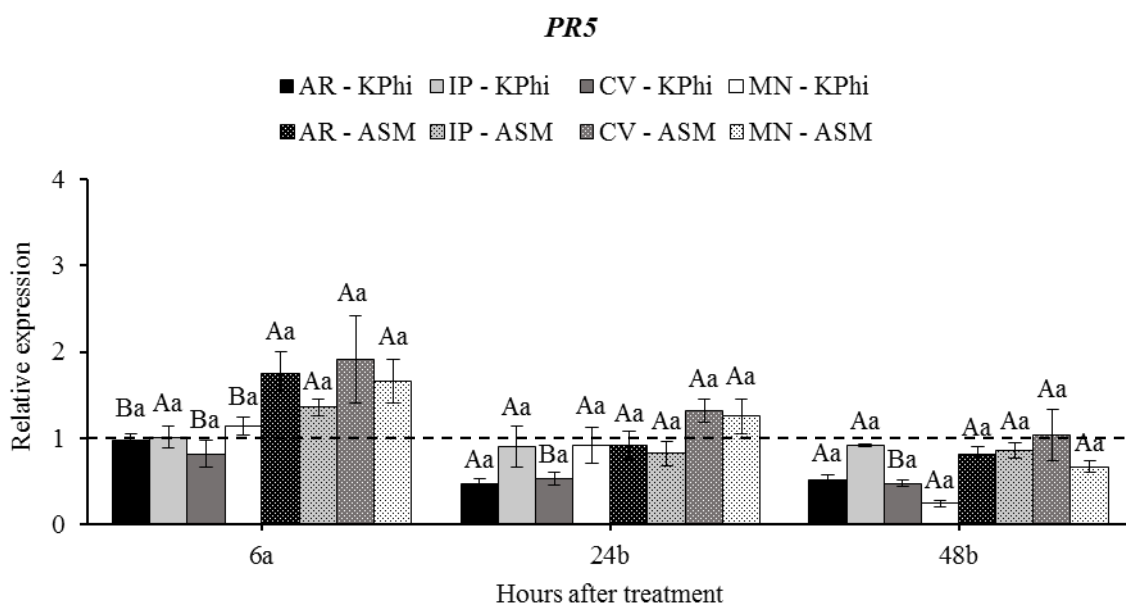


Fig. 7 Expressão relativa dos genes *PR1*, *PR2* e *PR5*, relacionados à resposta de defesa relacionada a via do ácido salicílico, em folhas de diferentes cultivares de *C. arabica* após aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acibenzolar-S-metil) avaliados no tempo de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). Barras de erro indicam desvios padrão; n = 3. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os indutores de resistência dentro de cada cultivar. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre as cultivares dentro de cada de indutor. Letras minúsculas junto aos valores de tempo indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação. A linha tracejada corresponde ao tratamento controle

Componentes envolvidos na formação de compostos fenólicos

O gene *POX*, envolvido na biossíntese de lignina, não apresentou diferença significativa na expressão entre indutores de resistência, exceto para a cultivar CV no período de 48 horas, onde a aplicação do ASM induziu maior expressão se comparado a KPhi (Fig. 6). Entretanto foi possível observar que o indutor KPhi, assim como o ASM, induziu alta expressão desse gene nas cultivares AR e IP, cerca de 11 e 6 vezes mais que o controle, respectivamente. No geral, as cultivares AR, IP e CV apresentaram um aumento da expressão relativa de *POX* ao longo do tempo avaliado, com um pico de expressão as 48 horas, entretanto AR produziu níveis significativamente maiores em comparação as outras cultivares.

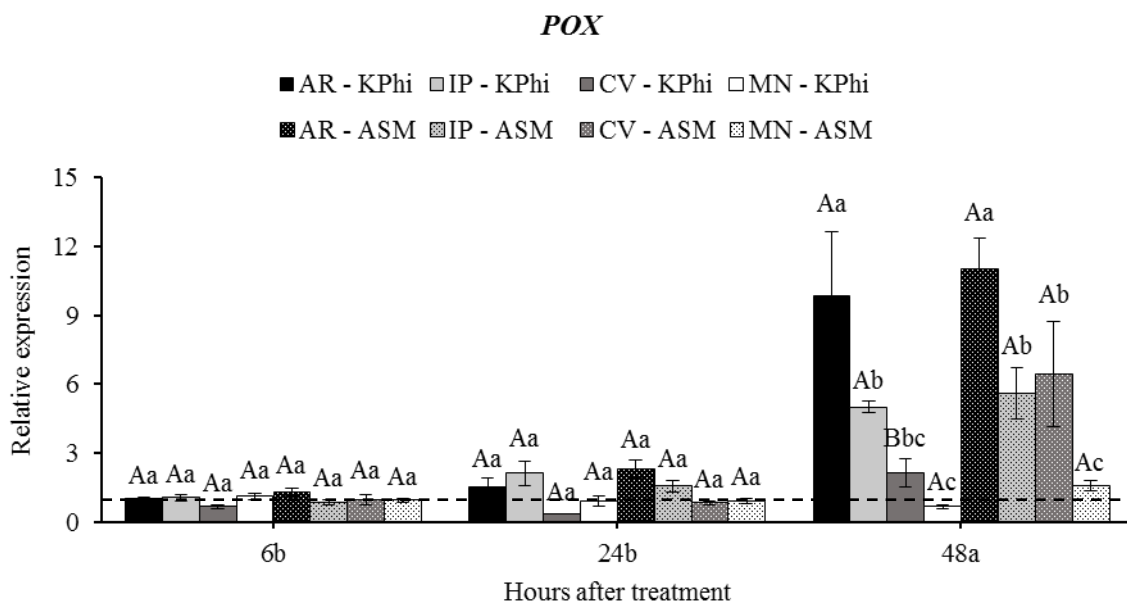


Fig. 8 Expressão relativa do gene *POX*, variável envolvida na biossíntese de lignina, em folhas de diferentes cultivares de *C. arabica* após aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acibenzolar-S-metil) avaliados no tempo de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). Barras de erro indicam desvios padrão; n = 3. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os indutores de resistência dentro de cada cultivar. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre as cultivares dentro de cada de indutor. Letras minúsculas junto aos valores de tempo indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação. A linha tracejada corresponde ao tratamento controle

Em relação a atividade da enzima PPO, relacionada a formação de compostos fenólicos, os resultados mostram diferença significativa tanto entre os indutores testados quanto entre as cultivares (Fig. 9). Na cultivar IP a atividade da enzima aumentou ao longo do tempo até as 24 horas, onde apresentou o pico da ação enzimática, sendo significativamente maior no tratamento com KPhi. Já nas cultivares AR e MN, a atividade enzimática foi significativamente maior após a aplicação de ASM. A cultivar CV foi a que apresentou menor atividade dessa enzima após os tratamentos com os indutores em todos os tempos avaliados, entretanto em 6 horas o tratamento KPhi induziu uma atividade significativamente maior em relação ao ASM.

Teores de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel

Os níveis de compostos fenólicos totais não diferiram significativamente entre as variáveis analisadas. O teor de lignina apresentou diferença significativa entre as cultivares, sem ocorrer a discriminação entre cultivares resistentes e suscetíveis (Fig. Suplementar 8).

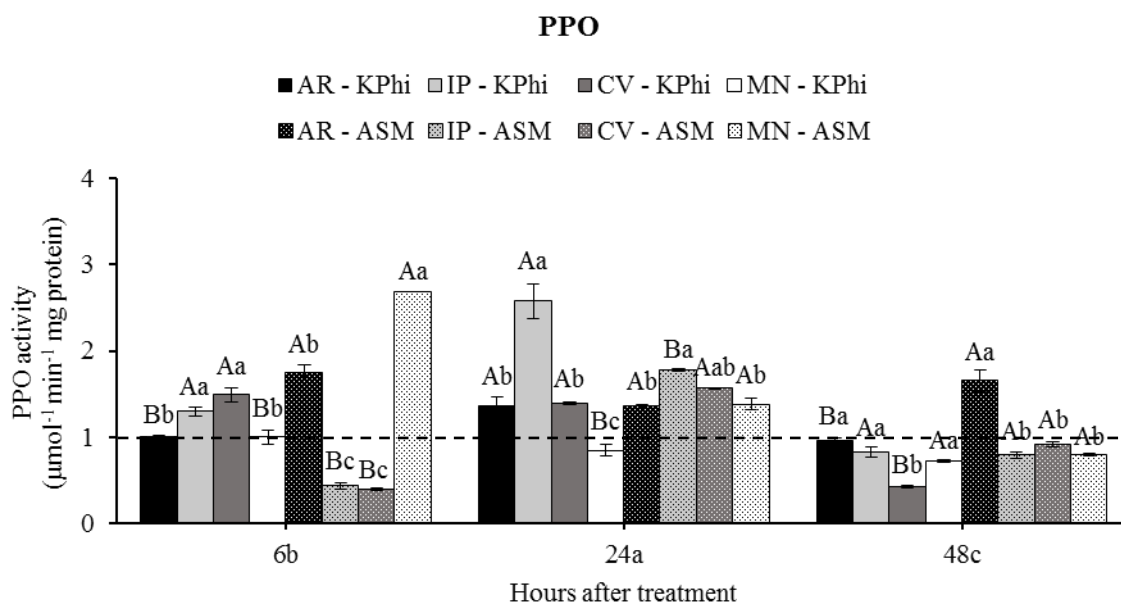


Fig. 9 Atividade enzimática de PPO em folhas de diferentes cultivares de *C. arabica* após aplicação de KPhi (fosfito de potássio) e ASM (acibenzolar-S-metil) avaliados no tempo de 6, 24 e 48 horas. Cultivares: Aranãs (AR), Iapar (IP), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV) e Mundo Novo IAC 367-4 (MN). Barras de erro indicam desvios padrão; n = 3. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os indutores de resistência dentro de cada cultivar. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre as cultivares dentro de cada de indutor. Letras minúsculas junto aos valores de tempo indicam diferenças significativas (teste de Tukey; $p \leq 0,05$) entre os tempos de avaliação. A linha tracejada corresponde ao tratamento controle

Discussão

Para obtermos resultados precisos e confiáveis utilizamos genes de referência para normalizar os dados de expressão gênica das amostras do presente estudo. Esses genes devem apresentar estabilidade nos níveis de expressão em todas as amostras avaliadas e devem ser validados para cada condição experimental, uma vez que os níveis de expressão podem variar de acordo com cada contexto analisado [34, 46]. Além disso, é fundamental calcular o número e a combinação adequada desses genes para evitar e/ou reduzir grandes variações na expressão dos genes alvo [34]. Sendo assim, foram testados seis genes de referência candidatos (*14-3-3*, *24S*, *APT1*, *EF1 α* , *GAPDH* e *PP2A*) em cultivares de *C. arabica* com resistência contrastante à ferrugem (resistentes: AR e IP; e suscetíveis: CV e MN), pulverizadas com indutores de resistência (ASM e KPhi) e avaliadas em três períodos diferentes (6, 24 e 48 horas após a aplicação dos produtos) em câmara de crescimento. Nesse contexto

experimental, os genes de referência mais estáveis no conjunto de todas as amostras foram *PP2A* e *GAPDH*, e a combinação desses genes foi suficiente para normalizar a análise dos dados de RT-qPCR.

Nesse estudo, a aplicação foliar de KPhi aumentou a transcrição de genes relacionados a respostas de defesa (*PAL*, *NPRI*, *GLU* e *POX*) além de aumentar a atividade de enzimas de defesa (SOD, APX e PPO) apresentando expressão relativa / atividade enzimática semelhante ou maior que à observada após a aplicação do indutor padrão ASM em várias situações avaliadas (cultivares e tempos de coleta). Estudos sobre a indução de resistência têm demonstrado que fosfitos são tão eficientes quanto o indutor de resistência ASM, uma vez que, ativam os mecanismos naturais de defesa do cafeeiro, aumentando a resistência a doenças e, conseqüentemente, promovendo o controle de doenças como ferrugem, mancha de phoma e mancha manteigosa [10, 47, 48].

Sabe-se que o ASM atua no cafeeiro induzindo uma resposta geral de resistência mediada pelo SA [49-51], mas, o modo de ação de KPhi ainda não foi completamente caracterizado. Sabe-se que assim como ASM, esse composto induz o acúmulo de SA e a SAR [12, 13, 52]. Vale ressaltar que apenas o nutriente que acompanha o íon fosfito, nesse caso, o potássio, é assimilado pela planta [53]. Esse nutriente quando fornecido em baixas concentrações promove a produção de ROS, aumenta a produção de antioxidantes e afeta o balanço de fitohormônios [16].

A SAR pode ser desencadeada a partir da geração de ROS [54]. A produção dessas moléculas pode ser mediada por NADPH (RBOHs) oxidases da membrana plasmática, por peroxidases da parede celular ou por ambas [17]. Entre as RBOHs, a RBOHD atua como mediadora de uma rápida sinalização sistêmica [18]. O indutor KPhi não induziu a expressão de *RBOHD*, sugerindo que a possível produção de ROS não foram geradas a partir de NADPH oxidases. Resultados semelhantes foram constatados por Massoud et al. [13], com a aplicação de KPhi como indutor de resistência no patossistema *Hyaloperonospora arabidopsidis* x *Arabidopsis*. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que o efeito do suprimento de potássio é inversamente proporcional a atividade de NADPH oxidase e a produção da molécula superóxido dependente dessa enzima [55].

Os resultados sugerem a produção de ROS em resposta a KPhi, uma vez que esse indutor induziu o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX). Essas enzimas constituem o mecanismo de defesa antioxidante enzimático celular, protegendo os componentes celulares de danos nocivos causados pelo acúmulo de ROS [56]. A enzima SOD atua na linha de frente do sistema de detoxificação celular, sendo responsável por converter os íons superóxido em peróxido de hidrogênio, e em seguida reduzido a água através da ação da enzima APX, que utiliza ascorbato como substrato [57]. De acordo

com Monteiro et al. [10], a aplicação de fosfito de manganês induziu o aumento na atividade das enzimas PAL, APX, SOD e PPO no patossistema café – *H. vastatrix* após a infecção do patógeno, além de aumentar a expressão de genes que codificam outras enzimas do complexo antioxidante, a peroxidase e a catalase.

Entre as ROS, o peróxido de hidrogênio apresenta alta permeabilidade pelas membranas. Dessa forma, atua como mensageiro secundário, desencadeando a ativação de genes de defesa local e sistêmico. Essa molécula também atua na biossíntese de SA, aumentando a atividade da enzima ácido benzóico-2-hidroxilase (BA2H) que catalisa a etapa final da via da fenilalanina [54]. Neste estudo, observamos que KPhi induziu altos níveis de expressão de fenilalanina amônia liase (PAL) nas cultivares resistentes em relação às suscetíveis. A enzima PAL atua convertendo fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que é posteriormente convertido em BA2H; além disso, a PAL é uma enzima chave da via dos fenilpropanóides, responsável pela biossíntese de vários metabólitos secundários relacionados à defesa, como a lignina [22, 24].

No entanto, durante a resistência sistêmica, a principal fonte de SA após infecção do patógeno é originada pela via do corismato, onde esse composto é convertido em isocorismato, e posteriormente, em SA pela ação das enzimas isocorismato sintase e isocorismato piruvato liase. Por outro lado, a síntese de SA via fenilalanina ocorre de forma mais rápida e está relacionada à resistência local [24, 58]. No entanto, o gene *ICS2*, não apresentou aumento expressivo nos níveis de transcritos na presença de KPhi, indicando que possivelmente o SA sintetizado não se originou da via do isocorismato, provavelmente devido aos baixos níveis de expressão dos genes *EDS1* e *PAD4* após tratamento com KPhi.

Os genes *EDS1* e *PAD4* codificam proteínas essenciais à sinalização de resistência a doenças de plantas, que interagem diretamente entre si e ativam a amplificação das defesas locais através de um maior acúmulo de SA [59]. Essas proteínas promovem a expressão do gene que codifica a enzima isocorismato sintase envolvida na síntese de SA. O AS, por sua vez, promove a expressão de *EDS1* e *PAD4* e dessa maneira, potencializa o acúmulo desse hormônio e, conseqüentemente, a sinalização da defesa [60]. Em resposta ao tratamento com ASM, ocorreu o aumento da expressão de *EDS1*, *PAD4* e *ICS2*, indicando que a síntese de SA tenha ocorrido através da via do isocorismato.

A interação das proteínas EDS1-PAD4 também está envolvida no antagonismo entre as rotas do SA e ácido jasmônico (AJ) /etileno (ET), reprimindo a função da MPK4 de ativar a rota AJ/ET [61,62]. Nosso estudo mostrou que a expressão de *MPK4* em folhas de cafeeiro, tratadas com KPhi, diminui ao longo do tempo avaliado. Esses resultados estão de acordo com Massoud *et al.* [13] que demonstraram que KPhi regula negativamente o gene *MPK4* e, conseqüentemente, reduz o acúmulo e fosforilação da proteína MPK4.

A expressão do gene *NPR1* é dependente de SA. O SA se liga aos monômeros da proteína NPR1 promovendo a interação com fatores de transcrição (dentre eles, CDK8) levando a transcrição de *NPR1*. De maneira semelhante, o CDK8 ainda associado ao NPR1 promove a expressão do gene *PR1* [26]. O *NPR1* apresenta expressão constitutiva e só é ativado na presença do patógeno ou aplicação exógena de SA [63]. Sabe-se, por exemplo, que para *C. arabica* a atividade do promotor do gene *NPR1* é dependente de SA [28].

Neste estudo o aumento da expressão de *NPR1* e *CDK8* em relação à testemunha ocorreu somente às 6 horas após a aplicação de KPhi e ASM. Esse comportamento pode ter ocorrido devido a duas situações particulares que envolvem a expressão de *NPR1*: a diminuição do potencial redox celular e a regulação de *NPR1* pelo proteossoma [25]. Quando as enzimas antioxidantes se acumulam na célula para promover a limpeza de ROS, ocorre o aumento do potencial redox [57]. Sob essas condições, a proteína NPR1 que se apresentava como oligômeros no citosol é reduzida a seu estado monomérico e se acumula no núcleo para controlar a expressão de genes relacionados a SAR. Quando há diminuição das condições redutoras, ocorre situação contrária em que proteína NPR1 permanece em seu estado oligomérico no citosol [25]. Após ativar a transcrição do gene alvo, o NPR1 é rapidamente degradado pelo proteossoma evitando a ativação precoce da SAR/genes de defesa quando não há desafio patogênico, devido à renovação constante do NPR1 no núcleo [64].

Essa hipótese é reforçada principalmente pelos resultados observados para o gene *PR1*. No tratamento com ASM observou-se o aumento nos níveis de transcritos deste gene em todos os períodos avaliados, com exceção da cultivar MN às 48 horas. Ao contrário, nas plantas tratadas com KPhi, a expressão deste gene foi reduzida ou não se diferenciou do tratamento controle. A proteína codificada pelo gene *PR1*, também conhecida como proteína marcadora da SAR, possui efeito inibitório contra patógenos fúngicos, por meio de sequestro de esteróis da membrana plasmática destes organismos [65]. Sua expressão é dependente do acúmulo de SA e, baixos níveis de expressão observados sugerem que o tratamento com KPhi não levou ao acúmulo de SA a níveis suficientes para induzir a expressão de *PR1*. Nas plantas tratadas com ASM o aumento da expressão de genes relacionados à SAR, principalmente *PR1*, pode ser explicado pelo fato de que o produto é um análogo desse hormônio. Sendo assim, o tratamento com ASM não requer, necessariamente, que ocorra a síntese de SA para induzir a expressão de genes como *EDS1*, *PAD4* e *ICS2* para garantir o acúmulo de SA e consequentemente, a expressão de genes dependentes da via desse hormônio.

Além da PR1, outras proteínas relacionadas à patogênese (PRs) apresentam alto pico de expressão durante a SAR [14]. O gene *PR2*, também conhecido como *GLU*, codifica a enzima β -1,3-glucanase, apresentou um pico de expressão no período de 48 horas em resposta a KPhi e ASM, no qual é perceptível a diferença entre

as cultivares susceptíveis e resistentes, principalmente após o tratamento com KPhi. A β -1,3-glucanase apresenta atividade antimicrobiana porque atua degradando as β -1,3-glucanas, componentes de estruturas de infecção e colonização de *H. vastatrix* [14, 66]. A expressão desse gene pode ter sido maior nas cultivares resistentes, pois, na interação incompatível entre *H. vastatrix* e *C. arabica* ocorre aumento dos transcritos desse gene em apenas 24 horas, sugerindo que as cultivares resistentes podem apresentar níveis de expressão constitutivos maiores do que em cultivares suscetíveis [67]. O gene *PR5*, também conhecido como *OLP*, é denominado na literatura como osmotin-like proteins e sua atividade antimicrobiana baseia-se na formação de poros na membrana plasmática do patógeno, impedindo a manutenção do pH [68]. Os baixos níveis de expressão deste gene em resposta a KPhi podem estar relacionados ao acúmulo insuficiente de SA para desencadear a expressão de genes *PRs*.

O peróxido de hidrogênio, além de interagir na sinalização de respostas de defesa, participa na formação de lignina como substrato para as peroxidases, fortalecendo a parede celular da planta, consequentemente aumentando a resistência a múltiplos patógenos [23]. As peroxidases (POX) ou PR9, são codificadas pelo gene *POX*. Nossos resultados, mostram que KPhi foi tão eficiente quanto ASM ao induzir a expressão desse gene, principalmente nas cultivares resistentes que apresentaram um aumento expressivo do número de transcritos ao longo do tempo avaliado. Além de atuar na biossíntese de lignina, sendo essencial na última etapa da via dos fenilpropanóides, a POX faz parte do complexo enzimático de antioxidantes e atua catalisando a oxidação de diferentes substratos, como os compostos fenólicos. Esses possuem ação antimicrobiana, inibindo germinação de esporos, crescimento micelial e a produção enzimática [22, 69, 70].

Os baixos teores de compostos fenólicos totais e teor de lignina, em resposta à aplicação de indutores, podem estar relacionados ao tempo de coleta utilizado no presente estudo, possivelmente insuficiente para o aumento significativo desses compostos [71]. Mas, devido ao aumento da expressão gênica de PAL e também da atividade da PPO é provável que a formação de compostos fenólicos ocorra posteriormente ao tempo avaliado. Além da POX, a enzima PPO também utiliza compostos fenólicos como substratos para reação de oxidação. A aplicação de KPhi, de maneira geral, resultou em aumento na atividade enzimática na maioria das cultivares. As PPOs são um grupo de enzimas que catalisam a hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e, em seguida, a oxidação de o-difenóis para o-quinonas na presença de oxigênio. As quinonas possuem ação antimicrobiana e são mais tóxicas que os compostos fenólicos que lhes deram origem [72].

Nosso trabalho mostrou que a aplicação foliar de KPhi atua pré-ativando vários componentes do mecanismo de defesa, desde moléculas sinalizadoras até enzimas específicas para produção de metabólitos

secundários. Dessa forma, KPhi pode ser considerado um potente indutor de resistência do cafeeiro, pois, é responsável por estimular a expressão das defesas naturais da planta que possivelmente ocorreriam na interação patógeno-hospedeiro, e, em caso de ocorrência da referida interação, provavelmente resultaria em respostas mais rápidas e em maior intensidade. Essa característica dos indutores de resistência é conhecida como efeito *priming*, pois, a aplicação desses na planta leva ao acúmulo de proteínas inativas. E, diante ao desafio patogênico mais proteínas de sinalização são ativadas, levando a uma forte amplificação do sinal, e consequentemente a uma resposta de defesa mais rápida e potente [73].

O tratamento com KPhi, na ausência do patógeno, induziu a ativação de vários componentes relacionados a respostas de defesa em mudas de cafeeiro com diferentes níveis de resistência a ferrugem. Apesar de algumas variáveis (SOD, PAL, NPRI, GLU e POX) terem sido mais responsivas a KPhi nas cultivares resistentes, esse tratamento também foi capaz de induzir a resposta desses componentes de defesa, mesmo que em baixos níveis, nas cultivares suscetíveis. Isso pode ocorrer porque os indutores de resistência ativam a resistência latente da planta [8], e as plantas resistentes a ferrugem expressam várias dessas respostas de defesa, impedindo que a interação planta-patógeno seja compatível [29, 50, 74, 75].

O mecanismo de ação de KPhi na indução de resistência do cafeeiro, possivelmente, envolva a mesma via daquela induzida pelo ASM, que pode ser observado pela indução de genes responsivos ao SA. Assim como a resposta de defesa de genótipos resistentes a ferrugem, que também expressam genes dependentes dessa via [74, 76]. Esse mecanismo também pode envolver a produção de ROS, devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes responsáveis pela eliminação dessas moléculas. Dessa forma, o mecanismo de ação de KPhi provavelmente atue nessas duas vias paralelas de sinais de defesa, SA e ROS, que são essenciais para a indução da SAR quando ativadas simultaneamente [77]. Além disso, KPhi induziu o aumento da expressão de genes (PAL e POX) e atividade de uma enzima (PPO) envolvidos na biossíntese de compostos fenólicos e lignina. Esses compostos são típicos de defesa do cafeeiro, uma vez que a regulação desses fazem parte da estratégia constitutiva de defesa de cultivares de cafeeiro com diferentes níveis de resistência a ferrugem [29].

Conclusões

KPhi pode mobilizar a indução de diversas moléculas associadas com as respostas de defesa em plantas de cafeeiro. O tratamento com KPhi, via foliar, induziu a ativação de componentes relacionados as respostas naturais de defesa em cultivares de cafeeiro resistentes e suscetíveis a ferrugem, mesmo na ausência do

patógeno. Possivelmente, o mecanismo de ação de KPhi ative simultaneamente duas vias de sinais de defesa (SA e ROS) essenciais para o estabelecimento da SAR e também, regule positivamente a biossíntese de metabólitos secundários, compostos típicos da defesa do cafeeiro. Todos esses mecanismos de defesa em conjunto podem conferir as plantas uma resposta de defesa mais rápida e, conseqüentemente uma maior proteção a um eventual desafio patogênico.

Contribuições dos autores: Idealização do trabalho: PFP, MLVR, NCF, MLS, TR e DMSB. Preparo material vegetal: PFP, MLS, NCF e DMSB. Extrações RT-qPCR: PFP, NCF e MLS. Análises RT-qPCR: PFP, NCF e TR. Análises genes de referência: PFP e TR. Análises enzimáticas e metabólitos secundários: PFP, TR e DMSB. Análises estatísticas: PFP, EBF e DMSB. Gráficos: PFP, EBF e TR. Análise e interpretação dos dados: PFP, TR e NCF. Escrita do artigo: PFP. Revisão crítica do artigo: MLVR, NCF, TR, DMSB e MLS. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Financiamento: Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Código Financeiro 001, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

Referências

1. Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. (2022). Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília, DF, v.9, safra 2022, n. 2, maio, 2022.
2. United States Department of Agriculture - USDA. (2021). Coffee: World Markets and Trade. 2021. Retrieved December 10, 2021, from <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>
3. Talhinhos, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., ... & Silva, M. D. C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular plant pathology*, 18(8), 1039-1051.
4. Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1-8.
5. Resende, M. L. V., Pozza, E. A., Reichel, T., & Botelho, D. M. S. (2021). Strategies for Coffee Leaf Rust Management in Organic Crop Systems. *Agronomy*, 11(9), 1865.

6. Rainforest Alliance. (2021). Anexo S7: Gestão de Pesticidas, versão 1.2, jul. 2021. Retrieved December 10, 2021, from https://www.rainforest-alliance.org/wp-content/uploads/2020/06/Annex-7-Pesticides-Management_PT.pdf
7. Brasil. Resolução-RE nº165, de 29 de agosto de 2003. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 set. 2003, Seção 1, p.48-50.
8. Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., & Félix, M. R. F. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry letters*, 15, 152-158.
9. Costa, B. H. G., de Resende, M. L. V., Ribeiro Júnior, P. M., Mathioni, S. M., Pádua, M. A., & da Silva Júnior, M. B. (2014). Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. *Journal of Phytopathology*, 162(10), 635-642.
10. Monteiro, A. C. A., de Resende, M. L. V., Valente, T. C. T., Ribeiro Junior, P. M., Pereira, V. F., da Costa, J. R., & da Silva, J. A. G. (2016). Manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: Biochemical and Molecular Analyses. *Journal of Phytopathology*, 164(11-12), 1043-1053.
11. Silva, J. A., Resende, M. L., Monteiro, A. C., Pádua, M. A., Guerra-Guimarães, L., Medeiros, F. L., ... & Botelho, D. M. (2019). Resistance inducers applied alone or in association with fungicide for the management of leaf rust and brown eye spot of coffee under field conditions. *Journal of Phytopathology*, 167(7-8), 430-439.
12. Machinandiarena, M. F., Lobato, M. C., Feldman, M. L., Daleo, G. R., & Andreu, A. B. (2012). Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of plant physiology*, 169(14), 1417-1424.
13. Massoud, K., Barchietto, T., Le Rudulier, T., Pallandre, L., Didierlaurent, L., Garmier, M., ... & Saindrenan, P. (2012). Dissecting phosphite-induced priming in *Arabidopsis* infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Physiology*, 159(1), 286-298.
14. Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 185-209.
15. Brodersen, P., Petersen, M., Bjørn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M. A., Shokat, K. M., ... & Mundy, J. (2006). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid-and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal*, 47(4), 532-546.

16. Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., & Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7370-7390.
17. O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., & Bolwell, G. P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236(3), 765-779.
18. Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., ... & Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science signaling*, 2(84), ra45-ra45.
19. Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
20. Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, 53.
21. Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 800.
22. Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54(1), 519-546.
23. Shu-Hsien, H., Chih-Wen, Y., & Lin, C. H. (2005). Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46.
24. Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(6), 493-496.
25. Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), 935-944.
26. Chen, J., Mohan, R., Zhang, Y., Li, M., Chen, H., Palmer, I. A., ... & Fu, Z. Q. (2019). NPR1 promotes its own and target gene expression in plant defense by recruiting CDK8. *Plant physiology*, 181(1), 289-304.
27. van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162.
28. Barsalobres-Cavallari, C. F., Petitot, A. S., Severino, F. E., Maia, I. G., & Fernandez, D. (2013). Host response profiling to fungal infection: molecular cloning, characterization and expression analysis of NPR1 gene from coffee (*Coffea arabica*).

29. Reichel, T., de Resende, M. L. V., Monteiro, A. C. A., Freitas, N. C., & dos Santos Botelho, D. M. (2021). Constitutive Defense Strategy of Coffee Under Field Conditions: A Comparative Assessment of Resistant and Susceptible Cultivars to Rust. *Molecular biotechnology*, 1-15.
30. Fino, J., Figueiredo, A., Loureiro, A., Gichuru, E. K., Várzea, V., Silva, M. C., ... & Paulo, O. S. (2015). Transcriptional profiling of compatible and incompatible Coffee-*Colletotrichum kahawae* interactions through RNA-Seq analysis. In Proceedings of 25th International Conference on Coffee Science (ASIC), Armenia, Colombia.
31. Diniz, I., Figueiredo, A., Loureiro, A., Batista, D., Azinheira, H., Várzea, V., ... & Silva, M. D. C. (2017). A first insight into the involvement of phytohormones pathways in coffee resistance and susceptibility to *Colletotrichum kahawae*. *PloS one*, 12(5), e0178159.
32. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W71-W74.
33. Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*, 80(1), 75-84.
34. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), 1-12.
35. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
36. Biemelt, S., Keetman, U., & Albrecht, G. (1998). Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiology*, 116(2), 651-658.
37. Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
38. Kar, M., & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant physiology*, 57(2), 315-319.
39. Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309-314.
40. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

41. Spanos, G. A., & Wrolstad, R. E. (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(7), 1565-1571.
42. Doster, M., & Bostock, R. M. (1988). Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. *Phytopathology*, 78, 473-477.
43. R Core Team. (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, from <https://www.R-project.org/>.
44. Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A. (2014). ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. *Applied Mathematics*, 5(19), 2952.
45. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.
46. Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*, 54(4), 391-406.
47. Nojosa, G. B. A., Resende, M. L. V., Barguil, B. M., Moraes, S. R. G., & Vilas Boas, C. H. (2009). Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. *Summa Phytopathologica*, 35, 60-62.
48. Ogoshi, C., de Abreu, M. S., da Silva, B. M., Neto, H. S., Júnior, P. M. R., & de Resende, M. L. V. (2013). Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants. *Bioscience Journal*, 29, 1558-1565.
49. Guzzo, S. D., Castro, R. D., Kida, K., & Martins, E. M. F. (2001). Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. *Arquivos do Instituto Biológico*, 68(1), 89-94.
50. Guzzo, S. D., Harakava, R., & Tsai, S. M. (2009). Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. *Journal of Phytopathology*, 157(10), 625-638.
51. Verhagen, B. W., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (2006). Induced disease resistance signaling in plants.
52. Eshraghi, L. E., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. S., & O'Brien, P. A. (2011). Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60(6), 1086-1095.

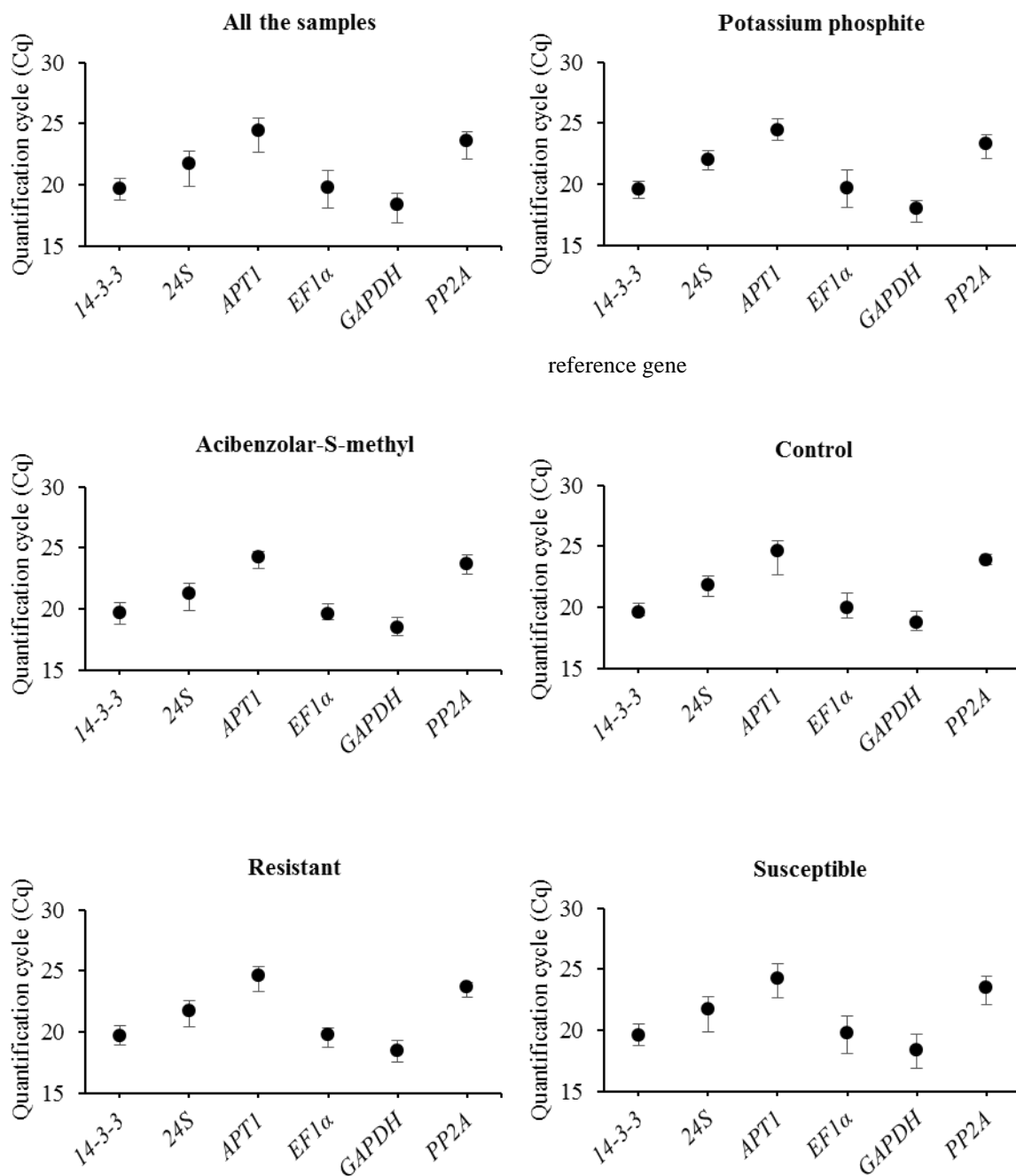
53. Ratjen, A. M., & Gerendás, J. (2009). A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(6), 821-828.
54. Resende, M. L. V., Salgado, S. M., & Chaves, Z. M. (2003). Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 123-130.
55. Cakmak, I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 521-530.
56. Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
57. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
58. Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562-565.
59. Feys, B. J., Moisan, L. J., Newman, M. A., & Parker, J. E. (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *The EMBO journal*, 20(19), 5400-5411.
60. Dempsey, D. M. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., & Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.
61. Wiermer, M., Feys, B. J., & Parker, J. E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 383-389.
62. Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., ... & Mundy, J. (2000). Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103(7), 1111-1120.
63. Cao, H., Li, X., & Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6531-6536.
64. Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., & Dong, X. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, 137(5), 860-872.

65. Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneider, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *The Plant Journal*, 89(3), 502-509.
66. Silva, M. C., Nicole, M., Rijo, L., Geiger, J. P., & Rodrigues, Jr, C. J. (1999). Cytochemical aspects of the plant–rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)–*Hemileia vastatrix* (race III). *International Journal of Plant Sciences*, 160(1), 79-91.
67. Guzzo, S. D., Harakava, R., & Tsai, S. M. (2009). Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. *Journal of Phytopathology*, 157(10), 625-638.
68. Anil Kumar, S., Hima Kumari, P., Shravan Kumar, G., Mohanalatha, C., & Kavi Kishor, P. (2015). Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. *Frontiers in plant science*, 6, 163.
69. Borden, S., & Higgins, V. J. (2002). Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(4), 227-236.
70. Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., & Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in plant science*, 5, 358.
71. Silva, M. C., Guerra-Guimarães, L., Loureiro, A., & Nicole, M. R. (2008). Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), 29-38.
72. Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*, 12(1), 29-36.
73. Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in plant science*, 16(10), 524-531.
74. Ramiro, D. A., Escoute, J., Petitot, A. S., Nicole, M., Maluf, M. P., & Fernandez, D. (2009). Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*, 58(5), 944-955.
75. Guerra-Guimarães, L., Cardoso, S., Martins, I., Loureiro, A., Bernardes, A. S., Varzea, V., & Silva, M. C. (2009). Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica*–*Hemileia vastatrix* interactions. In: Proceedings of the 22th International Conference on Coffee Science (ASIC2008) (Campinas).

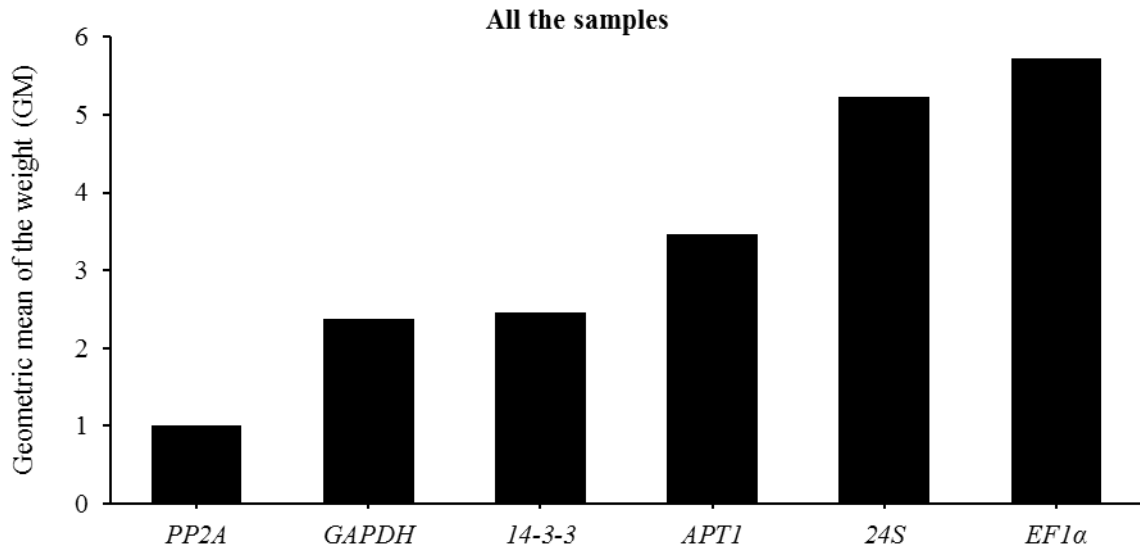
76. Couttolenc-Brenis, E., Carrión, G. L., Villain, L., Ortega-Escalona, F., Ramírez-Martínez, D., Mata-Rosas, M., & Méndez-Bravo, A. (2020). Prehaustorial local resistance to coffee leaf rust in a Mexican cultivar involves expression of salicylic acid-responsive genes. *PeerJ*, 8, e8345.
77. Wang, C., El-Shetehy, M., Shine, M. B., Yu, K., Navarre, D., Wendehenne, D., ... & Kachroo, P. (2014). Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Reports*, 7(2), 348-355.

Supplementary Information

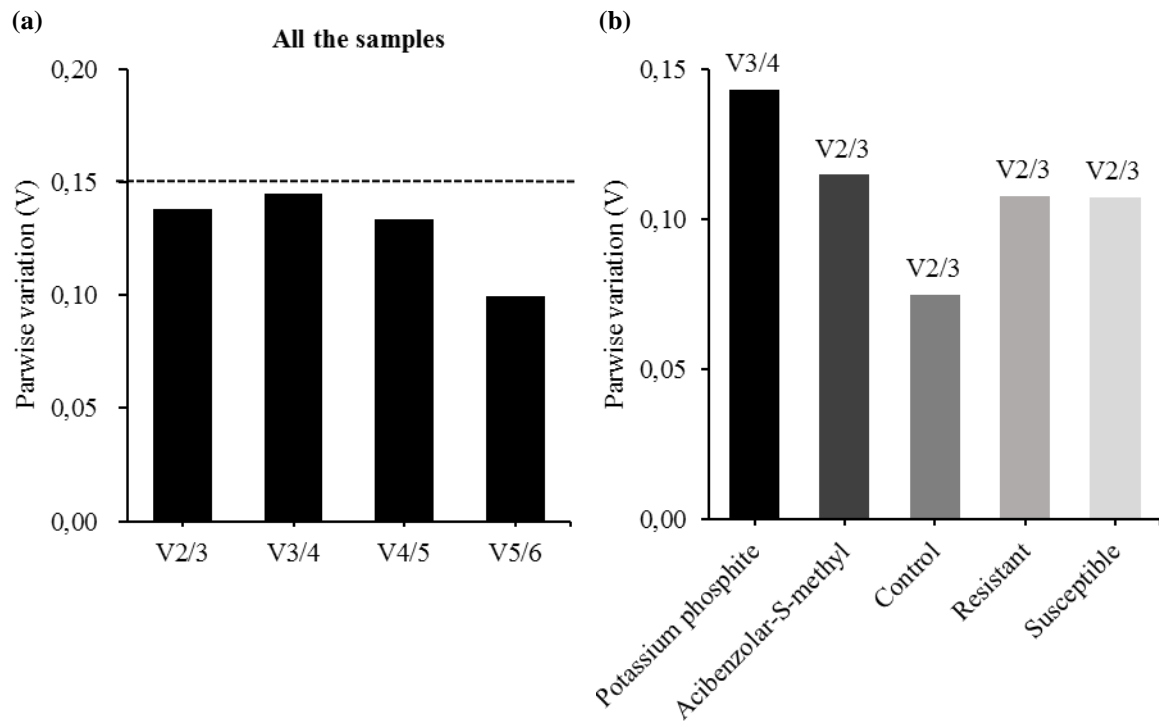
Supplementary Fig. 1 General variation in quantification cycle (Cq) values for each reference gene in different sets of *C. arabica* cDNA samples (all the samples, samples treated with potassium phosphite, and acibenzolar-S-methyl, control samples, resistant, and susceptible genotype samples). Bars indicate maximum and minimum Cq values, and the symbol indicates the mean. Higher Cq values indicate a lower level of expression of the



Supplementary Fig. 2 General ranking of candidate reference genes according to the geometric mean weight (GM) calculated using RefFinder in the set containing all experimental samples. The more stable genes have the lowest GM values, while the least stable genes have the highest values. The stability of the gene is inversely proportional to the value of GM



Supplementary Fig. 3 Pairwise variation (V) of the reference genes in the set of **a** all the samples and in the sets of **b** samples treated with potassium phosphite, and acibenzolar-S-methyl, untreated samples, resistant, and susceptible cultivars samples with and control (without treatment). V values indicate the optimal number of reference genes to be used for normalizing RT-qPCR data



Supplementary Table 1 Ranking of candidate reference genes according to the stability values was determined using the Delta-CT, BestKeeper, Normfinder, Genorm and RefFinder algorithms in different sets: samples treated with potassium phosphite, and acibenzolar-S-methyl, untreated samples, resistant, and susceptible genotype samples with and control (without treatment), all the samples. Lower values obtained from each algorithm indicate greater stability of gene expression.

Sample group	Rank	Delta-CT		BestKeeper		Normfinder		Genorm		RefFinder	
		Gene	Cq ¹	Gene	SD ²	Gene	SV ³	Gene	SV ³	Gene	GM ⁴
All the samples	1	<i>PP2A</i>	0.68	<i>PP2A</i>	0.22	<i>PP2A</i>	0.31	<i>PP2A</i>	0.58	<i>PP2A</i>	1.00
	2	<i>14-3-3</i>	0.78	<i>GAPDH</i>	0.38	<i>14-3-3</i>	0.54	<i>GAPDH</i>	0.58	<i>GAPDH</i>	2.38
	3	<i>ATP1</i>	0.79	<i>14-3-3</i>	0.42	<i>ATP1</i>	0.55	<i>14-3-3</i>	0.61	<i>14-3-3</i>	2.45
	4	<i>GAPDH</i>	0.80	<i>ATP1</i>	0.48	<i>GAPDH</i>	0.59	<i>ATP1</i>	0.68	<i>ATP1</i>	3.46
	5	<i>24S</i>	0.86	<i>EF1α</i>	0.55	<i>24S</i>	0.66	<i>24S</i>	0.76	<i>24S</i>	5.23
	6	<i>EF1α</i>	0.87	<i>24S</i>	0.60	<i>EF1α</i>	0.68	<i>EF1α</i>	0.80	<i>EF1α</i>	5.73
Potassium phosphite	1	<i>PP2A</i>	0.77	<i>PP2A</i>	0.31	<i>PP2A</i>	0.29	<i>ATP1</i>	0.62	<i>PP2A</i>	1.41
	2	<i>24S</i>	0.84	<i>24S</i>	0.44	<i>24S</i>	0.48	<i>14-3-3</i>	0.62	<i>24S</i>	2.51
	3	<i>ATP1</i>	0.86	<i>14-3-3</i>	0.56	<i>ATP1</i>	0.56	<i>GAPDH</i>	0.69	<i>ATP1</i>	2.59
	4	<i>14-3-3</i>	0.90	<i>GAPDH</i>	0.58	<i>14-3-3</i>	0.68	<i>PP2A</i>	0.70	<i>14-3-3</i>	2.63
	5	<i>GAPDH</i>	0.92	<i>ATP1</i>	0.61	<i>GAPDH</i>	0.69	<i>24S</i>	0.77	<i>GAPDH</i>	4.16
	6	<i>EF1α</i>	1.19	<i>EF1α</i>	0.72	<i>EF1α</i>	1.09	<i>EF1α</i>	0.91	<i>EF1α</i>	6.00
Acibenzolar-S-methyl	1	<i>PP2A</i>	0.60	<i>EF1α</i>	0.15	<i>PP2A</i>	0.34	<i>14-3-3</i>	0.51	<i>PP2A</i>	1.57
	2	<i>14-3-3</i>	0.62	<i>PP2A</i>	0.17	<i>GAPDH</i>	0.37	<i>GAPDH</i>	0.51	<i>GAPDH</i>	2.06
	3	<i>GAPDH</i>	0.62	<i>GAPDH</i>	0.31	<i>14-3-3</i>	0.37	<i>PP2A</i>	0.54	<i>14-3-3</i>	2.34
	4	<i>EF1α</i>	0.64	<i>ATP1</i>	0.38	<i>EF1α</i>	0.43	<i>EF1α</i>	0.57	<i>EF1α</i>	2.83
	5	<i>ATP1</i>	0.74	<i>14-3-3</i>	0.42	<i>ATP1</i>	0.61	<i>ATP1</i>	0.61	<i>ATP1</i>	4.73
	6	<i>24S</i>	0.77	<i>24S</i>	0.61	<i>24S</i>	0.66	<i>24S</i>	0.66	<i>24S</i>	6.00
Control	1	<i>24S</i>	0.51	<i>PP2A</i>	0.28	<i>24S</i>	0.29	<i>24S</i>	0.43	<i>24S</i>	1.41
	2	<i>GAPDH</i>	0.51	<i>14-3-3</i>	0.28	<i>GAPDH</i>	0.29	<i>GAPDH</i>	0.43	<i>GAPDH</i>	1.86
	3	<i>PP2A</i>	0.53	<i>GAPDH</i>	0.44	<i>PP2A</i>	0.33	<i>EF1α</i>	0.44	<i>PP2A</i>	2.45
	4	<i>EF1α</i>	0.55	<i>24S</i>	0.56	<i>EF1α</i>	0.36	<i>PP2A</i>	0.47	<i>14-3-3</i>	3.98
	5	<i>14-3-3</i>	0.65	<i>ATP1</i>	0.56	<i>14-3-3</i>	0.54	<i>14-3-3</i>	0.52	<i>EF1α</i>	4.12
	6	<i>ATP1</i>	0.67	<i>EF1α</i>	0.58	<i>ATP1</i>	0.58	<i>ATP1</i>	0.57	<i>ATP1</i>	5.73
Resistant	1	<i>PP2A</i>	0.59	<i>PP2A</i>	0.21	<i>PP2A</i>	0.32	<i>24S</i>	0.54	<i>PP2A</i>	1.32
	2	<i>ATP1</i>	0.65	<i>14-3-3</i>	0.37	<i>ATP1</i>	0.44	<i>EF1α</i>	0.54	<i>24S</i>	2.91
	3	<i>24S</i>	0.66	<i>GAPDH</i>	0.40	<i>GAPDH</i>	0.46	<i>PP2A</i>	0.59	<i>ATP1</i>	2.99
	4	<i>GAPDH</i>	0.66	<i>EF1α</i>	0.48	<i>24S</i>	0.47	<i>ATP1</i>	0.61	<i>EF1α</i>	3.16
	5	<i>EF1α</i>	0.70	<i>ATP1</i>	0.52	<i>EF1α</i>	0.55	<i>GAPDH</i>	0.63	<i>GAPDH</i>	3.66
	6	<i>14-3-3</i>	0.72	<i>24S</i>	0.59	<i>14-3-3</i>	0.58	<i>14-3-3</i>	0.66	<i>14-3-3</i>	4.56
Susceptible	1	<i>PP2A</i>	0.74	<i>PP2A</i>	0.22	<i>PP2A</i>	0.29	<i>PP2A</i>	0.62	<i>PP2A</i>	1.00
	2	<i>14-3-3</i>	0.82	<i>14-3-3</i>	0.46	<i>14-3-3</i>	0.50	<i>GAPDH</i>	0.62	<i>14-3-3</i>	2.21
	3	<i>ATP1</i>	0.87	<i>GAPDH</i>	0.48	<i>ATP1</i>	0.58	<i>14-3-3</i>	0.64	<i>GAPDH</i>	2.63
	4	<i>GAPDH</i>	0.92	<i>ATP1</i>	0.56	<i>GAPDH</i>	0.71	<i>ATP1</i>	0.72	<i>ATP1</i>	3.46
	5	<i>EF1α</i>	1.00	<i>24S</i>	0.59	<i>EF1α</i>	0.80	<i>EF1α</i>	0.83	<i>EF1α</i>	5.23
	6	<i>24S</i>	1.02	<i>EF1α</i>	0.62	<i>24S</i>	0.83	<i>24S</i>	0.89	<i>24S</i>	5.73

¹Cq = quantification cycle; ²SD = standard deviation; ³SV = stability value; ⁴GM = geometric mean of the weights

